

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Chemiluminiscenční excitace fotosenzibilizátorů

Chemiluminescent excitation of photosensitizers

Vypracoval:

Martin Drong

Studijní obor:

Ekochemie

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Martina Bancířová, Dr.

Děkuji vedoucí bakalářské práce, Mgr. Martině Bancířové, Dr., za ochotu, laskavou pomoc a za čas, který mi během experimentální i teoretické části práce věnovala.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Marty Banciřové, Dr., za použití literatury uvedené v seznamu v závěru práce.

V Olomouci dne 12.5.2011

.....

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Martin Drong

Název práce: Chemiluminiscenční excitace fotosenzibilizátorů

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra fyzikální chemie

Vedoucí práce: Mgr. Martina Bancířová, Dr.

Rok obhajoby práce: 2011

Abstrakt: Fotodynamický jev vzniká excitací fotosenzibilizátorů světelným zářením ve viditelné oblasti za přítomnosti kyslíku. Excitovaný fotosenzibilizátor předá svou energii kyslíku, který pak může přejít do několika reaktivních forem - reaktivní formy kyslíku (ROS). Při fotodynamickém jevu se vyprodukuje takové množství ROS, že dochází k destrukci mnohých bílkovin, lipidových membrán, DNA a celých buněčných struktur. Uplatnění tento jev našel v medicíně k cílenému ničení tumorů i k léčbě jiných nemocí. V současnosti je nejčastěji v klinické praxi používána excitace fotosenzibilizátorů lasery či jinými externími zdroji. Tato práce studuje některé možnosti chemiluminiscenční excitace fotosenzibilizátorů. Použití chemiluminiscence jako zdroje světelného záření má řadu výhod, jako je třeba zavedení reakčního systému na místo napadené tkáně několik centimetrů pod pokožku, což bylo pro laserové zdroje a jiné externí zdroje světla překážkou. K excitaci vybraných fotosenzibilizátorů v této práci byl použit luminol a intenzita CL ovlivňována katalyzátory. Experimenty byly měřeny na luminometru Berthold Sirius 2C.

Klíčová slova: fotodynamický jev, fotosenzibilizátory, reaktivní formy kyslíku, kyslík, chemiluminiscence, fotodynamická terapie, excitace

Počet stran: 45

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's name : Martin Drong

Title: Chemiluminescent excitation of photosensitizers

Type of thesis: Bachelor

Department: Department Of Physical Chemistry

Supervisor: Mgr. Martina Bancířová, Dr.

The year of presentation: 2011

Abstract: Photodynamic effect is excitation of the photosensitizer by visible light in the presence of oxygen. Excited state of the photosensitizer transfers its energy to oxygen while the reactive oxygen species (ROS) are formed. Photodynamic effect produces enormous concentration of ROS which can lead to destruction of protein, lipid membranes, DNA and cellular structures. This effect is used as a tumor and diseases treatment modality. Photosensitizers are generally excited by lasers or other similar external light sources. This work studies some possibilities of chemiluminescent excitation of photosensitizers. Chemiluminescence is chemical reaction when certain compound acquire excess energy which subsequently emit as a visible light. Chemiluminescence as a light source has a lot of advantages like availability to treat tumors located several centimeters under the skin surface what was not enabled using laser and other external light sources. In this work were used chemiexcitation systems of luminol that excited selected photosensitizers. Combination of reaction systems were subsequently measured using Berthold Sirius 2C luminometer.

Keywords: Photodynamic effect, photosensitizers, reactive oxygen species, oxygen, chemiluminescence, photodynamic therapy, excitation

Number of pages: 45

Language: Czech

OBSAH	
ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČÁST	
1. Kyslík	9
2. Reaktivní formy kyslíku z pohledu živého organismu	10
2.1. Radikálové reaktivní formy kyslíku	11
2.1.1. Superoxidový aniont radikál	11
2.1.2. Hydroxylový radikál	13
2.2. Reaktivní formy kyslíku neradikálové povahy	14
2.2.1. Peroxid vodíku	14
2.2.2. Singletní kyslík	14
3. Fotodynamický jev	16
3.1. Fotodynamická terapie	18
3.2. Fotosenzibilizátory	19
4. Chemiluminiscence	20
4.1. Mechanismus chemiluminiscenčních reakcí	20
4.2. Luminofory	23
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
5. Cíl práce	24
6. Materiál a metody	25
6.1. Chemikálie	25
6.2. Přístrojové vybavení	26
6.3. Pracovní postupy	27
7. Výsledky a diskuze	31
8. Závěr	41
9. Summary	42
SEZNAM LITERATURY	43

Seznam zkratek

BL	bioluminiscence
CL	chemiluminiscence
EY	eosin yellowish, žlutý eosin
HRP	horseradish peroxidase, křenová peroxidasa
MB	methylene blue, methylenová modř
P	fotosenzibilizátor
PACT	photodynamic antimicrobial chemotherapy
PBS	phosphate buffer saline, fosfátový pufr pH 7,4
RB	rose bengal, bengálská červeň
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutase, superoxiddismutasa VIII

1. Úvod

Luminiscence je samovolné světelné záření, které na sebe poutalo pozornost lidí odpradáva. Tento jev byl pozorován již před více než 2000 lety. Ve většině případů se jednalo o bioluminiscenci, čili luminiscenci pocházející ze živých organismů. Postupem času a vývojem zkoumání byla luminiscence rozdělena do několika kategorií podle zdroje, který jí způsobuje - například externí světelný zdroj, průchod elektrického proudu, tepelné záření a další. Tato práce je zaměřena na chemiluminiscenci. Chemiluminiscence je vyzáření nadbytku energie, kterou látka nazývaná luminofor získá chemickou reakcí, pomocí světla.

Pokud působí světlo jistých vlnových délek (nejčastěji ve viditelné oblasti) na fotosenzibilizátor v prostředí kyslíku, může nastat fotodynamický jev. Fotosenzibilizátorem je látka citlivá na světlo, jehož působením se fotosenzibilizátor excituje a svou energii předává kyslíku. Vznikají tak reaktivní formy kyslíku, které mají schopnost oxidovat nejrůznější molekuly včetně složitých biomolekul a mají za následek buněčnou smrt až zničení tkání. Fotodynamický jev našel uplatnění při fotodynamické terapii, která je již tradiční metodou léčby jak nádorových onemocnění (rakovina), tak dalších chorob. V této práci byla měřena luminiscence luminolu a chemiexcitace methylenové modří, žlutého eosinu a bengálské červeně.

1. Kyslík

Kyslík je nejrozšířenějším prvkem na Zemi. Nachází se v hydrosféře, litosféře, atmosféře a biosféře. V atmosféře se nachází ve formě dvouatomových a tříatomových molekul O_2 respektive O_3 . Obě formy jsou plynného skupenství, zkapalněný kyslík má světle modrou barvu. Jeho přítomnost je nezbytná pro existenci živých organismů [1].

Kyslík jako chemický prvek se nachází v VI. hlavní skupině periodické tabulky prvků, tzn. má 6 valenčních elektronů. Elektronová konfigurace je $1s^2$, $2s^2$, $2p^4$. Molekula dikyslíku - složka vzduchu, který dýcháme je řazena mezi volné radikály, protože má dva nepárové elektrony. Elektrony mají paralelní spin, každý elektron se nachází v jiném protivazebném orbitalu. Celkové spinové číslo molekuly je $S=1$ podle vztahu (1)

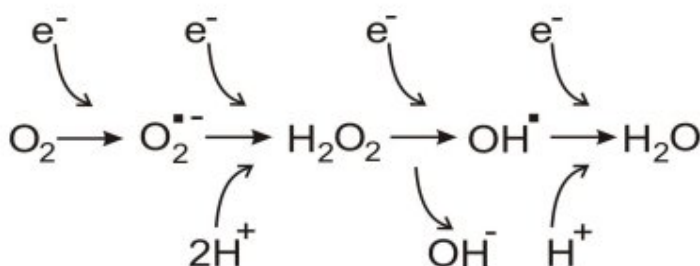
$$S = (m \cdot (+1/2) + n \cdot (+1/2)) \quad (1)$$

$+1/2$ značí spinová kvantová čísla, u obou znaménko $+$, protože se jedná o spiny stejné orientace. Multiplicita $(2S + 1) = 3$ - tzn. základní stav molekulárního kyslíku, který dýcháme je tripletní a je zodpovědný za to, že neshoříme. Konkrétně se jedná o pravidlo zachování spinu nebo také spinový zákaz, který říká, že spinově zakázané jsou všechny reakce, při nichž se mění celkový počet nepárových elektronů v systému. Podle termodynamiky mohou komplexní organické sloučeniny lidského těla ihned spalovat kyslík ze vzduchu. Avšak pokud by měl kyslík oxidovat molekulu přímo přijetím jejího elektronového páru, oba tyto elektrony by musely mít spiny opačné ke spinům nepárových elektronů v molekule kyslíku, tak aby se hodily do volných míst v orbitalech O_2 . Oxidace kyslíkem se nazývá hoření a kyslík samotný se přímo slučuje s většinou prvků za vzniku oxidů. Kyslík je přítomen v široké škále sloučenin mezi nimiž je nejznámější voda, peroxid vodíku či organické alkoholy. V laboratoři se kyslík připravuje tepelným rozkladem anorganických sloučenin následujícími reakcemi (2,3,4). [1, 2].

