

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

CENTRUM REGIONU HANÁ PRO BIOTECHNOLOGICKÝ A ZEMĚDĚLSKÝ VÝZKUM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Detekce monomolové a dimolové emise singletního kyslíku v lidských
nádorových buňkách**

Vypracovala: Jesika Ucháčová

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Marek Rác, Ph.D.

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Matku Rácovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc při psaní bakalářské práce, poskytnutí literatury, pomoc při měření s PMT a za trpělivý a ochotný přístup. Dále děkuji Doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D., za odborné rady a ochotný přístup.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením
Mgr. Marka Ráce, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne:

Podpis:

Souhrn

Je dobře známo, že ultra slabá fotonová emise (UPE) je emise fotonů ve viditelné a blízké infračervené oblasti spektra, která pochází ze všech živých organismů. V téhle bakalářské práci jsme použili lidský mnohočetný myelom U266, ze kterého jsme detekovali UPE pomocí fotonásobiče. Použili jsme fotonásobiče pro viditelnou a infračervenou oblast spektra, protože jsme zkoumali vyzařování excitační energie singletního kyslíku ($^1\text{O}_2$), který je detekován v červené a blízké infračervené oblasti spektra.

Singletní kyslík vzniká přenosem excitační energie z tripletného excitovaného karbonylu na molekulu kyslíku nebo rozpadem tetroxidu. V červené oblasti spektra je vyzařován při vlnových délkách 632 nm a 703 nm. Tyto vlnové délky jsou charakteristické pro dimolovou fotonovou emisi $^1\text{O}_2$, která je způsobena srážkou dvou $^1\text{O}_2$. Monomolová fotonová emise vzniká vyzářením z jedné molekuly $^1\text{O}_2$ v infračervené oblasti spektra při 1270 nm.

V téhle bakalářské práci jsme studovali vliv reaktivních forem kyslíku (ROS), které byly přidány k buněčné kultuře U266, na UPE. Exogenní ROS nastartuje řetěvové chemické reakce vedoucí ke vzniku $^1\text{O}_2$ přes tzv. Russellův mechanismus. Obdržené výsledky potvrzují nárůst UPE po přidání ROS jak ve viditelné, tak v infračervené oblasti spektra.

Zkoumali jsme také vliv antioxidantů, které zabraňují oxidaci biomolekul. Použili jsme kyselinu askorbovou a histidin. Námi zjištěné výsledky potvrzují snížení indukované UPE po přidání antioxidantů.

Summary

It is wellknown that ultra weak photon emission (UPE) is the emission of photons in the visible and near infrared region of the spectrum, which comes from all living organisms. In this bachelor thesis, we used the human multiple myeloma U266, from which we have detected UPE using a photomultiplier. We used a photomultiplier for the visible and infrared region of the spectrum, because we examined the radiation of the excitation energy of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), which is detected in both red and nearinfrared region of the spectrum.

Singlet oxygen can be generated by energy transfer from the triplet excited carbonyl to the oxygen molecule, or the decomposition of tetroxide. The maximum emission is at 632nm and 703nm in the red region of the spectra. These wavelengths are characteristic for dimol photon emission of $^1\text{O}_2$, which is caused by the collision of two molecules of $^1\text{O}_2$. Monomol photon emission originates from one molecule of $^1\text{O}_2$ in the infrared region of the spectrum at 1270 nm.

In this bachelor thesis we studied the effect of the addition of reactive oxygen species (ROS) to the cell culture U266 on the UPE. Exogenous ROS starts a chemical chain reaction leading to the formation of $^1\text{O}_2$ through the so-called Russell mechanism. Presented results confirm the increase in UPE after the addition of ROS both in the visible and in the infrared region of the spectrum.

We also investigated the effect of antioxidants, which prevent oxidation of biomolecules. We used ascorbic acid and histidine. Presented results confirm the decrease in the induced UPE in the presence of antioxidants.

Seznam zkratek

$^1\text{O}_2$	singletní kyslík
$^3(\text{R}=\text{O})^*$	tripletný excitovaný karbonyl
5 – HPMU	5 – (hydroperoxymethyl)uracil
C^*	excitovaný chromofor
CCD kamera	charge coupled device kamery
CuOOH	cumene hydroperoxid
EPR	elektronová paramagnetická resonance
FeSO_4	síran železnatý
H_2O_2	peroxid vodíku
$\text{HO}\cdot$	hydroxylový radikál
HOCl	kyselina chlorná
LA	kyselina linolová
LAOH	hydroxid kyseliny linolové
MoO_3	oxid molybdenový
NaN_3	azid sodný
O_2	molekulární kyslík
$\text{O}_2^{\cdot-}$	superoxidový aniontový radikál
PCOOH	fosfolipidové hydroperoxydy
PMT	photomultiplier (fotonásobič)
$\text{R}\cdot$	alkylový radikál
$\text{RO}\cdot$	alkoxylový radikál
$\text{ROO}\cdot$	peroxylový radikál
ROOH	hydroperoxid

ROOOOR	tetroxid
ROOR	dioxetan
ROS	reaktivní formy kyslíku
t-BOOH	t-butyl hydroperoxid
UPE	ultra slabá fotonová emise

OBSAH

1. ÚVOD	2
2. TEORETICKÁ ČÁST	4
2.1 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	4
2.2 ULTRA SLABÁ FOTONOVÁ EMISE.....	6
2.2.1 <i>Dimolová fotonová emise</i>	10
2.2.2 <i>Monomolová fotonová emise</i>	11
2.3 ANTIOXIDANTY	13
3. CÍL PRÁCE	14
4. MATERIÁL A METODY	15
4.1 BUNĚČNÁ KULTURA U266.....	15
4.2 MĚŘENÍ S PMT	16
4.2.1 <i>Viditelné PMT s filtrem</i>	16
4.2.2 <i>Infračervené PMT</i>	16
5. VÝSLEDKY	17
5.1 KONCENTRAČNÍ ŘADA SUSPENZE BUNĚK U266	17
5.2 POROVNÁNÍ UPE VE VIS A IČ OBLASTI	19
5.3 MĚŘENÍ NA PMT PRO VIS S HRANOVÝM FILTREM A BEZ HRANOVÉHO FILTRU	21
5.3.1 <i>Měření UPE indukovanou H₂O₂</i>	21
5.3.2 <i>Měření UPE indukované HO</i>	22
5.3.3 <i>Měření UPE indukovanou ¹O₂</i>	23
5.1 Vliv ANTIOXIDANTŮ NA UPE INDUKOVANOU H ₂ O ₂	24
5.4.1 <i>Kyselina askorbová</i>	24
5.4.2 <i>Histidin</i>	26
6. DISKUSE	28
7. ZÁVĚR	30
8. SEZNAM LITERATURY	31

1. Úvod

Reaktivní formy kyslíku (ROS) se dělí na radikály, které mají jeden nebo dva nepárové elektrony na atomu kyslíku a na neradikály, které nemají žádné nepárové elektrony na atomu kyslíku. Vznikají jako vedlejší produkt při metabolických a oxidativních procesech. Reaktivní formy kyslíku oxidují biomolekuly, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Oxidace biomolekul může vést k tvorbě elektronově excitovaných molekul. Excitační energie může být vyzářena ve formě světla. Tento fenomén se nazývá ultra-slabá fotonová emise (UPE). Ultra slabá fotonová emise je emise fotonů ve viditelné a blízké infračervené oblasti, která pochází ze všech živých organismů. Ultra slabá fotonová emise se vytváří elektronovým přechodem z elektricky excitovaných forem ze singletního nebo tripletního excitovaného stavu na základní stav. V roce 1961 poprvé snímali UPE z jater a potom dále zkoumali další orgány. Poprvé byla UPE popsána německým vědcem ruského původu Alexanderem Gurwitschem v roce 1924 (Rác, 2010). Nicméně až rozvoj citlivých fotonásobičů v padesátých letech minulého století umožnil její přímou detekci. Dělí se na spontánní a indukovanou. Indukovaná UPE je způsobena abiotickými a biotickými stresovými faktory. Zatím co spontánní UPE vzniká při oxidativních metabolických procesech.

V téhle bakalářské práci byla studována UPE pocházející ze singletního kyslíku ($^1\text{O}_2$). Singletní kyslík vyzářuje v podobě monomolové a dimolové fotonové emise. Zatímco dimolová fotonová emise vzniká srážkou dvou molekul singletního kyslíku a je snímána v červené oblasti spektra při vlnových délkách 634 nm a 703 nm, při monomolové fotonové emisi vyzářuje pouze jedna molekula $^1\text{O}_2$, pro kterou je charakteristická vlnová délka 1270 nm, blízká infračervená oblast spektra. Poprvé byla dimolová fotonová emise $^1\text{O}_2$ detekována při vlnové délce 634 nm v roce 1960 (Seliger, 1960) a až v roce 1963 při vlnové délce 703 nm (Khan a Kasha, 1963). Singletní kyslík může vzniknout přenosem excitační energie, rekombinací peroxylových radikálů přes Russellův mechanismus, při fagocytóze, nebo působením fyzikálních stresových faktorů jako vysoká teplota a UV záření.

Existují i látky, které zabraňují tvorbě volných radikálů. Jedná se o antioxidanty, pro které je to jedna z nejdůležitějších funkcí. Nejdůležitější antioxidant v těle je vitamín E, který zabraňuje lipidovou peroxidaci. Dělá to tak, že se sám změní na tokoferolový

radikál, který není tak reaktivní. Pomocí vitamínu C se tokoferolový radikál změní zpět na vitamín E.

V téhle bakalářské práci byla studována tvorba $^1\text{O}_2$ v lidských nádorových buňkách U266 způsobena přidáním exogenních ROS. Oxidace biomolekul pomocí ROS vede k řetězovým reakcím, při kterých vznikají peroxylové radikály ($\text{ROO}\cdot$). Při vysoké koncentraci $\text{ROO}\cdot$. Dochází k jejich rekombinaci přes Russellův mechanismus, což má za následek tvorbu $^1\text{O}_2$.

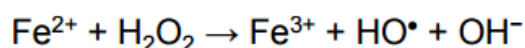
2. Teoretická část

2.1 Reaktivní formy kyslíku

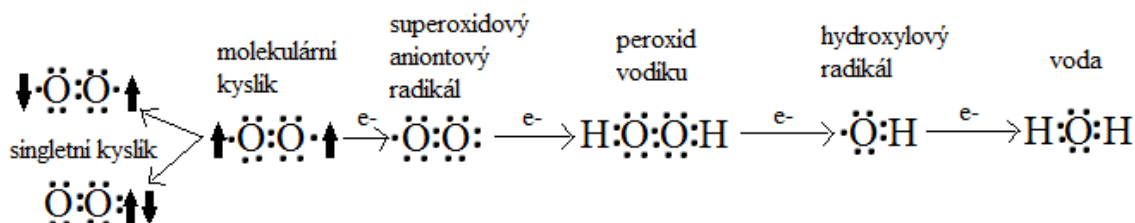
Reaktivní formy kyslíku jsou molekuly tvořené jedním nebo dvěma atomy kyslíku. Dělí se na radikály a neradikály. Radikály mají jeden nebo dva nepárové elektrony na atomu kyslíku. Řadí se mezi ně superoxidový aniontový radikál ($O_2^{\cdot-}$) a hydroxylový radikál (HO^{\cdot}). Naopak neradikály nemají žádné nepárové elektrony na atomu kyslíku a patří mezi ně peroxid vodíku (H_2O_2) a 1O_2 (Pospíšil a kol., 2014).

Reaktivní formy kyslíku jsou vedlejší produkty, které vznikají metabolickými procesy jako fotosyntézou v chloroplastech a buněčným dýcháním v mitochondriích nebo oxidativními procesy jako je fagocytóza buněk (Rác a kol., 2015).

Reaktivní formy kyslíku se tvoří dvěma různými způsoby. Buď pomocí jednoelektronové redukce nebo přenosem excitační energie. Jednoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku (O_2) se tvoří $O_2^{\cdot-}$, tento proces nastává během buněčného dýchání v mitochondriích. Jednoelektronovou redukcí $O_2^{\cdot-}$ se vytváří H_2O_2 . Tvoří se buď spontánně, nebo je katalyzována superoxidismutázou (SOD) v mitochondriích, chloroplastech a cytoplazmě. Peroxid vodíku se také tvoří dvouelektronovou redukcí O_2 a nastává během oxidace specifických substrátů v mitochondriích a peroxisomech. Pomocí Fentonovy reakce vzniká HO^{\cdot} , kde kov katalyzuje jednoelektronovou redukcí H_2O_2 na HO^{\cdot} . Singletní kyslík vzniká přenosem excitační energie.



Obr. 1: Fentonova reakce – Dvojmocné železo reaguje s peroxidem vodíku za vzniku trojmocného železa, hydroxylového radikálu a hydroxidu.



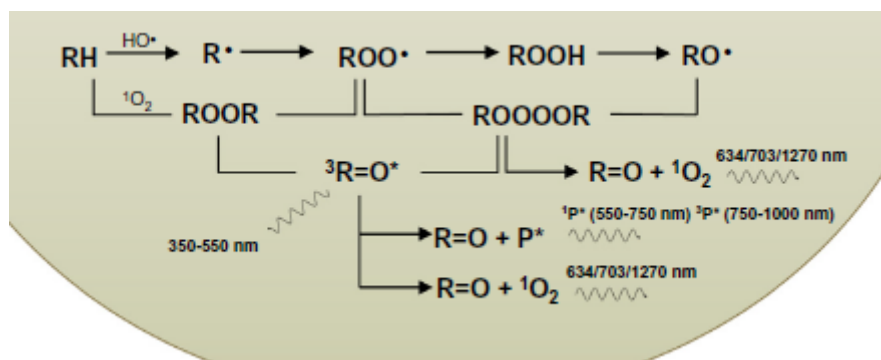
Obr. 2: Tvorba ROS

Excitační energie $^1\text{O}_2$ je vyzařována v podobě dimolové nebo monomolové fotonové emise. Dimolová fotonová emise je způsobena srážkou dvou $^1\text{O}_2$. Zatímco monomolová vzniká vyzářením jedné molekuly $^1\text{O}_2$ (Pospíšil a kol., 2014).

2.2 Ultra slabá fotonová emise

Ultra slabá fotonová emise se dělí na spontánní a indukovanou. Spontánní UPE vzniká při oxidativních metabolických procesech, které se vyskytují ve všech živých buňkách, např. buněčné dýchání. Indukovaná UPE vzniká během oxidativních stresových procesů a je podmíněna abiotickými a biotickými stresovými faktory. Abiotický stres se dělí na fyzikální a chemický. Mezi chemický se řadí např. cigaretový kouř, přidání H_2O_2 . Fyzikální stres je např. mechanické poškození nebo UV záření. K biotickým stresovým faktorům patří viry, bakterie a houby.

Při stresových podmínkách vznikají ROS. V menší míře jsou kontrolovány pomocí antioxidantů, ve vyšší koncentraci pak způsobují oxidaci biomolekul. Oxidace biomolekul je řetězová reakce, kdy v prvním kroku odtržením atomu vodíku pomocí HO^\bullet vzniká alkylový radikál (R^\bullet), který může interagovat s O_2 za vzniku ROO^\bullet . Následná reakce mezi ROO^\bullet a molekulou proteinu, lipidu nebo nukleové kyseliny vede k tvorbě R^\bullet a hydroperoxidu ($ROOH$). Jednoelektronovou redukcí $ROOH$ vzniká alkoxylový radikál (RO^\bullet). Cyklizací ROO^\bullet nebo rekombinací dvou ROO^\bullet vzniká dioxetan ($ROOR$) a tetroxid ($ROOOOR$). Rozkladem $ROOR$ a $ROOOOR$ vznikne tripletný excitovaný karbonyl (${}^3(R=O)^*$). Přenosem excitační energie z ${}^3(R=O)^*$ na O_2 a rozpadem $ROOOOR$ vzniká 1O_2 (Pospíšil a kol., 2014).

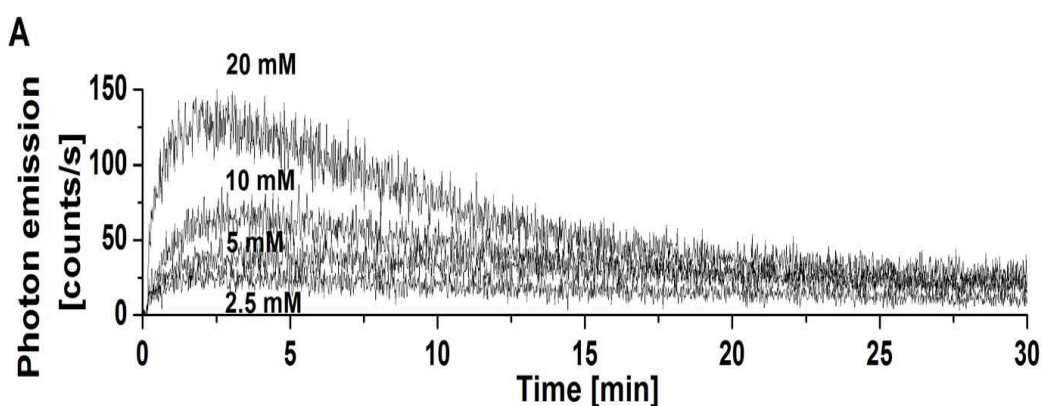


Obr. 3: Reakce vedoucí ke vzniku 1O_2 , (upraveno podle Pospíšil a kol., 2014)

Tripletný excitovaný karbonyl emituje fotony v modro-zelené oblasti spektra při vlnových délkách 350 – 550 nm. V zeleno-červené oblasti spektra 550 – 750 nm jde vidět emise excitovaných chromoforů C^* . Pro dimolovou fotonovou emisi 1O_2 je charakteristické červené spektrum při 634 nm a 703 nm. Zatímco monomolová fotonová emise 1O_2 je vyzařována při vlnové délce 1270 nm, blízká infračervená oblast (Rác a kol., 2015). Doba života 1O_2 závisí na rozpouštědlu. Abychom mohli detekovat 1O_2

v infračervené oblasti, není doporučeno použít za rozpouštědlo vodu, jelikož ve vodě má $^1\text{O}_2$ nejkratší životnost (Adam a kol., 2005). K vyzáření těchto molekul je zapotřebí stresových faktorů. Jako nejčastější stresový faktor se používá právě H_2O_2 .

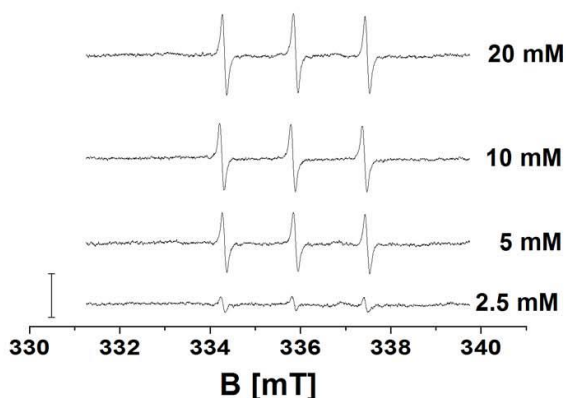
Vliv H_2O_2 na suspenzi buněk U266 byl studován pomocí fotonásobiče (PMT), charge coupled device kamery (CCD kamera), laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu a elektronové paramagnetické resonance (EPR). Emise za použití PMT a hranového filtru s propustností od 600 nm je přibližně 4x menší než u měření celého spektra. Jelikož při použití hranového filtru s danou propustností je snímána emise některých C^* a dimolová fotonová emise $^1\text{O}_2$. Zatímco u celého viditelného spektra jsou



Obr. 4: Detekce emise po přidání různých koncentrací H_2O_2 , které jsou znázorněny v obrázku, pomocí fotonásobiče (převzato z Rác a kol., 2015).

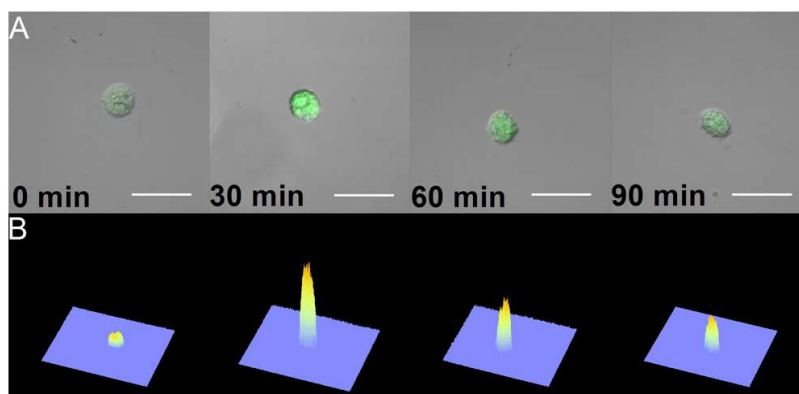
k tomu snímány i $^3(\text{R}=\text{O})^*$.