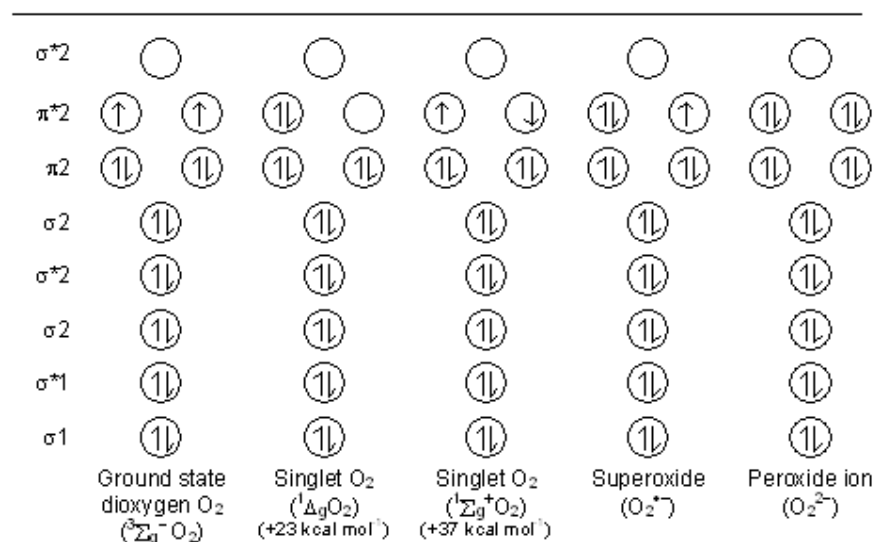


2. Reaktivní formy kyslíku z pohledu živého organismu

Reaktivní formy kyslíku (ROS) nás denně obklopují, nacházejí se v našem organismu, aby plnily některé důležité funkce. Mohou regulovat, urychlovat nebo zpomalovat mechanismy v živých organismech, mohou však také působit destruktivně. Člověk se jim brání díky enzymům a endogenním antioxidantům, existují však také další (vitaminy C, E, β -karoten, resveratrol, katechiny a chelátotvorné látky vázající přechodné kovy, aj.). Porušení rovnováhy mezi ROS a antioxidanty se nazývá oxidativní stres, který je příčinou mnoha nemocí [3]. Reaktivní formy kyslíku odvozujeme od reakce redukce kyslíku na vodu (Obr. 1). V dýchacím řetězci mitochondrií se kyslík účinkem cytochromoxidasy přemění přijetím čtyř elektronů a čtyř vodíkových protonů na dvě molekuly vody, pokud však dojde pouze k částečné redukci kyslíku (dostane méně elektronů), vznikají reaktivní formy kyslíku s názvy superoxidový aniont radikál, peroxid vodíku nebo hydroxylový radikál. Tyto se mohou vytvářet při všech reakcích přenosu elektronu na kyslík. Přibližně 1-3% kyslíku spotřebovaného organismem se následně přemění na reaktivní formy [4]. Reaktivní formy kyslíku dělíme na radikálové a neradikálové. Radikálové reaktivní formy pak můžeme definovat jako jakékoli formy schopné samostatné existence mající jeden nebo více nepárových elektronů [1]. Některé z reaktivních forem jsou zobrazeny na obr. 2 [5].



Obr. 1 Postupná redukce kyslíku na vodu



Obr.2 Příklady některých reaktivních forem kyslíku a jejich elektronové konfigurace

2.1. Radikálové reaktivní formy kyslíku

Radikály jsou reaktivní formy, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. Mezi jejich zástupce patří superoxidový aniont radikál O₂⁻, hydroxylový radikál OH[•], peroxyyl ROO[•], alkoxyyl, RO[•] a hydroperoxyyl, HO₂[•], oxid dusnatý NO[•]

2.1.1. Superoxidový aniont radikál

Přijetím jednoho elektronu kyslíkem se vytváří superoxidový aniont radikál, který má jeden nepárový elektron. Jeho protonizovaná forma se nazývá hydroperoxylový radikál HO₂[•]. Je silným oxidačním činidlem, ale může působit také redukčně za ztráty jednoho elektronu a vzniku molekulárního kyslíku. McCord a Fridovich objevili enzym, který se zdá být specifickým akceptorem elektronů superoxidového radikálu - superoxidodismutasa. To pak vedlo k předpokladu, že superoxidový radikál je hlavní faktor zodpovědný za toxicitu kyslíku a že superoxidodismutasa je důležitou antioxidační obranou [1, 6]. SOD

katalyzuje dismutaci $O_2^{\cdot-}$ za vzniku molekulárního kyslíku a peroxidu H_2O_2 , což zobrazuje rovnice (5).



Tato antioxidační role superoxidodismutasy je podporována širokou škálou důkazů včetně výsledků dosažených za použití technik moderní molekulární biologie. Superoxid se tvoří v těle několika cestami [1, 6].

Hlavním zdrojem $O_2^{\cdot-}$ je elektronový transportní řetězec v mitochondriích a endoplasmatickém retikulu. Některé elektrony z řetězce uniknou přímo z nosiče na kyslík, a protože kyslík přijímá elektrony postupně po jednom, vzniká superoxidový radikál. Těchto elektronů unikne méně než 5%, ale číslo roste při zvýšené koncentraci kyslíku. Toxicita nadbytku kyslíku tedy může být přičiněna zvýšenou produkcí superoxidového radikálu. Superoxidový radikál je produkován také fagocytujícími buňkami a hraje důležitou roli v mechanismu, který zabíjí nadbytečná množství bakterií [1, 2].

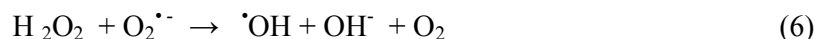
Nadměrná aktivita fagocytujících buněk může vést k ničení radikálů za přítomnosti NADPH oxidasového komplexu, který katalyzuje reakce vzniku superoxidového anionu. Z $O_2^{\cdot-}$ se pak tvoří další reaktivní formy, jako je peroxid vodíku a z něj se následně uvolňuje za působení dalšího enzymu kyselina chlorná, singletní kyslík a hydroxylový radikál, který napadá všechny biomolekuly včetně DNA. Při těchto reakcích stoupá spotřeba kyslíku ve fagocytující buňce a tomuto procesu říkáme oxidativní vzplanutí.

Důkazy podporující superoxidovou teorii o toxicitě kyslíku jsou značné, ale přesný mechanismus, kterým by údajná zvýšená produkce superoxidového radikálu při nadbytku kyslíku mohla vést k uplatnění toxických účinků, není kompletně znám. Superoxidový radikál je také schopen inaktivace NADH dehydrogenasového komplexu mitochondriálního elektronového transportu *in vitro*, ačkoli *in vivo* ještě demonstrována nebyla [1, 2]. Proto také počet cílů u savčích buněk, které by byly citlivé na superoxidový radikál je malý. Za určitých okolností je kontrolovaná produkce superoxidového radikálu užitečný proces, například ve dříve zmiňovaném mechanismu zabíjení fagocytů. Je prokázáno, že několik typů buněk jako fibroblasty, lymfocyty a vaskulární endotelové buňky produkují a uvolňují malá množství superoxidového radikálu

ve fyziologických reakcích. $O_2^{\bullet -}$ tak patří mezi tři hlavní reaktivní formy společně s peroxidem vodíku a hydroxylovým radikálem [4].

2.1.2. Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál vzniká při reakci železnatých iontů s peroxidem vodíku tzv. Fentonovou reakcí (6):



Hydroxylový radikál zřejmě není jediným ničivým radikálem, který se touto reakcí utváří, ačkoli jeho vznik je dobře popsán. Iniciujícím produktem je zřejmě další vysoce oxidující forma ferryl, železo-kyslíkový komplex, který se následně rozkládá a pak teprve vzniká hydroxylový radikál. S peroxidem také reagují měďnaté ionty, které formují hydroxylový radikál $\cdot OH$. Ten reaguje obrovskou rychlostí s téměř každou molekulou nacházející se v živém organismu, včetně DNA, membránových lipidů a uhlovodíků. Toxické působení na většinu, ne-li na všechny savčí buňky, se týká i poškození DNA. V závislosti na typu studované buňky mohou být některá nebo všechna z těchto poškození v DNA nebo její blízkosti zprostředkovaná reakcí peroxidu s železnatými nebo měďnatými ionty za vzniku hydroxylového radikálu. Cytotoxický účinek $\cdot OH$ spočívá v jeho schopnosti odtrhnout vodík z biomolekul, nebo v jeho adici na dvojné vazby. Primárním místem ataku jsou zejména aromatické kruhy aminokyselin. Další devastující účinek $\cdot OH$ je působení na membránové lipidy. Mnoho reaktivních forem, které vznikají kombinací superoxidového radikálu, peroxidu a železnatých nebo měďnatých iontů jsou schopné lipidové peroxidace [4].

2.2. Reaktivní formy kyslíku neradikálové povahy

Neradikálovými kyslíkovými formami, tedy molekulami bez volného nepárového elektronu, jsou peroxid vodíku H_2O_2 , kyselina chlorná HClO , ozon O_3 a singletní kyslík $^1\text{O}_2$

2.2.1. Peroxid vodíku

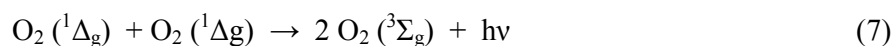
Peroxid vodíku vzniká dvouelektronovou redukcí kyslíku nebo samovolnou dismutací superoxidového aniontu. Peroxid vodíku je jeden z hlavních oxidantů v buňkách, tkáních a sekretech, ačkoli ne nejreaktivnější. Má mnohé biologické funkce, místní koncentrace musí být pozorně kontrolovány, pro umožnění správné funkce systémů, aby nedošlo k nechtěným poškozením. Kontrola hladiny peroxidu je komplexní proces, který zahrnuje syntézu jeho prekursoru – superoxidového radiálu. Superoxiddismutasa odstraňuje superoxidový radikál redukcí na peroxid vodíku, jak již bylo uvedeno výše. V těle se nachází také několik enzymů, které produkují peroxid vodíku. Peroxid může vystupovat jako oxidační činidlo. Na rozdíl od superoxidového radikálu může H_2O_2 dobře procházet buněčnými membránami. Peroxid vodíku není klasifikován jako radikál, protože nemá nepárové elektrony [7].

2.2.2. Singletní kyslík

Singletní kyslík se vyskytuje ve dvou formách excitovaných stavů $^1\Delta_g$ s nižší energií ($\lambda_{\text{max}} = 1268,7 \text{ nm}$) a $^1\Sigma_g$ s vyšší energií ($\lambda_{\text{max}} = 762,1 \text{ nm}$). $^1\Delta_g$ je látka diamagnetická, neboť dodáním excitační energie kyslíku v základním stavu dochází ke spárování valenčních elektronů. $^1\Sigma_g$ má dva nepárové elektrony opačného spinu v odlišných orbitalech [8].

Jejich doba života je v plynné fázi 3000 s u stavu $^1\Delta_g$ a asi 7 – 12 s u stavu $^1\Sigma_g$. Ve vodě asi 4 μs u stavu $^1\Delta_g$ $10^{-4} \mu\text{s}$ u stavu $^1\Sigma_g$. Doba života stavu $^1\Sigma_g$ ve vodném roztoku je tak krátká, že se předpokládá, že chemických reakcí se účastní pouze stav $^1\Delta_g$, který ihned vzniká ze stavu $^1\Sigma_g$. Při přechodu singletního kyslíku do základního stavu dochází k chemiluminiscenci, a to buď

chemiluminiscenci bimolekulární emisí (7) a nebo mononukleární emisí (8):



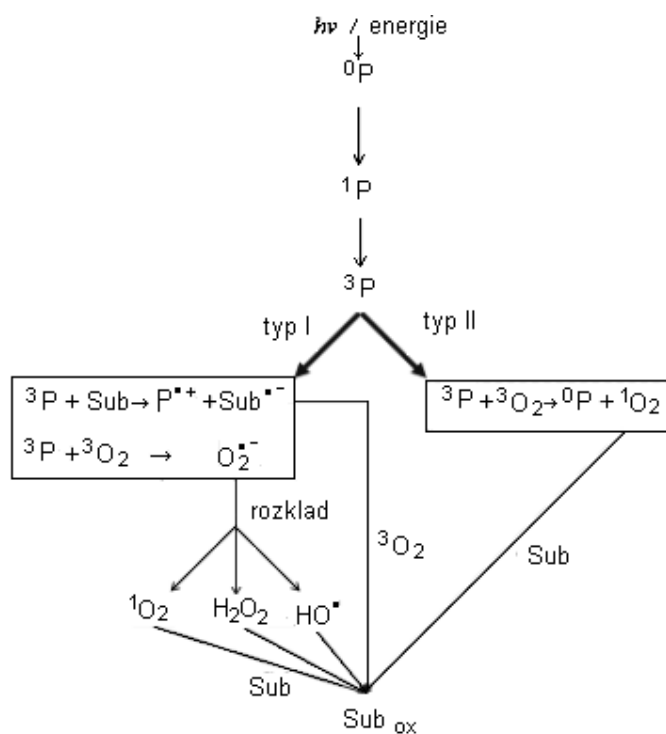
Jedná se o zakázané přechody, proto je doba života excitovaných stavů v plynné fázi, kde nedochází ke srážkám s dalšími molekulami, dlouhá. V roztocích je excitovaný kyslík díky srážkám s molekulami rozpouštědla mnohem více deaktivován nezářivou cestou [6]. Příkladem vzniku $^1\text{O}_2$ fyzikálním procesem je mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře. Chemickou cestou je např. klasická reakce chlornanu s peroxidem vodíku. V biologických systémech produkují $^1\text{O}_2$ některé peroxidasy. Mimořádný význam pro tvorbu $^1\text{O}_2$ mají fotosenzibilizované reakce, na něž se v naší práci soustředíme. Fotosenzibilizátor P (např. námi použitá methylenová modř, bengálská červec, eosin Y, atd.) může být excitována ultrafialovým, viditelným a nebo vysokoenergetickým zářením a pak předá svou energii kyslíku v základním stavu [9], rovnice (9) a (10):



Doba života excitovaného stavu fotosenzibilizátoru musí být dostatečně dlouhá, aby zhášení kyslíkem bylo hlavním deaktivacním procesem a uvolněná energie při zhášení fotosenzibilizátoru musí být dostatečná pro excitaci kyslíku. Fotosenzibilizátory s absorpčním maximem ve viditelné a blízké ultrafialové oblasti podporují vznik $^1\Sigma_g$ stavu kyslíku, zatímco barviva s absorpcí v dlouhovlnné oblasti poskytují převážně $^1\Delta_g$ stav. Senzibilizátory jsou účinné již při velmi nízkých koncentracích, protože jedna molekula senzibilizátoru může opakovaným přenosem energie produkovat mnoho molekul $^1\text{O}_2$ [2].

3. Fotodynamický jev

Role jednotlivých reaktivních forem v organismu byla popsána výše. K jejich cílenému vzniku dochází při fotodynamickém efektu, který probíhá reakcí světla a fotosenzibilizátoru za přítomnosti kyslíku. Děje se tak excitací fotosenzibilizátoru. Fotosenzibilizátor je excitován světlem a zpět do svého základního stavu se vrací dvěma možnými způsoby – mechanismy. Schéma tohoto jevu je znázorněno na obr. č.3 a dále je popsán.



Obr. č. 3 Fotosenzibilizovaná reakce

Jakmile fotosenzibilizátor 0P absorbuje energii nebo světlo, prochází excitovanými stavy 1P (singlet) a následně mezisystémovým křížením do nejnižšího tripletního 3P . Tento tripletní stav se následně může deaktivovat několika cestami, které si vzájemně konkurují. První z nich, typ I, je přenos

elektronu z ^3P na substrát s vhodnými oxidoredukčními vlastnostmi. Produkují se pak intermediáty fotosenzibilizátoru a substrátu radikálového typu ($\text{P}^{\bullet+}$ a $\text{Sub}^{\bullet-}$ na obr. 4), které mohou reagovat s dalšími přítomnými substráty nebo molekulami rozpouštědla a kyslíku. Reakcí radikálu fotosenzibilizátoru nebo substrátu s kyslíkem vznikají konečné oxidované produkty. Zvláštní případ nastává, pokud je akceptorem elektronu kyslík. Ten poskytuje superoxidový anion radikál $\text{O}_2^{\bullet-}$, který je schopen reagovat s většinou molekul v organismu, ale chová se pouze jako slabý antioxidant. Reaguje však s některými enzymy, které zvyšují hladinu železa a dochází tak k Fentonově reakci (6), což zvyšuje oxidativní stres a další poškození buněk. Ve vodném prostředí za vhodných podmínek navíc může superoxid přecházet v singletní kyslík, peroxid vodíku nebo hydroxylový radikál, což zvyšuje oxidativní účinek této reakce, reakce typu I. [10, 11, 12].