U EPR se do měřeného vzorku přidává ještě tzv. spin – trap. Jedná se o sloučeninu, která reaguje se $^1\text{O}_2$ za vzniku stabilnější sloučeniny detekovatelné pomocí EPR. V tomto případě se jednalo o TEMP, který se reakcí se $^1\text{O}_2$ mění na stabilní TEMPONE.



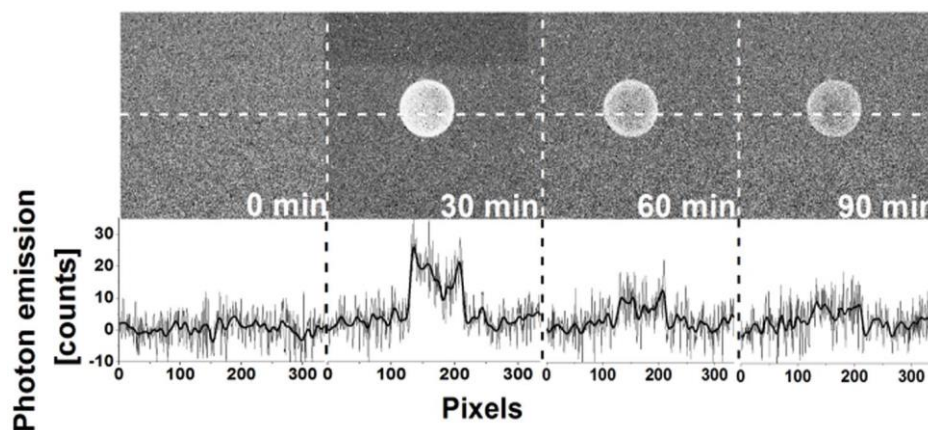
Obr. 5: Emise detekována pomocí EPR při přidání H_2O_2 a spin – trapu TEMP za vzniku TEMPONE (převzato z Rác a kol., 2015).

Jako další metodu použili laserový rastrovací konfokální mikroskop. Singletní kyslík byl měřen pomocí sondy Singlet oxygen sensor green (SOSG). Intenzita SOSG fluorescence byla nejvyšší hned po přidání H_2O_2 .



Obr. 6: V rozhraní od 30 do 60 minut jde vidět nejintenzivnější fluorescence, byl zde přidán 5mM H_2O_2 . Tento snímek je pořízen z konfokálního mikroskopu (převzato z Rác a kol., 2015).

CCD kamerou bylo zkoumáno vytváření $^3(R=O)^*$, kde je zaznamenána nejvyšší emise ihned po přidání H_2O_2 (Rác a kol., 2015).



Obr. 7: Detekce $^3(R=O)^*$ pomocí CCD kamery. Na snímku označeném 0 min je buněčná kultura U266 vložena do tmy. Na ostatních třech snímcích je k buněčné kultuře přidán H_2O_2 . Měření vždy probíhalo 30 minut (převzato z Rác a kol., 2015).

Ultra slabou fotonovou emisi snímali i (), kde porovnávali buňky HL-60 a kvasinkové buňky. U buněk HL-60 snímali indukovanou UPE, kde k buňkám přidávali PMA (forbol 12-myristát, 13-acetát), který s pomocí NADPH vyvolá tvorbu ROS. U

kvasinkových buněk snímali spontánní UPE. Měření prováděli na PMT pro VIS.
Pravděpodobně tedy detekovali ${}^3(\text{R}=\text{O})^*$.

2.2.1 Dimolová fotonová emise

Dimolová fotonová emise vzniká srážkou dvou molekul $^1\text{O}_2$ a je vyzářena při vlnových délkách 634 nm a 703 nm.

Dimolová fotonová emise při 634 nm byla poprvé pozorována v roce 1960 jako důsledek reakce mezi H_2O_2 a HOCl , kdy vzniká $^1\text{O}_2$, H_2O a Cl^- (Seliger, 1960). V roce 1963 byla pozorována i dimolová fotonová emise $^1\text{O}_2$ při vlnové délce 703 nm za použití stejného chemického systému (Khan a Kasha, 1963).

Dimolovou fotonovou emisí $^1\text{O}_2$ zkoumali (Cadenas a kol., 1980), kde studovali vliv t-Butyl hydroperoxidu (t-BOOH) a H_2O_2 na plíce potkanů. Použili fotonásobič s rozsahem 300 – 900 nm a filtry propustné ve viditelné oblasti spektra. Peroxid vodíku a t-BOOH tvoří rozdílné reakce v metabolismu, proto je maximum UPE při různých vlnových délkách. Spektrální analýza za použití červeného filtru před fotonásobičem ukázala, že přidáním t-BOOH, vzniká maximální emise o vlnových délkách 650 – 720 nm. Na rozdíl od H_2O_2 , kde maximální emise činila 520 – 600 nm. Naměřené maxima naznačují, že přidání H_2O_2 vede spíše k tvorbě $^3(\text{R}=\text{O})^*$, zatímco přidání t-BOOH vede k tvorbě ROO^\cdot , jejichž vysoká koncentrace vyústí v tvorbu nestabilního ROOOOH . Rozpadem ROOOOR vzniká $^1\text{O}_2$. Tento děj se nazývá Russellův mechanismus. Také kinetika UPE byla v obou případech odlišná. Po přidání H_2O_2 se emise okamžitě zvýšila a držela se konstantní do té doby, než se H_2O_2 přestal přidávat. Poté pomalu klesala. Zatímco u t-BOOH UPE rostla pomalu, ale byla skoro dvojnásobně vyšší než u H_2O_2 .

Později byl Russellův mechanismus demonstrován i na jiných ROOH. Dimolová fotonová emise vzniká také za pomoci 5-(hydroperoxymethyl)uracil (5-HPMU), který je obsažený v DNA. Redukce ROOH pomocí Ceru (Ce) vedla k okamžitému nárůstu emise, jelikož dochází k Russellovu mechanismu. Stejný experiment byl zopakován s azidem sodným (NaN_3), který zapříčinil snížení nárůstu emise oproti přidání Ce, jelikož se jedná o antioxidant. Tyto samé pokusy byly provedeny i pro přidání kyseliny chlorné (HOCl) místo Ce, emise se opět prudce zvýšila. Následné přidání NaN_3 nemělo na emisi takový vliv jako u přidání Ce. Jak jde vidět, čím větší koncentrace NaN_3 , tím nižší emise (Prado a kol., 2009).

2.2.2 Monomolová fotonová emise

Monomolová fotonová emise $^1\text{O}_2$ vzniká vyzářením fotonu z jedné molekuly $^1\text{O}_2$, která je detekovaná v blízké infračervené oblasti spektra při 1270 nm. Při studiu této emise jsme použili stejné chemické sloučeniny jako u dimolové fotonové emise.

Singletní kyslík vzniká prostřednictvím Russellova mechanismu, kdy přidání H_2O_2 nastartuje tyto reakce. Byl také zkoumán vliv HOCl na zvýšení $^1\text{O}_2$. Peroxid vodíku smíchali s D_2O a přidali HOCl (Miyamoto a kol, 2006), emise se prudce zvýšila. Tento pokus zkoumali i (Miyamoto a kol., 2014). Ovšem pokusů s HOCl bylo daleko více. Zkoumali nárůst fotonové emise po přidání různých ROOH. Ve dvou případech byla fotonová emise téměř nulová a to po smíchání D_2O s t-BOOH a cumene ROOH (CuOOH) a následným přidáním HOCl . Pozitivní vliv na nárůst fotonové emise neměl pouze H_2O_2 , ale i ROOH kyseliny linolové, i když 30x nižší. V tomto případě zjistili i závislost tvorby $^1\text{O}_2$ na pH, kdy nejlepší pH roztoku je 7,4 – 8, poté emise začíná opět klesat. Také prověřovali jaký vliv má kyselina linolová (LA) a hydroxid kyseliny linolové (LAOH) na tvorbu $^1\text{O}_2$ po přidání HOCl . U LA nebyla nalezena žádná emise, zatímco u LAOH bylo pozorováno mírné zvýšení (Miyamoto a kol. 2006). Kyselinu chlornou ve svých měření použili i (Prado a kol., 2009), kde monomolová fotonová emise vzniká reakcí 5-HPMU smíchaném s D_2O a přidáním HOCl . Bylo dokázáno, že nárůst emise je závislý na koncentraci HOCl .

Měření s 5-HPMU smíchaném s D_2O a přidáním Ce vyvolalo také monomolovou fotonovou emisi. Jak již bylo řečeno D_2O zvyšuje dobu života $^1\text{O}_2$. Emise po přidání Ce prudce vzroste a následně klesá. Přidáním NaN_3 , jakožto antioxidantu, emise tolik nevzroste. Samozřejmě záleží na koncentraci - čím vyšší koncentrace NaN_3 byla přidávána, tím nižší emise byla zaznamenaná. Při smíchání D_2O s H_2O v poměru 35:65, 5 – HPMU a Ce nedošlo k tak vysokému navýšení emise jako u čistého D_2O . Bylo dokázáno, že nárůst emise je závislý na koncentraci Ce. Přidáním železa (Fe) do roztoku D_2O s 5-HPMU emise vzroste přibližně 130x na rozdíl od Ce (Prado a kol., 2009).

Dalším předmětem zkoumání byl vliv fosfolipidových ROOH (PCOOH) na tvorbu $^1\text{O}_2$, kdy smíchali HOCl s PCOOH obsažené v liposomech. Při zvyšujících se koncentracích PCOOH je téměř lineární zvýšení emise (Miyamoto a kol., 2006). Ten samý pokus studovali i (Miyamoto a kol., 2014), kde navíc místo HOCl použili kovové ionty.

Jako zdroj monomolové fotonové emise jsou i lipidové ROOH. Rozklad lipidových ROOH s přidáním kovových iontů, hydroxynitritu, HOCL nebo cytochromu c vzniká $^1\text{O}_2$ (Miyamoto a kol., 2014). Lipidové ROOH studuje také (Miyamoto a kol., 2007), kde pomocí Russellova mechanismu vzniká $^1\text{O}_2$.