Mechanismus typu II je považován za hlavní cestu způsobující fotooxidativní poškození buňky. Vyznačuje se přenosem energie z ^3P na jakýkoliv substrát, jehož energie tripletního stavu leží na nižší hladině než tripletní stav reagujícího senzibilizátoru. Mnoho složek buněčné hmoty má však energii tripletního stavu relativně vysokou a není tudíž schopno ^3P zhaset. Jednou z výjimek je molekula kyslíku. Ta excitovaný tripletní stav fotosenzibilizátoru zhasí velmi účinně, čímž přechází do svého singletního stavu, jehož energetická hladina leží pouze o 94,1 kJ nad jejím základním tripletním stavem. Singletní kyslík $^1\text{O}_2$ vykazuje vysokou cytotoxicitu, která je způsobena jeho dlouhou dobou života (3-4 μs ve vodných prostředích a několik desítek mikrosekund v lipidech). Oxidačně reaguje zejména s nenasycenými biomolekulami a poskytuje tak jejich značně labilní peroxidy a hydroperoxidy. V obou mechanismech fotosenzibilizace dochází ke tvorbě elektrofilních částic, což činí elektronově bohaté biomolekuly přednostním centrem ataku. Reakce primárních ROS ($\text{O}_2^{\bullet-}$, HOO^{\bullet} , H_2O_2 , $^1\text{O}_2$) s biomolekulami vedou ke vzniku velkého počtu typů sekundárních radikálů způsobujících další cytotoxické poškození. Sekundární radikály skýtají pro buňku mnohem větší nebezpečí, neboť jsou iniciátory řetězových reakcí [11, 12].

3.1. Fotodynamická terapie

PDT fotodynamická terapie využívá fotosenzibilizátoru, který se akumuluje v tumoru a může být aktivován vhodným světelným zdrojem, obecně laserem (monochromatický zdroj). Lze říci, že léčba je limitována možností dostat světlo dovnitř například optickými vlákny endoskopicky. Další překážkou je hloubka penetrace, která je omezená optickými vlastnostmi tumorové tkáně, obecně bývá 2-5 mm. Dostat se blíže k objemnějším tumorům je také technickým problémem kvůli lokaci a rozměrům. [16] Proto i tyto externí světelné zdroje často vypadávají ze hry a je nutno řešit problém jinak. Dostáváme se tak ke světlu chemickému, chemiluminiscenci konkrétně.

Fotodynamická terapie je způsobem léčby lokalizovaných tumorů, např. rakovina na hlavě a krku, rakovina jícnu a maligní nádory na kůži. [17] Principem je vpravení fotosenzibilizátoru na pacientovo postižené místo a následné osvětlení viditelným světlem (nejčastěji dlouhovlnné červené světlo), což vede v přítomnosti kyslíku ke generaci jeho reaktivních cytotoxických forem, které pak ničí buňky a tkáně. Buňky pak umírají nebo podléhají apoptóze, naprogramované buněčné smrti. [18]

Důležitou výhodou fotodynamické terapie oproti jiným léčebným metodám je jistě malá invazivita oproti operacím nebo složitému vpravování externího světla. PDT je precizně cílená díky selektivní iluminaci a může být opakovaná několikrát. Pro její úspěšnou aplikaci je nutné použít vhodný fotosenzibilizátor. Ideální fotosenzibilizátor by měl být minimálně jedovatý pro organismus ve fázi, kdy na něj nepůsobí světlo, měl by se hromadit v cílené tkáni ve vysokých koncentracích a po ukončení fotodynamické terapie by měl být co nejdříve vyplaven z organismu, aby nedošlo k nežádoucím jevům po působení denního světla. Mimo to by měl absorbovat vlnové délky vyšší než 600nm, aby byla zajištěna hluboká penetrace a v neposlední řadě by měl mít vysoký výtěžek singletního kyslíku [14, 19, 20].

3.2. Fotosenzibilizátory

Většina fotosenzitivních látek používaných jak v klinické praxi, tak v laboratoři je odvozená od tetrapyrrolového aromatického jádra nalezeného v mnoha v přírodě běžně se vyskytujících pigmentech (hemový chlorofyl a bakteriochlorofyl).

Tetrapyrrolová barviva absorbují v relativně velkém pásmu v rozmezí od 400nm tzv. Soretův pás, pak jsou postupně menší absorpční pásy, až po červené vlnové délky, kterým se také říká Q- pásy.

Mezi tetrapyrrolová barviva dále patří porfyriny (absorbují okolo 630nm), chloriny (650-690nm, vysoké píky – žádané pro PDT), bakteriochloriny

Dalšími podrobně zkoumanými fotosenzibilizátory je skupina ftalocyaninů (popř. méně používané naftalocyaniny). Jejich nejzazší absorpční pás je okolo 650nm se slušnou výškou píku. Nevýhoda je ve zhoršené rozpustnosti a kumulativnosti, což se řeší jejich další úpravou.

Třetí skupina obsahuje čistě syntetické, v přírodě se nevyskytující, konjugované pyrrolové cyklické systémy. Spadají sem struktury jako texafyriny, porfyceny a sapfyriny.

Poslední skupinou jsou v přírodě se vyskytující barviva i barviva syntetická, která nejsou deriváty tetrapyrrolu. Patří sem hypericin (třezalka tečkovaná, přírodní), bengálská červeň (barvivo syntetické odvozené od fluoresceinu), methylenová modř (fenothiazinový derivát), eosin Y (barvivo syntetické odvozené od fluoresceinu).

Mnoho zástupců z těchto skupin, dělených podle struktury, již bylo, či stále je podrobováno testování pro využití v PDT – fotodynamickou terapii [16, 21].

4. *Chemiluminescence*

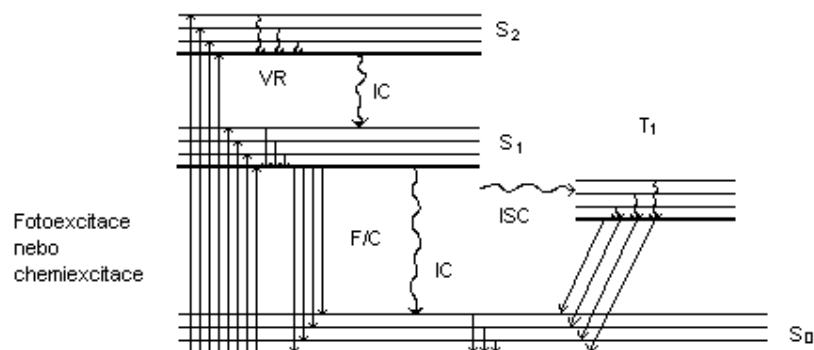
Chemiluminescence je jeden z typů luminiscence a má původ v bioluminiscenci. Světlo svatojánských mušek a jiné bioluminiscenční procesy v přírodě přitahovaly lidstvo od dávných dob. První psaná zmínka pochází z rukou Aristotela, který popisuje slabé světlo vyzařované houbami a mrtvými rybami. Boylova práce o kyslíku však otevřela nový horizont ve výzkumu bioluminiscence a chemiluminescence. Wiedermann v roce 1888 jako první definoval chemiluminescenci jako emisi světla způsobenou chemickou reakcí. První vědecká práce byla představena Duboisem, který představil termíny luciferin a luciferáza [13, 14].

Značný výzkum chemiluminescence a bioluminiscence začal na počátku 20. století. V roce 1905 publikoval Trautz první přehled známých CL reakcí a přisuzoval je aktivnímu kyslíku. Kautski popsal v roce 1922 emisi světla jako výsledek působení silných oxidantů na siloxany. Mallet, v roce 1927, poukázal na excitaci fluoroforů, jakými jsou např. eosin, fluorescein, anthracen a chinin, přenosem energie z reakce peroxidu vodíku s chlornanem. O rok později Albrecht představil studium oxidace luminolu, který je stále dominantou ve výzkumu na tomto poli. Počáteční výzkum CL a BL byl zaměřen hlavně na studium a popis jejich mechanismů. Později se objevily také analytické aplikace v literatuře a to na počátku 60. let 19. století [14].

4.1. *Mechanismus chemiluminiscenčních reakcí*

Chemiluminescence je definována jako emise elektromagnetického záření (obvykle viditelné světlo nebo blízké IR) produkované chemickou reakcí. Pokud pochází emise z živého organismu nebo z chemického systému z něj odvozeného, nazývá se tento jev bioluminiscence. Oba fenomény - luminiscenční procesy jsou tradičně významné jak svou emisí světla, tak energetickými zdroji, které způsobují tuto elektromagnetickou radiaci. Při chemiluminiscenční reakci zpravidla vzniká jeden z produktů v excitovaném stavu a následně pak produkuje světlo při návratu do stavu základního. Jako můžeme vidět na schématu Jablonského diagramu (obr.4), proces světelné emise při chemiluminiscenci je stejný jako při fotoluminiscenci, až na proces

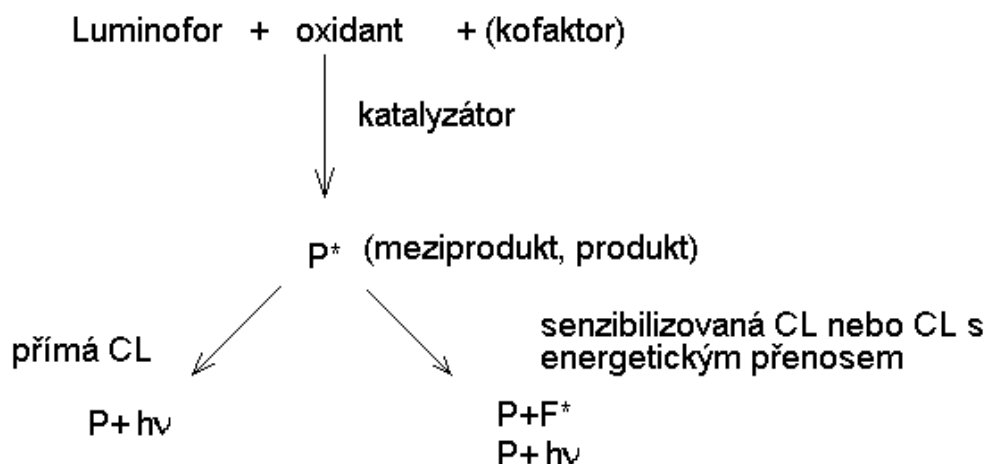
excitační. Při fluorescenci a fosforescenci jsou elektronové excitované stavy produkovány absorpcí ultrafialového nebo viditelného světelného záření, vrací se do základního stavu S_0 z nejnižšího singletního excitovaného stavu S_1 nebo z tripletního excitovaného stavu T_1 [14].



Obr.4: Jablonského schéma. S_0 základní singletní stav, S_1, S_2 excitované singletní stavy, T_1 excitovaný tripletní stav, F/C fluorescence/chemiluminiscence, P fosforescence, CD – kolizní deaktivace, IC- (S-S, T-T)vnitřní konverze, VR- vibrační relaxace, ISC – mezisystémové křížení S –T změna spinu

Chemiluminiscenční reakce může být uskutečněna dvěma základními mechanismy. V přímé reakci, dva reagenty, obvykle substrát a oxidant v přítomnosti nějakého kofaktoru, reaguje za vzniku produktu, případně meziprojektu v přítomnosti katalyzátoru. Některá z látek v procesu bude v elektronově excitovaném stavu, který následně relaxuje do stavu základního za vyzáření fotonů. Touto látkou je substrát, který je převeden do elektronově excitovaného stavu, zodpovědný za světelnou emisi nebo přenos energie při nepřímé chemiluminiscenci. Katalyzátory, enzymy nebo kovové ionty, snižují aktivační energii a poskytují potřebné adekvátní prostředí pro vysoký výtěžek chemiluminiscence. Kofaktory jsou někdy nezbytné pro převod jedné nebo více látek substrátů do forem schopných reagovat nebo interagovat s katalyzátorem, nebo aby poskytly volnou skupinu, jestliže je pro vznik excitovaného emitéru potřeba rozštěpit vazbu. Naopak, nepřímá nebo senzibilizovaná chemiluminiscence je založena na procesu přenosu energie z excitované látky na fluorofor. Tento proces umožňuje molekulám, které nemohou být přímo zapojené do chemiluminiscenční reakce, přenést jejich nadbytek energie na

fluorofor, který je postupně excitován, relaxuje do základního stavu za uvolnění fotonů [14, 15].



Obr. č. 5 Schéma obou mechanismů oxidace luminoforu

- Reakce musí být exotermická, aby produkovala dostatek energie [14]
- Reakční cesta musí být příhodná pro vytvoření elektronově excitovaného stavu. V případě, že se energie ztratí jako teplo, do vibračních a rotačních pochodů, reakce nebude chemiluminiscenční. [14]
- Emise fotonů musí být příznivým deaktivacním procesem ke kompetitivním nežádoucím procesům, které se mohou v malé míře také vyskytovat. V případě senzitivované chemiluminiscence jsou oba výtěžky energetického přenosu ze základních látek na fluorofor a také následná fluorescence důležité. [14]

4.2. *Luminofory*

Luminoforem je látka, která po předchozím dodání energie přejde do nestabilního excitovaného stavu a při návratu do stavu základního emituje světelné záření. Charakteristikou záření jsou pak 4 parametry – barva, intenzita, rychlost průběhu a doba průběhu. Mezi luminofory patří sloučenin [14]:

- lofin a jiné indoly
- luminol a příbuzné acylhydrazidy
- peroxyoxaláty
- lucigenin a jiné akridiny
- a některé další organické sloučeniny

5. Cíl práce

Cílem práce byla chemiexcitace fotosenzibilizátorů. Ve výsledcích byla porovnávána chemiluminiscence luminolu bez použití oxidantů, bez použití katalyzátorů, chemiluminiscence s oxidanty i katalyzátory. Naměřené hodnoty intenzity chemiluminiscence byly porovnány mezi sebou a také s intenzitami, kdy směs reagovala se všemi třemi organickými barvivy eosinem, methylenovou modří nebo bengálskou červení. Veškerá měření byla prováděna na luminometru Berthold Sirius 2C. Roztoky byly přidávány do kyvet v dodržovaném pořadí a doplňovány byly fosfátovým pufrům o pH 7,4 na objem 1ml. Luminol je luminoforem, jehož chemiexcitace je nejznámější a nejprozkoumanější. Použitá organická barviva neboli fotosenzibilizátory, patří rovněž ke známým a našla již uplatnění v aplikacích jako dezinfekční fotosenzibilizátory, které pomocí PDT respektive její variantě PACT (fotodynamická antimikrobiální chemoterapie) dokáží ničit mikroorganismy. Jejich chemiexcitace chemiluminiscenčním světlem, byla cílem bakalářské práce. Byly porovnávány naměřené hodnoty intenzity chemiluminiscence různých systémů.

6. Materiál a metody

6.1 Chemikálie

- HRP- křenová peroxidáza typ II, 158 U/mg (Sigma Aldrich, USA),
- luminol sodná sůl (Sigma, Aldrich, USA)
- bengálská červeň (Sigma Aldrich, USA)
- methylenová modř 87% m/m (Sigma Aldrich, USA)
- eosin žlutý (Lachema n.p. Brno, Česká Republika)
- H₂O₂ 3% (Sigma Aldrich, USA)
- NaCl a KCl (Lachema, Chemapol Praha, Česká Republika)
- Na₂HPO₄ · 12 H₂O a KH₂PO₄ (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
- FeCl₂ · 4H₂O (Sigma Aldrich, Německo)
- CuSO₄ · 5H₂O (Sigma Aldrich, Německo)

Zásobní roztoky:

Fosfátový pufr PBS - pH 7,4. Byl připraven pomocí chemikálií p.a čistoty
V 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno:

8 g NaCl

0,20 g KCl

3,63 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O

0,24 g KH₂PO₄ [22]

pH bylo zjištěno pH metrem IQ a ustavilo se na požadované hodnotě 7,4.

Zásobní roztoky barviv:

Byly připraveny rozpuštěním barviv v destilované vodě do 10 ml odměrné baňky
v navážkách tak, aby požadovaná koncentrace byla vždy 1.10⁻³ M.

Zásobní roztok katalyzátorů a luminolu:

HRP, Cu²⁺, Fe²⁺ a luminol

5.10⁻⁶ M zásobní roztok HRP

1.10⁻⁴ M zásobní roztok železnatých iontů

1.10⁻⁴ M zásobní roztok měďnatých iontů

2.10⁻³ M zásobní roztok luminolu a pracovní roztok luminolu 2.10⁻⁴ M

6.2. Přístrojové vybavení

- pH metr IQ 120 - P-Lab
- luminometr Berthold Sirius 2C

Chemiluminiscence byla měřena luminometrem od firmy Berthold Sirius 2C (obr.6). Speciální detektor pokrývá rozsah spektra od 370 do 630 nm.



Obr. č. 6 Luminometr Berthold Sirius 2C

Přístroj citlivě detekuje flash i glow luminiscenci a je určen k:

- Gen reporter testování (i duální testování)
- ATP testování
- testy aktivity mináž
- testování buněčného dělení a cytotoxicity
- kvantifikace nukleových kyselin
- luminiscenční imunotesty

Detektor umožňuje měřit s citlivostí na 1 jednotku relativní chemiluminiscence.