2.3 Antioxidanty

Antioxidanty omezují aktivitu volných radikálů, které se v organismu nachází. Tím, že zabraňují oxidativnímu poškození. Antioxidanty obsahují navíc jeden volný elektron, který předají volnému radikálu, aby si volný radikál nevzal elektron z biomolekuly. Je dobře známo, že například červené víno je dobrý zdroj antioxidantů, protože obsahuje flavonoidy, fenoly a etanol. Ovšem při velkém množství spotřeby se tvoří reaktivní formy kyslíku. Z toho vyplývá, že antioxidanty v nepřiměřeném množství červeného vína mají vliv na tvorbu volných radikálů, které způsobují tkáňové poškození a tvorbu toxinů (Gutteridge a Halliwell, 2010).

Antioxidanty se dělí na dvě skupiny. První skupinou jsou neenzymatické antioxidanty. Jejich funkce jsou: vyjmutí katalytických kovových iontů a kyslíku nebo snížení koncentrace kyslíku v určitém místě, zabránění tvorbě volných radikálů a singletního kyslíku. Řadí se mezi ně např. vitamín C nebo vitamín E. Druhá skupina jsou antioxidanty enzymatické jako např. SOD. Tyto enzymy odtrhnou hlavní ROS (Gutteridge, 1995).

Jednou z dalších možností dělení antioxidantů je umístění v buňce. Dle tohoto dělení rozlišujeme intracelulární, extracelulární a membránové antioxidanty. Mezi intracelulární antioxidanty patří např. SOD a glutathion peroxidáza (Gutteridge, 1995). Enzym SOD zhasí $O_2^{\cdot -}$ a mění ho na H_2O_2 . Tento enzym ve složení s manganem je obsažen v matrixu mitochondrií. Ve složení s mědí a zinkem je součástí mezibuněčného prostoru mitochondrií (Halliwell, 2006). Glutathion peroxidáza mění vytvořený H_2O_2 na H_2O pomocí selenu. Tento proces nastává v cytosolu a mitochondriích (Halliwell, 1994).

Další umístění antioxidantů je v membránách – membránové antioxidanty. Jsou zde např. β -karoten a vitamín E (Gutteridge, 1995). Vitamín E (α -tokoferol) je důležitý antioxidant v našem těle. Zabraňuje tvorbu lipidové peroxidace tím, že sám stává tokoferolovým radikálem, ale méně reaktivním.

Poslední část tohoto dělení jsou extracelulární antioxidanty. Mezi ně patří např. bilirubin, kyselina močová nebo vitamín C (Gutteridge, 1995). Pomocí vitamínu C se navrátí tokoferolový radikál do svého původního stavu. Vitamín C (kyselina askorbová) také dobře vycytává volné radikály, ale pomáhá i vycistit vdechovaný vzduch od škodlivých látek v dýchacím traktu (Halliwell, 1994).

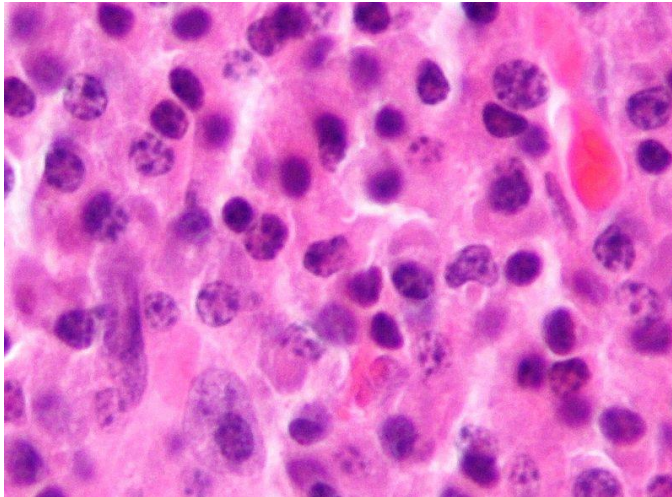
3. Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo porovnat a otestovat vliv různých druhů stresů na monomolovou a dimolovou emisi singletního kyslíku v lidských nádorových buňkách (U266) za použití dvou fotonásobičů.

4. Materiál a metody

4.1 Buněčná kultura U266

Buněčná kultura U266 reprezentuje lidský mnohočetný myelom, odebraný z periferní krve 53–letého muže v roce 1968. Mnohočetný myelom nebo také Kahlerova nemoc je nádorové onemocnění plazmocytů – bílých krvinek, které tvoří v těle protilátky. Plazmocyty se krví dostanou do kostní dřeně, kde se rozmnožují a narušují tvorbu ostatních buněk. Mnohočetný myelom způsobuje odvápnování postižených kostí, hlavně páteře, pánve, žeber a lebky. Postižený trpí bolestmi těchto kostí, které se mohou zlomit i při banálních úrazech. Může se usazovat i v ledvinách a narušovat jejich funkci. Buněčná kultura U266 byla přechovávána v médiu RPMI 1640 v inkubátoru při teplotě 37°C.



Obr. 8: Mnohočetný myelom (převzato z Žárská, 2013).

4.2 Měření s PMT

K měření ve viditelném spektru byl použit fotonásobič od firmy Hamamatsu Photonics, (K.K.; Iwata city, Japan) s rozsahem od 185 nm do 730 nm a hranový filtr s dlouhou hranou propustnosti od 600 nm. Pro měření v infračerveném spektru jsme použili fotonásobič firmy Hamamatsu Photonics, (K.K.; Iwata city, Japan) s rozsahem od 940 nm do 1400 nm. Měření jsme prováděli v místnosti, která byla vymalována celá do černa, abychom vytvořili ideální podmínky pro měření vzorků. Ve vedlejší místnosti je umístěn počítač pro zpracování dat. Vzorky jsme měřili při pokojové teplotě.

4.2.1 Viditelné PMT s filtrem

Použili jsme fotonásobič s filtrem propustným od 600 nm. Fotonásobič jsme chladili na -30°C při napětí -960 V . Měřené vzorky měly objem 5 ml a dávali jsme je do Petriho misky o průměru 5,5cm. K suspenzi buněk U266 o koncentraci 500 000 buněk na 1ml jsme vždy přidávali 250 μl dané určité chemikálie. Již nachystané vzorky jsme dali 2 cm pod fotonásobič a filtr.

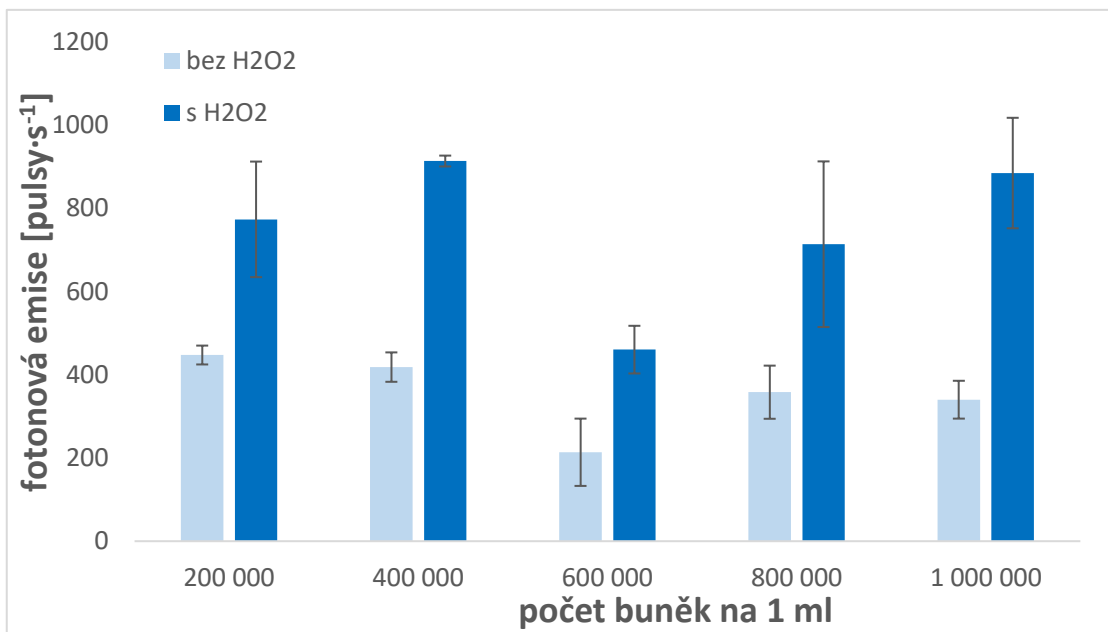
4.2.2 Infračervené PMT

Při měření s infračerveným fotonásobičem jsme napětí nastavili na -800 mV a použili kyvety o objemu 3 ml. K suspenzi buněk U266 o koncentraci 500 000 buněk na 1ml jsme vždy přidávali 150 μl dané určité chemikálie. Kyvetu s měřeným vzorkem jsme dali do stojánku 1cm před fotonásobič.