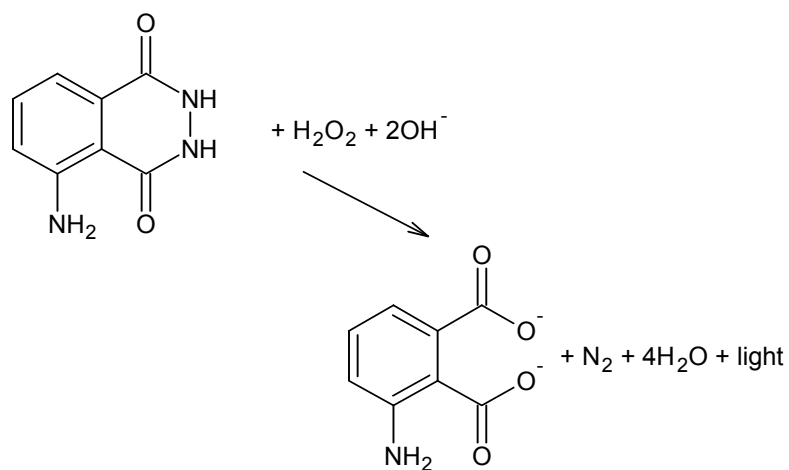
5.3. Pracovní postupy

Luminol jako luminofor pro chemiluminiscenční reakce patří k nejnámějším (obr.7). Reakce luminolu peroxidem vodíku za přítomnosti katalyzátoru Fe^{2+} a Cu^{2+} , které katalyzují rozklad peroxidu za vzniku kyslíkových radikálů se nazývá Fentonova reakce a byla zmiňována již dříve.

Uvedené katalyzátory byly použity, protože rozkládají peroxid za vzniku reaktivních kyslíkových forem a díky katalýze přechodným kovem dovolují také vznik singletního kyslíku. Rozklad peroxidu za vzniku kyslíkových radikálů se nazývá Fentonova reakce a byla zmiňována již dříve.

HRP-křenová peroxidasa patří mezi nejužívanější katalyzátory a zvyšuje luminiscenci až 1000 krát [23]. V tabulce 1 jsou uvedeny příklady používaných oxidantů a k nim příslušné katalyzátory. Některými z těchto systémů - perlum, lumper, HRP, Cu^{2+} , Fe^{2+} pak budou excitovány fotosenzibilizátory - eosin žlutý (EY), bengálská červeň (RB) a methylenová modř (MB) (obr. 8,9,10).

Na přístroji Berthold Sirius 2C byly změřeny hodnoty relativní luminiscence (také intenzita CL) – což je relativní počet fotonů připadající na interval vlnových délek za sekundu. Následně byla porovnána chemiluminiscence různých systémů. Každé měření bylo prováděno po dobu 1 minuty v intervalech 0,2 s. U řady roztoků různých koncentrací jsou zobrazeny hodnoty odečtené v čase 0,2s tak, aby nebyl výsledek ovlivněn případnými rušivými vlivy. Každé měření bylo provedeno třikrát a jako výsledná hodnota spočítán průměr z těchto tří měření. U sloupcových grafů je uvedena průměrná hodnota intenzity luminiscence v čase 0,2 s (ze tří nezávislých měření). Fotosenzibilizátory byly postupně řaděny puřem PBS o pH 7,4. Nástřik luminolu byl 25 μl pracovního roztoku do celkového objemu 1ml. Nástřik peroxidu byl 100 μl 3% zásobního roztoku do 1 ml roztoku v kyvetě a nástřik HRP byl 10 μl vždy do 1 ml roztoku v kyvetě. Fotosenzibilizátor, pokud byl přítomen, byl vždy v roztoku jako první a ostatní reagenty následují v popsaném pořadí.

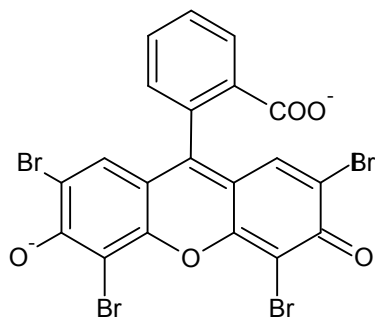


Obr. 7 Reakce luminolu s peroxidem vodíku za vzniku 3-aminofthalátu (vzniká nejdříve v tripletním 3T stavu a na konci reakce vyzáří světlo za současného přechodu do stavu základního singletního S_0 mezisystémovým křížením)

Oxidant	Katalyzátor
H_2O_2	$\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_8$ peroxidáza $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3^-$ hemové sloučeniny Ionty přechodných kovů Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , VO^{2+} chlornanový anion
O_2	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3^-$ Fe^{2+}
chlornanový anion	
I_2	
MnO_4	
NO_2	

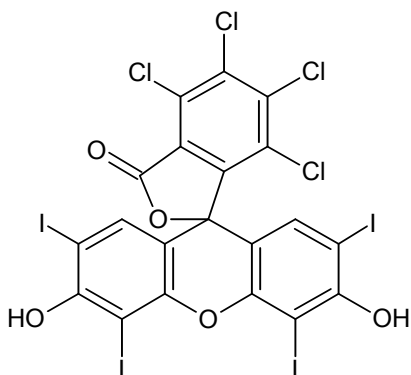
Tabulka 1: Oxidanty a katalyzátory

Eosin žlutý se používá se jako dezinfekční fotosenzibilizátor s antibakteriálními a antivirovými účinky. Dokonce se předpokládá, že se spolu s RB a MB vážou na vir HIV. Stejně jako další dvě barviva produkuje převážně singletní kyslík (kvantový výtěžek ~ 0,57). Kvantový výtěžek je dán poměrem počtu vzniklých nebo zaniklých částic ku počtu molů absorbovaných kvant záření.



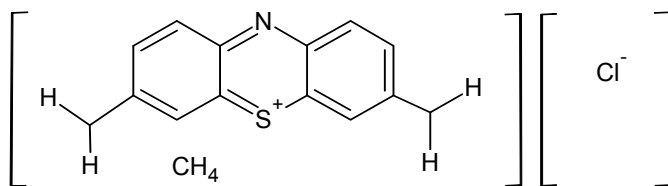
Obr. 8: Eosin žlutý (2',4',5',7'-tetrabromofluorescein)

Bengálská červeň má vysoký výtěžek singletního kyslíku ~ 0,75



Obr. 9: Bengálská červeň (4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein)

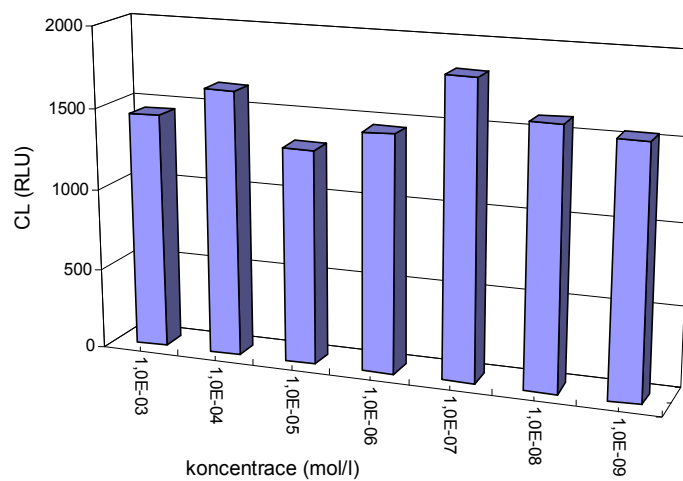
Methylenová modř (MB) je dlouho známým a používaným fotosenzibilizátorem s kvantovým výtěžkem singletního kyslíku ~ 0,5



Obr. 10: Methylenová modř (3,7-bis(Dimethylamino)-fenothiazin-5-ium chlorid)

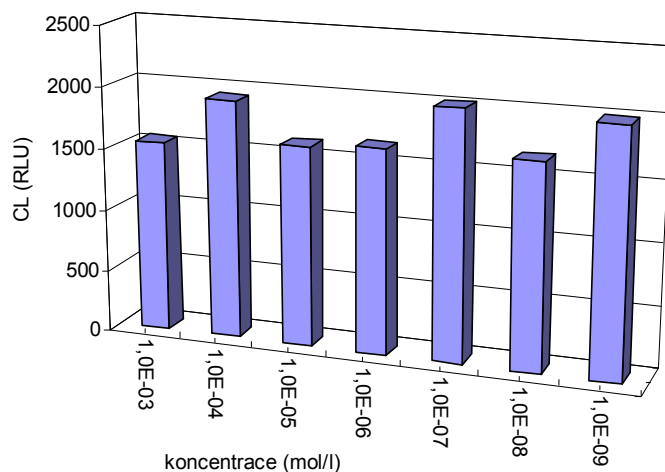
6. Výsledky a diskuze

Na grafu č. 1 je zobrazena závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci žlutého eosinu. Osa x představuje jednotlivé koncentrace a osa y intenzitu luminiscence v relativních jednotkách. Nástřik byl proveden nejdříve 1ml $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ zásobního roztoku a poté byl ředěn desetkrát puřem PBS o pH 7,4. Byla tak získána řada roztoků až po $1 \cdot 10^{-9} \text{M}$ eosinu. Hodnoty chemiluminiscenční intenzity jsou průměrem ze tří měření, které byly odečtené v čase 0,2 s



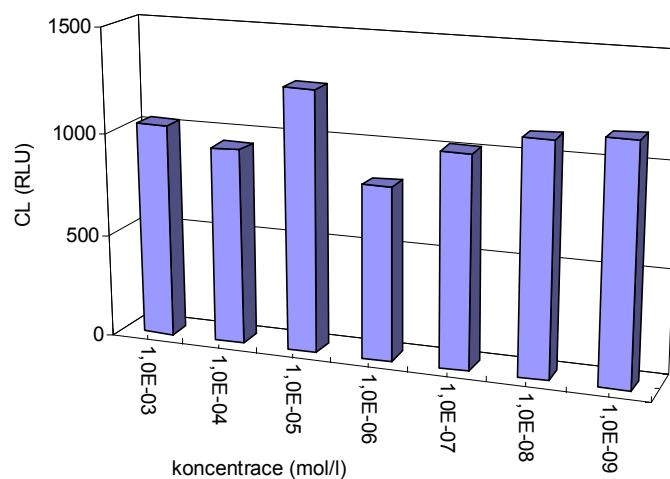
Graf č. 3 MB – Závislost intenzity CL žlutého eosinu na jeho koncentraci v rozmezí od $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ po $1 \cdot 10^{-9} \text{M}$.