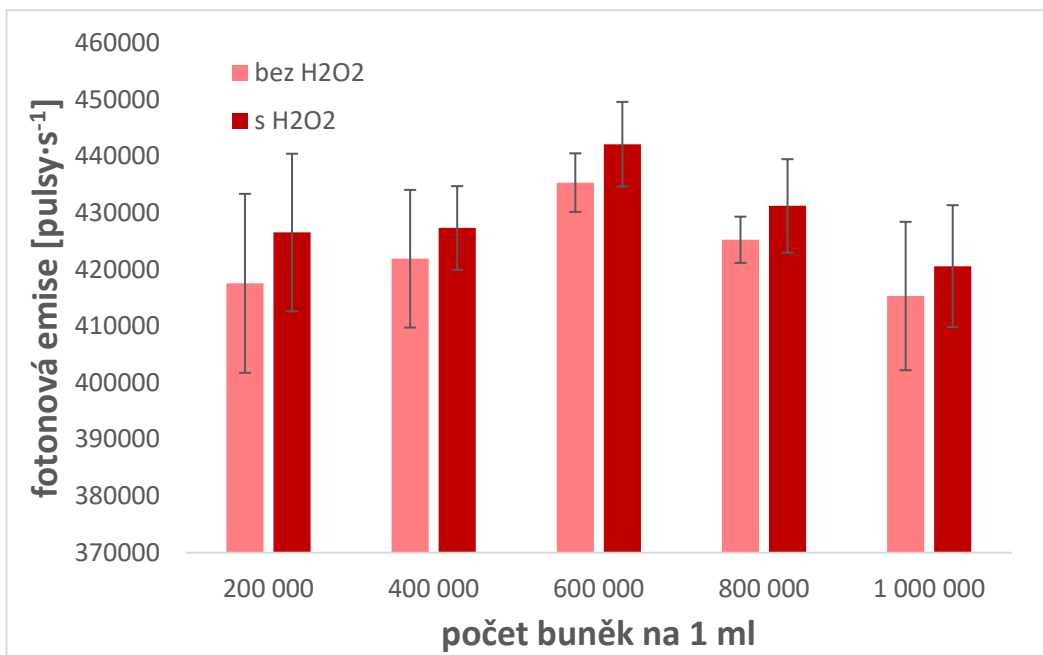
5. Výsledky

5.1 Koncentrační řada suspenze buněk U266

Měřili jsme koncentrační řadu buněk na PMT pro viditelnou (VIS) a infračervenou (IČ) oblast spektra. Připravili jsme si buňky o různých koncentracích počínaje 200 000 buněk na 1 ml. Nejvyšší koncentraci buněk jsme měli 1 000 000 na 1 ml. Na začátku měření jsme vždy k buňkám přidali 20mM FeSO₄. Následně jsme buňky vložili pod PMT a snímali spontánní UPE. Poté jsme přidali 100mM H₂O₂. Měřili jsme indukovanou UPE. Na Obr. 4 vidíme koncentrační řadu buněk měřenou na PMT pro VIS a na Obr. 5 koncentrační řadu měřenou na PMT pro IČ. Jak jde z těchto obrázků vidět, není zde žádná korelace UPE a počtem buněk.



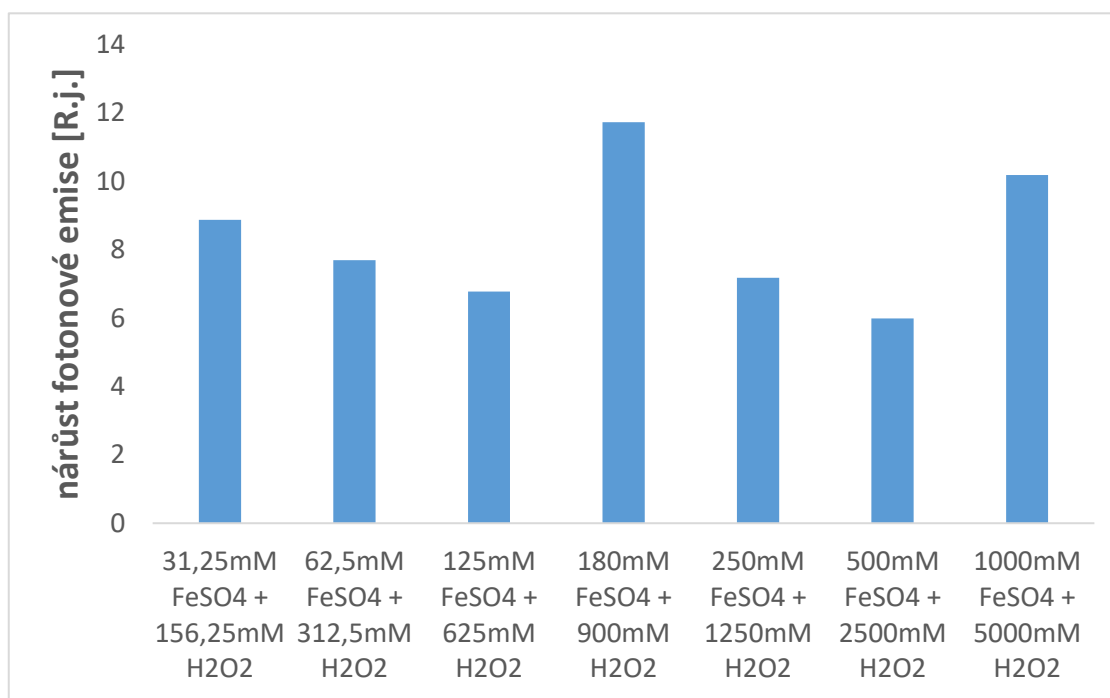
Obr. 9: Porovnání koncentrační řady buněk s 20mM FeSO₄ před přidáním a po přidání H₂O₂ na PMT pro viditelné spektrum s hranovým filtrem.



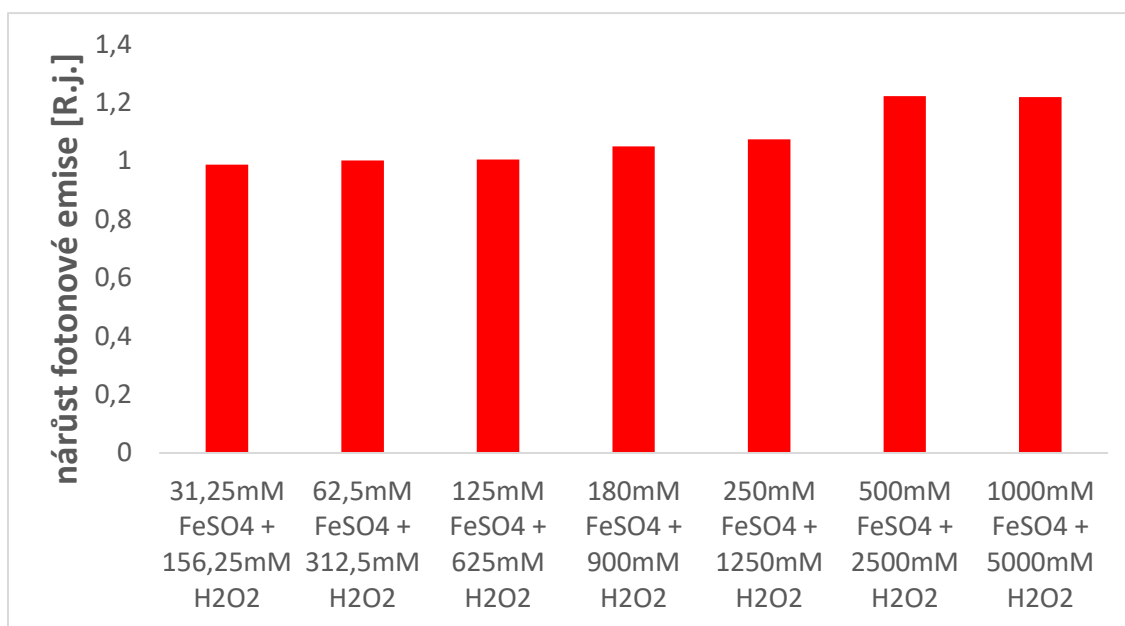
Obr. 10: Porovnání koncentrační řady buněk s 20mM FeSO₄ před přidáním a po přidání H₂O₂ na PMT pro infračervené spektrum.

5.2 Porovnání UPE ve VIS a IČ oblasti

Měřili jsme nárůst fotonové emise v porovnání s kontrolou na PMT pro VIS (Obr. 11) a IČ oblasti spektra (Obr. 12). V případě PMT pro VIS jsme přidali ještě hranový filtr s propustností od 600 nm, měřili jsme od červené oblasti spektra, která je charakteristická pro dimolovou fotonovou emisi. K buňkám jsme vždy přidali FeSO_4 o různých koncentracích. Následně jsme směs dali pod PMT a 5 minut snímali spontánní UPE. Poté jsme automatickou pipetou přidali H_2O_2 o různých koncentracích. Koncentrace FeSO_4 a H_2O_2 byly vždy v poměru 1:5. Začali jsme koncentrací 1000mM FeSO_4 a 5000mM H_2O_2 . Tyto vysoké koncentrace byly zvoleny z důvodu slabého signálu na IČ PMT. Koncentrace jsme snížili až na 31,25mM FeSO_4 a 156,25mM H_2O_2 . Rozdíl nárůstu fotonové emise u PMT pro VIS a pro IČ je zde veliký, jelikož jsou zde rozdíly mezi samotnými PMT. Také v případě PMT pro VIS jsou snímány $^3(\text{R}=\text{O})^*$, C^* a $^1\text{O}_2$. Zatímco u PMT pro IČ jen monomolová fotonová emise $^1\text{O}_2$.



Obr. 11: Porovnání PMT pro VIS spektrum. Jedná se o koncentrační řadu, kde se koncentrace FeSO_4 a H_2O_2 vždy dvakrát snižují.

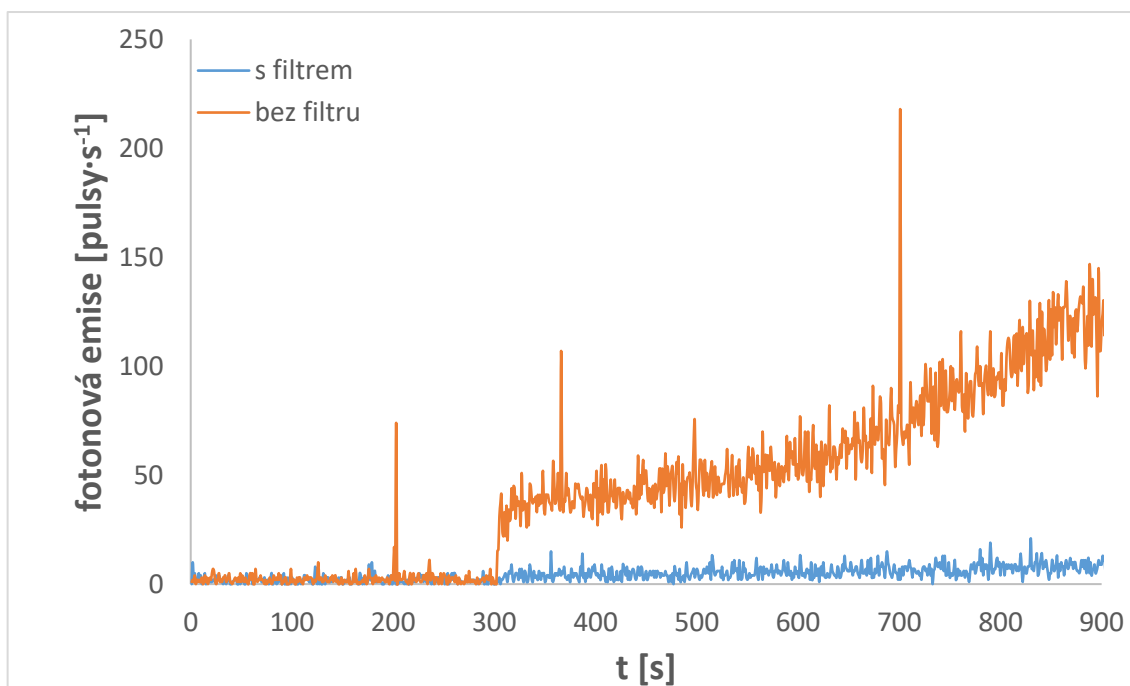


Obr. 12: Porovnání PMT pro IČ. Jedná se o koncentrační řadu, kde se koncentrace FeSO₄ a H₂O₂ vždy dvakrát sníží.

5.3 Měření na PMT pro VIS s hranovým filtrem a bez hranového filtru

5.3.1 Měření UPE indukovanou H_2O_2

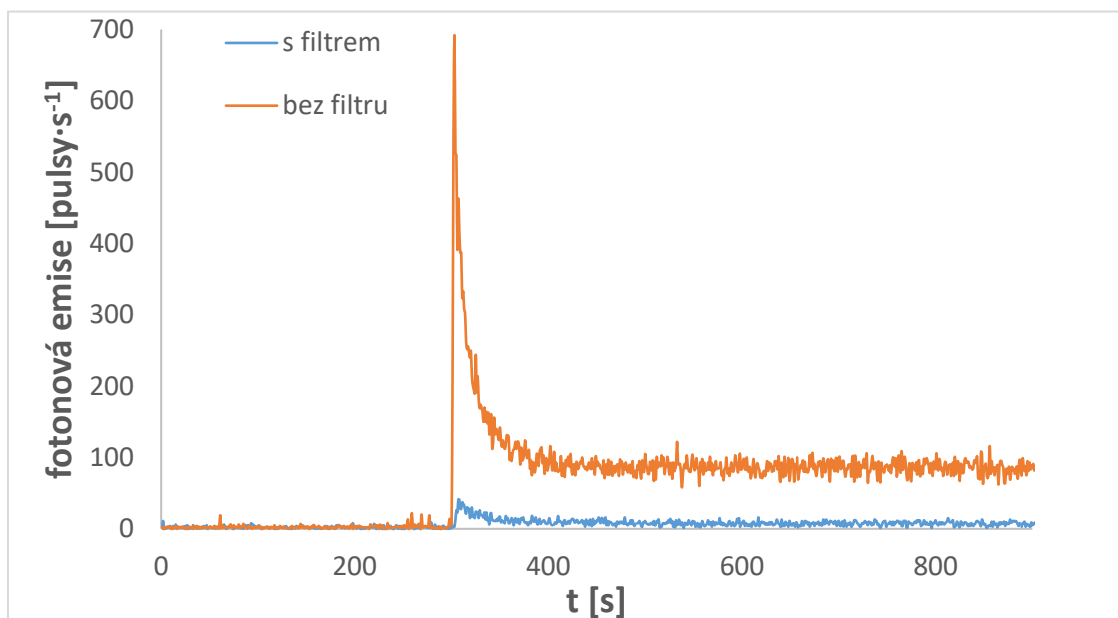
Dále jsme porovnávali zvýšení UPE po přidání H_2O_2 na PMT pro viditelnou oblast spektra s hranovým filtrem a bez hranového filtru. V případě s hranovým filtrem jsme snímali převážně dimolovou fotonovou emisi. Zatímco bez hranového filtru byla snímána celá viditelná oblast, takže i $^3(R=O)^*$, C^* a 1O_2 . V prvním pokusu jsme vložili samotné buňky pod PMT a měřili je 5 minut. Poté jsme přidali 100mM H_2O_2 (Obr. 13).



Obr. 13: Porovnání zvýšení UPE u PMT pro VIS bez použití hranového filtru a s použitím hranového filtru. Po 5 minutách byl k buňkám přidán 100mM H_2O_2 a vyvolal indukovanou UPE.

5.3.2 Měření UPE indukované HO[·]

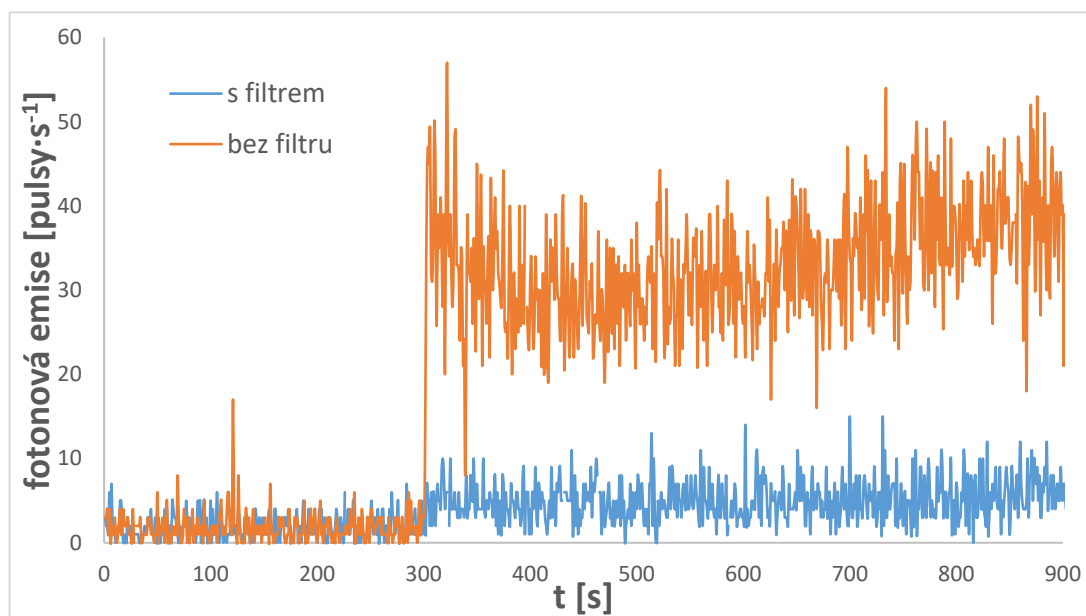
V druhém pokusu jsme na začátku měření přidali k buňkám 20mM FeSO₄. Po 5 minutách měření jsme přidali 100mM H₂O₂ (Obr. 14), který současně s FeSO₄ vede ke tvorbě HO[·] pomocí Fentonovy reakce. Z HO[·] se převážně tvoří ³(R=O)*, které vyzařují v celé viditelné oblasti spektra.



Obr. 14: Porovnání PMT pro viditelnou oblast spektra bez použití hranového filtru a s použitím hranového filtru. Po 5 minutách byl k buňkám s 20mM FeSO₄ přidán 100mM H₂O₂. Jde vidět prudký nárůst fotonové emise.

5.3.3 Měření UPE indukovanou $^1\text{O}_2$

V posledním pokusu srovnání navýšení UPE ve VIS a červené oblasti spektra jsme buňky smíchali s 100mM MoO_3 . Měřili jsme 5 minut a přidali 100mM H_2O_2 (Obr. 15), který reaguje s MoO_3 za vzniku $^1\text{O}_2$.

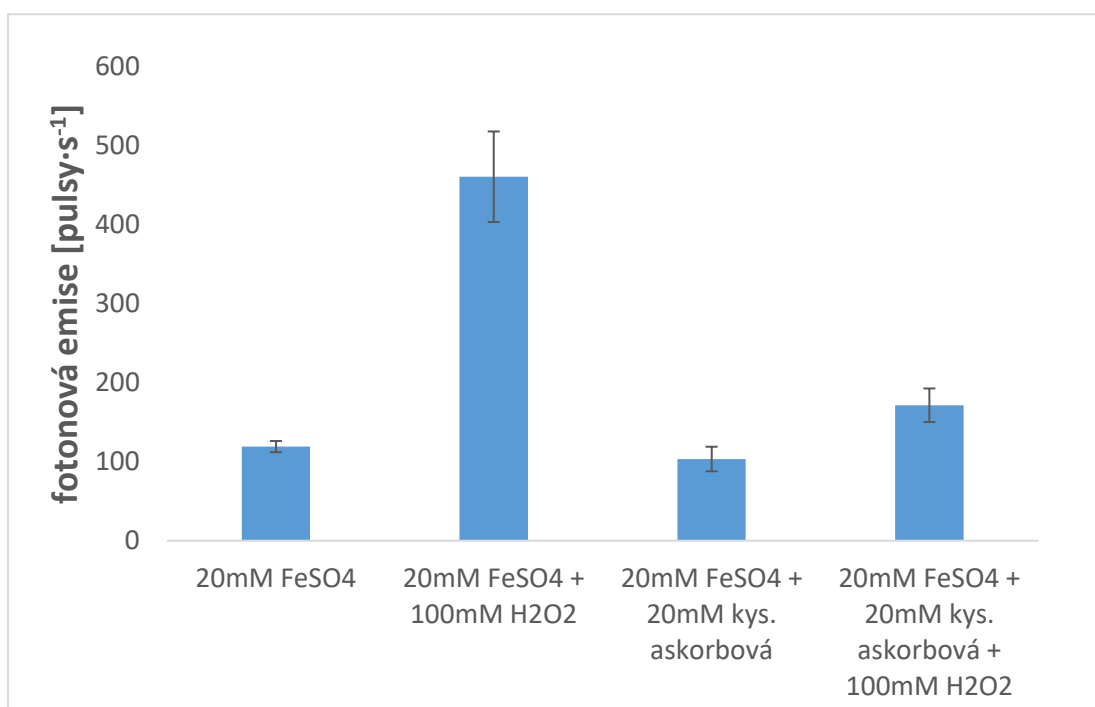


Obr. 15: Porovnání PMT pro viditelnou oblast spektra bez použití hranového filtru a s použitím hranového filtru. Po 5 minutách byl k buňkám s 100mM MoO_3 přidán 100mM H_2O_2 . Jde vidět prudký nárůst fotonové emise.