Druhým grafem v pořadí je závislost intenzity chemiluminiscence bengálské červeně na její koncentraci. Postup měření byl stejný jako u eosinu. Výsledky jsou velmi podobné, chemiluminiscence je vyšší v průměru o 500 RLU.



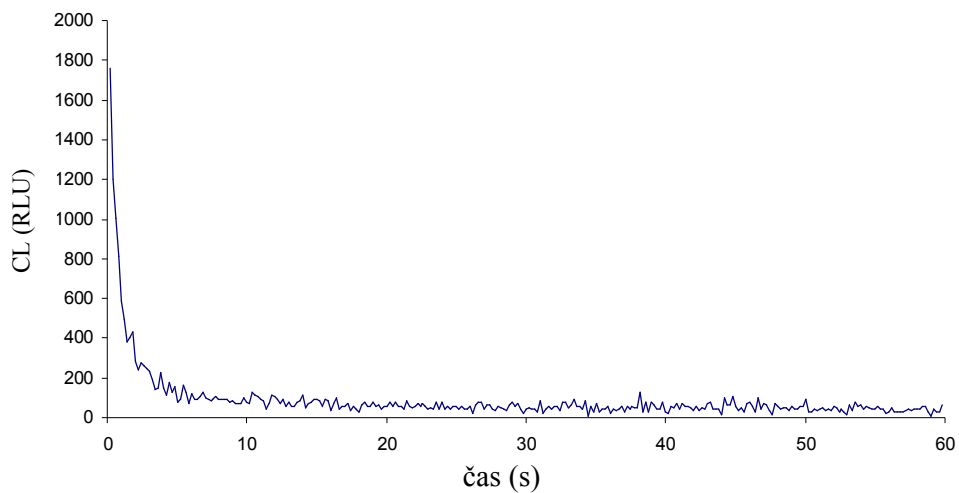
Graf č. 2 RB – Závislost intenzity CL bengálské červeně na její koncentraci od $1.10^{-3}M$ po $1.10^{-9}M$.

Poslední v pořadí byla měřena intenzita chemiluminiscence methylenové modři, jejíž hodnoty byly poloviční oproti bengálské červeně

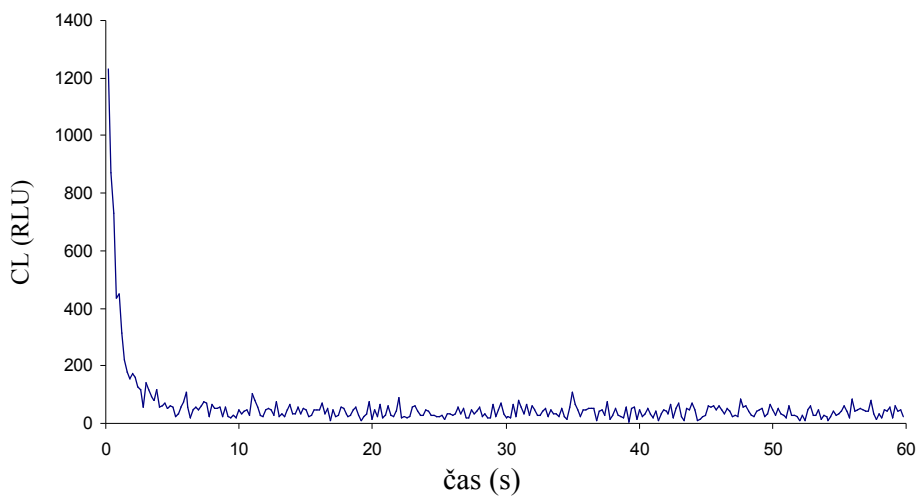


Graf č. 3 MB – Závislost intenzity CL methylenové modři od $1.10^{-3}M$ po $1.10^{-9}M$.

Na grafu č. 4 je zobrazena závislost chemiluminiscence luminolu v PBS o pH 7,4 na čase. Nástřik byl proveden do pufru. Na grafu č. 5 je pak závislost peroxidu vodíku 3% na čase.

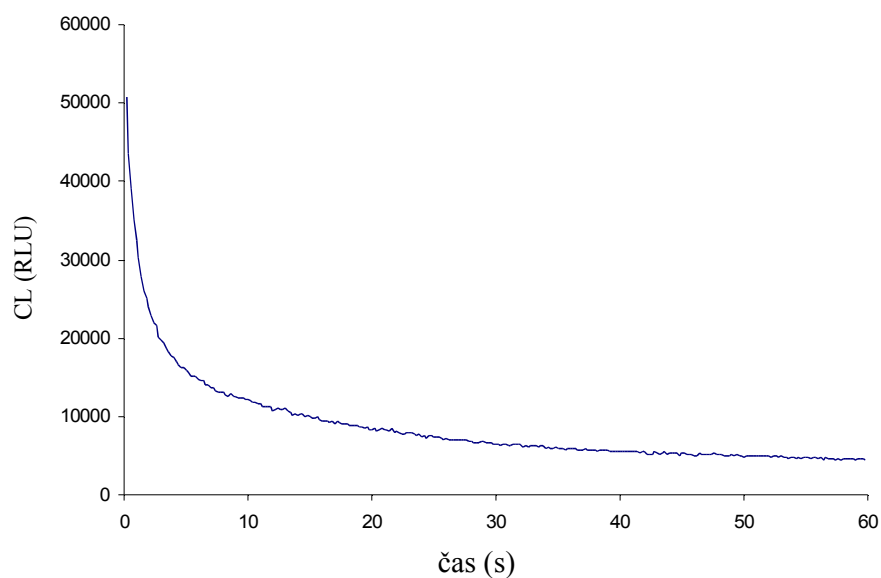


Graf č. 4 Závislost chemiluminiscence $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ luminolu - nástřik $25 \mu\text{l}$ pracovního roztoku luminolu do $975 \mu\text{l}$ PBS.



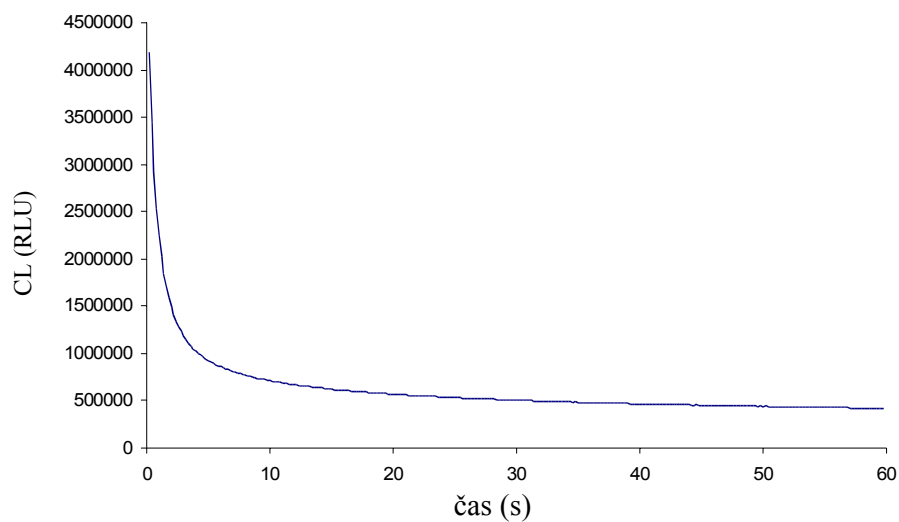
Graf č.5 Závislost $0,1 \text{M}$ H_2O_2 na čase nástřik $100 \mu\text{l}$ zásobního roztoku 3% H_2O_2 do $900 \mu\text{l}$ PBS.