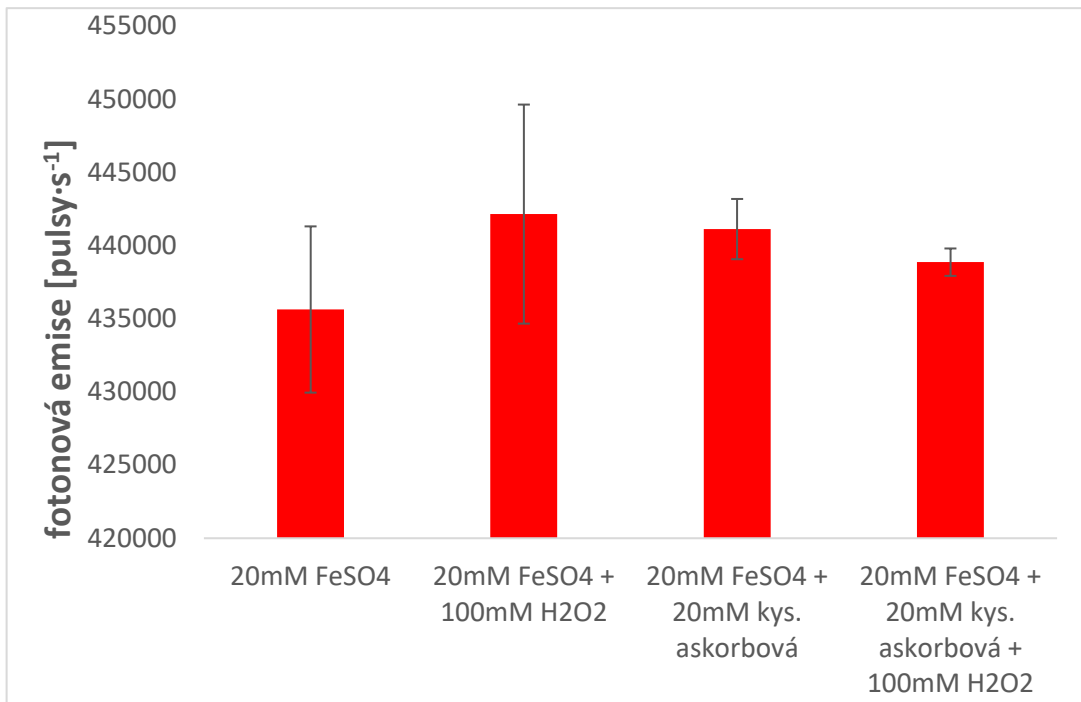
5.1 Vliv antioxidantů na UPE indukovanou H₂O₂

5.4.1. Kyselina askorbová

Při měření s antioxidanty jsme také použili PMT pro VIS a IČ. V měření PMT pro VIS a hranovým filtrem (Obr. 16) a PMT pro IČ (Obr. 17) jsme na začátku měření buňky smíchali s 20mM FeSO₄, vložili pod PMT a měřili spontánní UPE. Následně jsme přidali 20mM kyseliny askorbové. Po dalších 5 minutách měření jsme přidali 100mM H₂O₂. Sloupce v následujících grafech jsou součty 100 hodnot. Pro srovnání jsme zde vložili sloupec s měřením bez kyseliny askorbové, ale s H₂O₂.



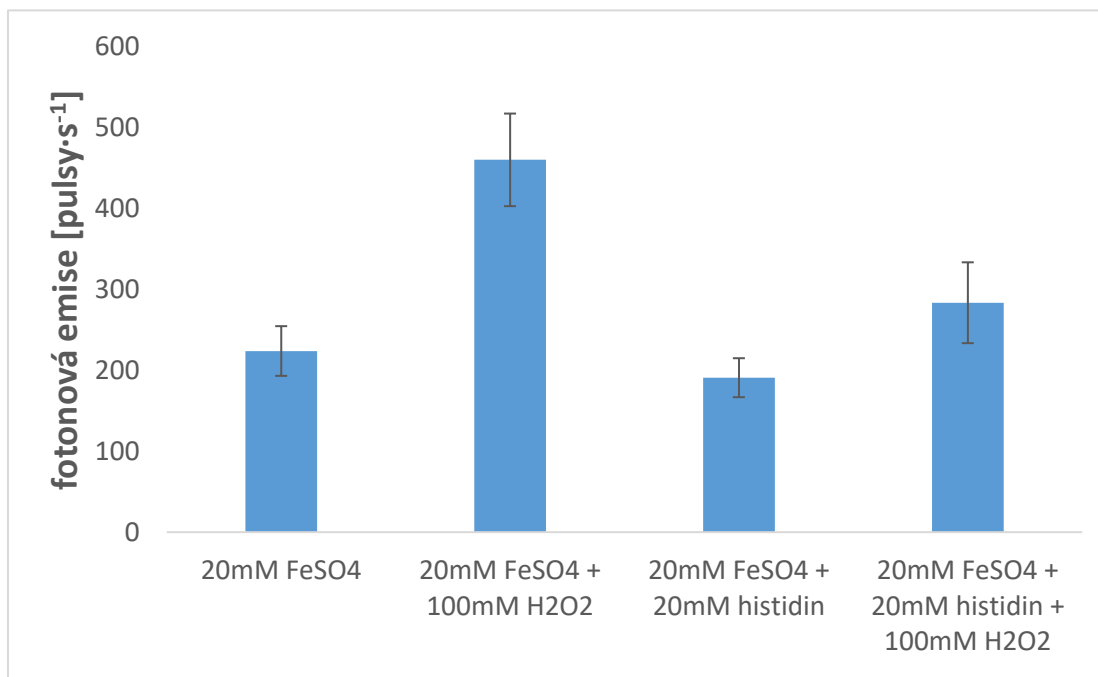
Obr. 16: Na začátku měření byl k buňkám přidán 20mM FeSO₄. Po 5 minutách měření byla k buňkám přidána 20mM kyselina askorbová. Po dalších 5 minutách byl přidán 100mM H₂O₂. Tento experimentu se prováděl na PMT pro viditelnou oblast spektra s hranovým filtrem.



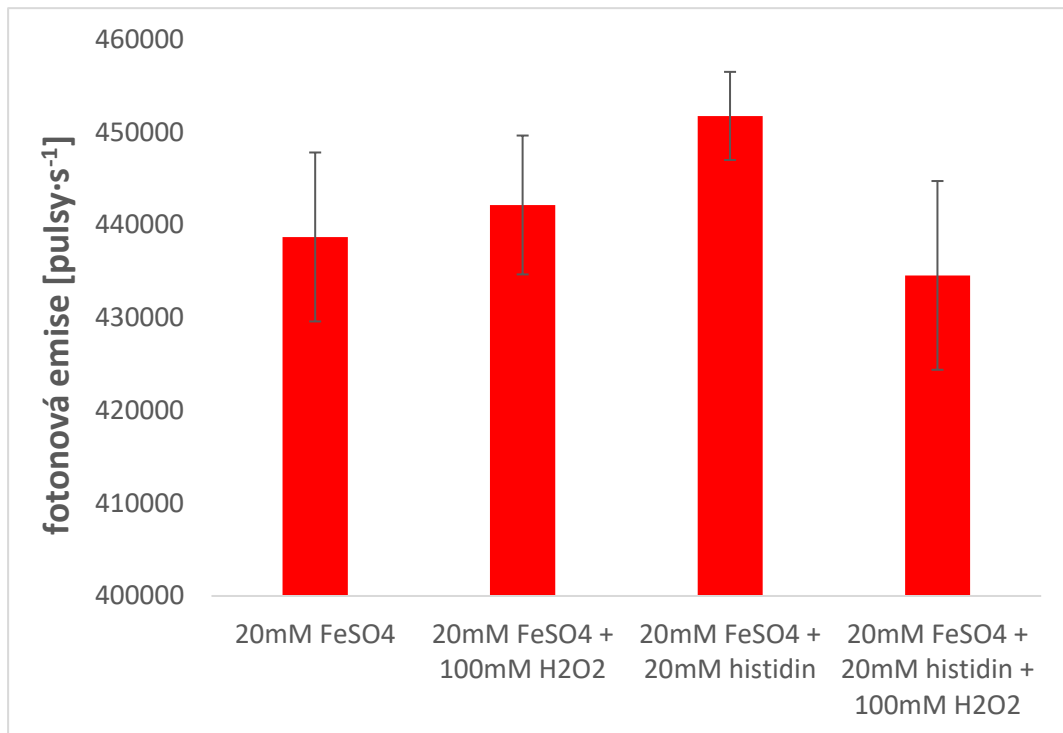
Obr. 17: Na začátku měření byl k buňkám přidán 20mM FeSO₄. Po 5 minutách měření byla k buňkám přidána 20mM kyselina askorbová. Po dalších 5 minutách byl přidán 100mM H₂O₂. Tento experimentu se prováděl na PMT pro infračervenou oblast spektra.

5.4.2 Histidin

Jako další antioxidant jsme použili histidin, což je aminokyselina obsažená v proteinech. Postup měření zůstává stejný jako v případě kyseliny askorbové. Měření s PMT pro VIS je vidět na (Obr. 18) a PMT pro IČ na (Obr. 19).



Obr. 18: Na začátku měření byl k buňkám přidán 20mM FeSO₄. Po 5 minutách měření byl k buňkám přidán 20mM histidin. Po dalších 5 minutách byl přidán 100mM H₂O₂. Tento experimentu se prováděl na PMT pro viditelnou oblast spektra s hranovým filtrem.



Obr. 19: Na začátku měření byl k buňkám přidán 20mM FeSO₄. Po 5 minutách měření byl k buňkám přidán 20mM histidin. Po dalších 5 minutách byl přidán 100mM H₂O₂. Tento experimentu se prováděl na PMT pro infračervenou oblast spektra.

6. Diskuse

Cílem mé bakalářské práce bylo porovnání vlivu různých exogenních ROS na monomolovou a dimolovou emisi singletního kyslíku ze suspenze buněk U266. Použili jsme k tomu dva PMT.

Měřili jsme koncentrační řadu buněk od 200 000 buněk na 1ml po 1 000 000 buněk na 1ml. Chtěli jsme zjistit, jestli to má nějaký vliv na UPE. Jak jde vidět v Obr. 4 a Obr. 5, není zde žádná korelace mezi nárůstem UPE a počtem buněk. V tom případě jsme si pro všechna měření zvolili koncentraci 500 000 buněk na 1ml.

Na Obr. 11 vidíme měření koncentrační řady FeSO_4 a H_2O_2 v poměru vždy 1:5 na PMT pro VIS s hranovým filtrem. Na Obr. 12 je také koncentrační řada FeSO_4 a H_2O_2 , ale pro PMT pro IČ. Tímto měřením jsme si porovnali nárůst dimolové a monomolové fotonové emise v porovnání s kontrolou. V případě dimolové emise byl nárůst signálu přibližně 8x, zatímco u monomolové fotonové emise jsme detekovali pouze nárůst 2x. Rozdíl nárůstu fotonové emise ve viditelné a infračervené oblasti může být způsoben několika různými faktory. Důležitou roli zde hraje kvantová účinnost PMT, kde obecně platí, že s rostoucí vlnovou délkou klesá kvantová účinnost. Další faktory zde mohou být velikost fotokatody a velikost snímané plochy vzorku. U PMT pro VIS jsme použili Petriho misky o průměru 5,5cm a u PMT pro IČ kyvety o velikosti 1x1x4cm. Při měření dimolové fotonové emise nebyl snímán jen $^1\text{O}_2$, ale i některé C^* . Stejně srovnání se dá najít i v práci (Prado a kol., 2009), kde použili 5-HPMU a Ce. Nárůst emise v infračervené oblasti spektra byl opět nižší, v jejich případě přibližně 30x.

Porovnávali jsme emisi ze suspenze buněk U266 pomocí PMT pro viditelnou oblast spektra za použití hranového filtru a bez něho. V prvním pokusu jsme k samotným buňkám přidali H_2O_2 . Po jeho přidání nastává zvýšení UPE. Peroxid vodíku si v buňce najde endogenní železo a reaguje s ním přes Fentonovu reakci za vzniku HO^\cdot . Ten se dále účastní řetězových reakcí vedoucích k tvorbě $^3(\text{R}=\text{O})^*$, C^* a $^1\text{O}_2$. Mnoho dalších autorů měřilo s biologickými ROOH. (Cadenas a kol., 1980) přidávali H_2O_2 do plic potkanů a (Rác a kol., 2015) k buněčné kultuře U266. Po přidání H_2O_2 se UPE zvýšila, stejně jako v našem případě. Autoři (Agatsuma a kol., 1992) také měřili UPE za přidání H_2O_2 k plasmě. V rozsahu 400 – 600 nm činila UPE přibližně 36% detekovaných částic, ale od 600 nm do 750 nm až 64%. PMT pro viditelnou oblast spektra bez hranového filtru snímá $^3(\text{R}=\text{O})^*$ (350 – 550 nm), C^* (550 – 750 nm) a $^1\text{O}_2$ (634, 703 a 1270 nm). Zatímco s

hranovým filtrem pouze některé C^* a 1O_2 . V tom případě H_2O_2 vyvolal ve větším množství dimolovou fotonovou emisi 1O_2 než $^3(R=O)^*$. V druhém pokusu jsme na začátku měření přidali k buňkám $FeSO_4$ a poté H_2O_2 . Tím, že jsme k buňkám přidali exogenní $FeSO_4$, tak H_2O_2 začne ihned reagovat s Fe a nemusí ho tzv. hledat v buňce. Měření s vyvoláním Fentonovy reakce pomocí přidání Fe dělali (Agatsuma a kol., 1992). Ke krevní plasmě přidali $FeSO_4$ a následně H_2O_2 . Měřili ve spektrálním rozsahu od 400 nm do 750 nm, tedy ve viditelné oblasti spektra. Nejvyšší UPE měli při 430 nm. V oblasti 400 nm – 600 nm bylo přibližně 78% detekovaných částic, to odpovídá tvorbě $^3(R=O)^*$. Od 600 nm do 750 nm bylo snímáno zbylých 22% částic. Tyto částice pravděpodobně odpovídají dimolové fotonové emisi 1O_2 a několika C^* . V porovnání s našimi výsledky tento poměr hodnot odpovídá. Na Obr. 14 jde vidět prudký nárůst UPE. V třetím pokusu jsme na začátku měření přidali k buňkám MoO_3 . Oxid molybdenový reaguje s H_2O_2 za vzniku nezářivého 1O_2 , který přes Russellův mechanismus tvoří zářivé 1O_2 .

Dále jsme zkoumali účinnost antioxidantů. Měřili jsme s kyselinou askorbovou a histidinem. Antioxidanty, jak je známo, zabraňují oxidaci molekul. Po jejich přidání by se neměla UPE zvýšit. Měření účinnosti kyseliny askorbové a histidinu jsme si ověřili přidáním sloupce s naměřenými hodnotami pro $FeSO_4$ a H_2O_2 . U PMT pro VIS je účinek antioxidantů dobře znát. Ultra slabá fotonová emise je přibližně dva a půl krát vyšší. Na rozdíl od PMT pro IČ není rozdíl detekované UPE příliš velký. Histidin měřili i (Rác a kol., 2015), kde se jim UPE po přidání histidinu nezměnila.

7. Závěr

V této bakalářské práci jsme měli porovnat vliv různých druhů stresů na monomolovou a dimolovou fotonovou emisi $^1\text{O}_2$. Měřili jsme na PMT pro VIS a IČ oblast spektra a použili jsme suspenzi buněk U266. Zkoumali jsme nárůst UPE indukovanou různými ROS, chemickým abiotickým stresem.

Porovnali jsme UPE u koncentrační řady buněk, kde jsme zjistili, že není žádná korelace mezi UPE a počtem buněk. Pro všechna další měření jsme si vybrali koncentraci 500 000 buněk na 1 ml.

Měřili jsme koncentrační řadu FeSO_4 a H_2O_2 , kde byl poměr chemikálií vždy 1:5. Při dalším měření jsme koncentraci vždy 2x snížili. Tímto jsme porovnali UPE dimolové a monomolové fotonové emise. Z dat vyplývá, že UPE u monomolové fotonové emise byla asi 9x nižší než u dimolové fotonové emise. Může to být způsobené tím, že v červené oblasti spektra vyzařují i některé C^* .

Při měření na PMT pro VIS jsme pravděpodobně detekovali $^3(\text{R}=\text{O})^* \text{C}^*$ a $^1\text{O}_2$. V červené oblasti spektra to mohly být některé C^* a $^1\text{O}_2$ vyzářené v podobě dimolové fotonové emise. Porovnávali jsme UPE právě těchto spektrálních oblastí. K buněčné suspenzi jsme přidali H_2O_2 , který pomocí Russellova mechanismu tvoří $^1\text{O}_2$. Zatímco UPE ve VIS jsme detekovali cca $40 \text{ pulsů} \cdot \text{s}^{-1}$, v červené oblasti pouze necelých 10 $\text{pulsů} \cdot \text{s}^{-1}$. V druhém pokusu jsme k buněčné kultuře U266 přidali HO^\cdot . Ve VIS oblasti jsme zaznamenali prudký nárůst UPE, který sahal až k $700 \text{ pulsů} \cdot \text{s}^{-1}$, na rozdíl od červené oblasti, kde jsme detekovali jen cca $40 \text{ pulsů} \cdot \text{s}^{-1}$. Nárůst UPE jsme také viděli při přidání chemického zdroje $^1\text{O}_2$.

Zkoumali jsme také vliv antioxidantů na indukovanou UPE, která by se měla po přidání snížit. Použili jsme kyselinu askorbovou (vitamín C) a histidin. Měření jsme opět prováděli jak na PMT pro VIS tak na PMT pro IČ. V případě PMT pro VIS byl signifikantní rozdíl v UPE po přidání antioxidantů. Při použití vitamínu C byla zaznamenána 3x menší UPE. U histidinu byla zaznamenána 1,5x menší UPE. Snížení UPE v IČ oblasti nebylo zdaleka tak výrazné.

8. Seznam literatury

Adam W., Kazakov D. V., Kazakov V, P. (2005) Singlet-oxygen chemiluminescence in peroxide reactions. *Chem. Rev* 105, 3371 – 3387

Agatsuma S., Nagoshi T., Kobayashi M., Usa M., Watanabe H., Sekino H., Inaba H. (1992) Hydroxyl radical – induced characteristic chemiluminescent spektra from plasma of hemodialysis patients. *Clin. Chem.* 38, 48 – 55

Cadenas E., Arad I. D., Boveris A., Fisher A. B., Chance B. (1979) Partial spectral analysis of the hydroperoxide – induced chemiluminiscence of the perfused lung. *Febs. Lett.* 111, 413 – 418

Gutteridge J. M. C. (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41, 1819 – 1828

Gutteridge J. M. C., Halliwell B. (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 393, 561 – 564

Halliwell B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721 – 724

Khan A. U., Kasha M. (1963) Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution. *J. Chem. Phys.* 39, 2105 – &

Miyamoto S., Martinez G. R., Medeiros M. H. G., Di Mascio P. (2014) Singlet molecular oxygen generated by biological hydroperoxides. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 139, 24 – 33

Miyamoto S., Martinez G. R., Rettori D., Augusto O., Medeiros M. H. G., Di Mascio P. (2006) Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 293 – 298

Miyamoto S., Ronsein G. E., Prado F. M., Uemi M., Correa T. C., Toma I. N., Bertolucci A., Oliveira M. C., Motta F.D., Medeiros M.H., Di Mascio P. (2007) Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life* 59, 322-331

Nerudová M., Červinková K., Hašek J., Cifra M. (2015) Optical spectral analysis of ultra-weak photon emission from tissue culture and yeast cells. *Photonics, devices, and systems*, VI 9450

Pospíšil P., Prasad A., Rác M. (2014) Role of reactive oxygen species in ultra-weak photon emission in biological systems. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 139, 11-23

Prado F. M., Oliveira M. C. B., Miyamoto S., Martinez G. R., Medeiros M. H. G., Ronsein G. E., Di Mascio P. (2009) Thymine hydroperoxide as a potential source of singlet molecular oxygen in DNA. *Free Radical Bio. Med.* 47, 401 – 409

Rác M. (2010) Ultra-weak photon emission from U937 cell culture. Diplomová práce, UP Olomouc

Rác M., Sedlářová M., Pospíšil P. (2015) The formation of electronically excited species in the human multiple myeloma cell suspension. *Sci. Rep.* 5, 1 – 8

Seliger H. H. (1960) A photoelectric method for the measurement of spectra of light sources of rapidly varying intensities. *Anal. Biochem* 1, 60 – 65

Žárská L. (2013) Ultra slabá fotonová emise nádorových buněk. Bakalářská práce, UP Olomouc