Následující graf č.5 vyznačuje závislost CL po oxidaci luminolu peroxidem. Objemy nástřiků byly 25 μl luminolu a 100 μl peroxidu. CL je cca 30krát vyšší než u jednotlivých roztoků luminolu nebo peroxidu. Peroxid vodíku oxiduje luminol za vzniku luminiscenčního produktu.



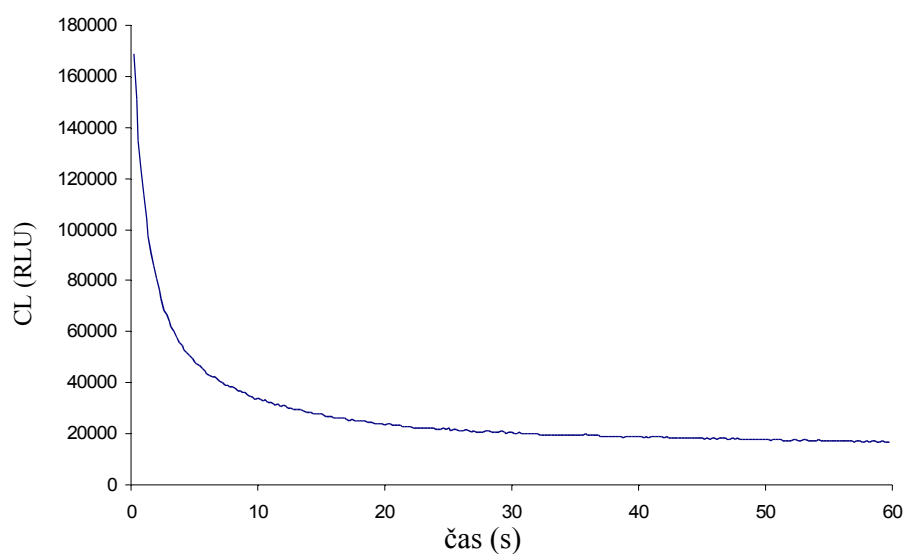
Graf č. 6 Závislost CL 25 μl luminolu a 100 μl peroxidu vodíku v PBS 7,4.

Průběh katalyzované reakce představuje následující graf č. 7. Excitační směs luminol $5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ a H_2O_2 0,1M katalyzovaná HRP $5 \cdot 10^{-8}\text{M}$.

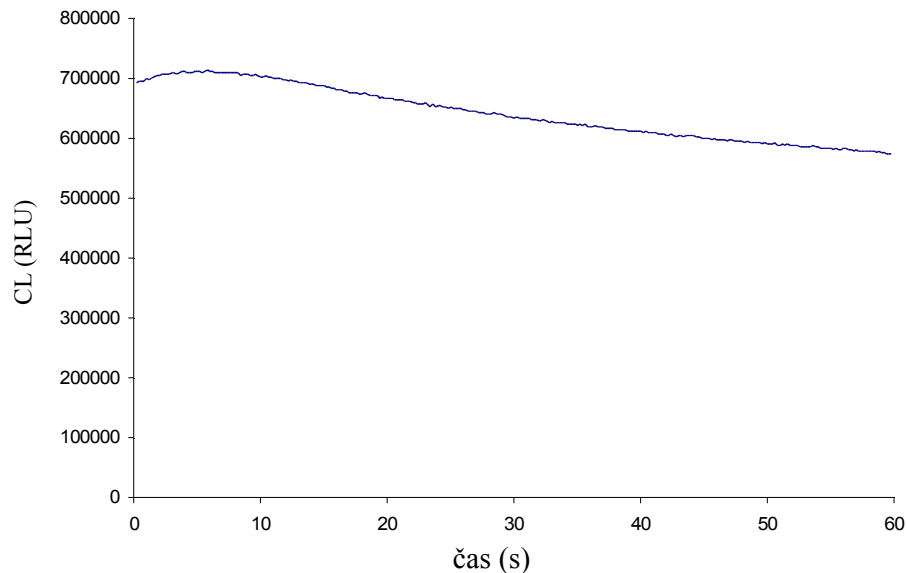


Graf č. 7 Závislost CL $5 \cdot 10^{-8}\text{M}$ HRP s excitační směsí lumper na čase – nástřik 10 μl HRP, 25 μl luminol, 100 μl H_2O_2 a doplněno do 1ml PBS puřrem.

Na grafech č.8 a č.9 je znázorněna závislost intenzity chemiluminiscence katalyzované Cu^{2+} a Fe^{2+} ionty přidanými ke směsi luminolu a peroxidu. Byly použity zásobní roztoky připravené z $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, jejichž nástřik byl $50\mu\text{l}$ do 1ml . Maximální hodnota luminiscence byla 15krát menší u železnatých iontů než u HRP. O necelý jeden řád byl rozdíl u měďnatých iontů oproti HRP, avšak CL s časem klesala jen mírně a po cca 20 s byly hodnoty vyrovnané s HRP.

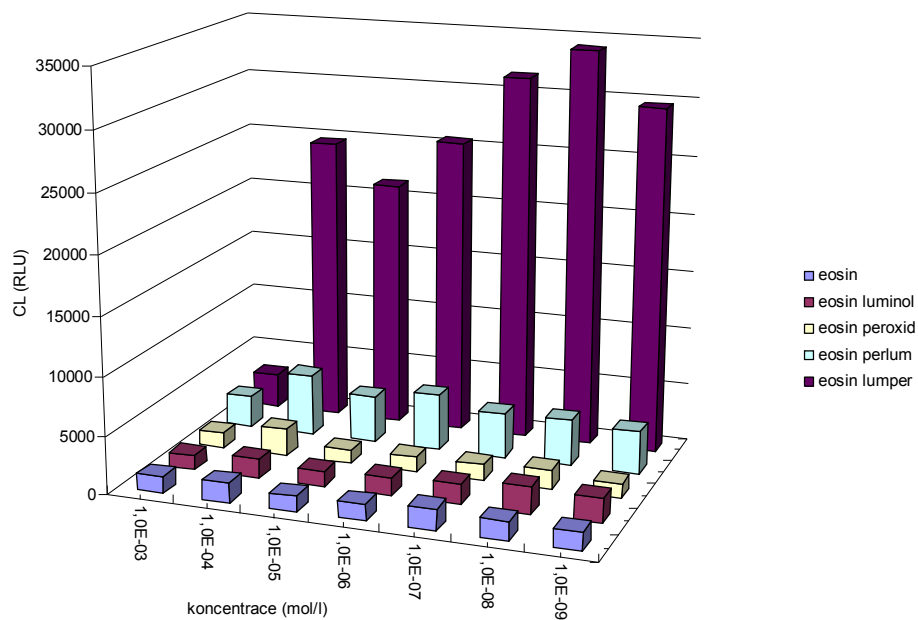


Graf č. 8 Závislost intenzity luminiscence $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ Fe^{2+} s excitační směsí lumper na čase – nástřik $50\mu\text{l}$ Fe^{2+} , $25\mu\text{l}$ luminol, $100\mu\text{l}$ H_2O_2 a doplněno do 1ml PBS pufrem.

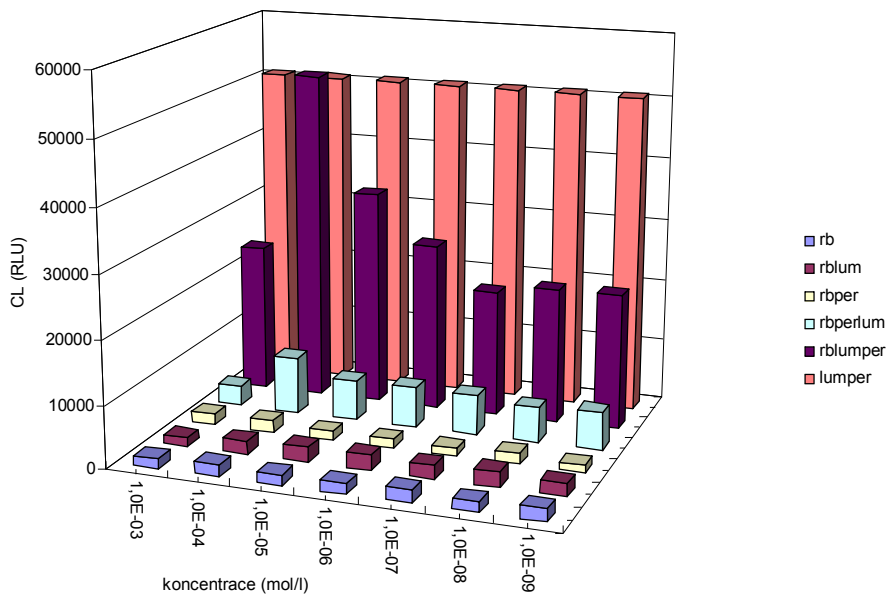


Graf č. 9 Závislost intenzity luminiscence $5 \cdot 10^{-6} \text{M Cu}^{2+}$ s excitační směsí lumper na čase – nástřik $50 \mu\text{l Cu}^{2+}$, $25 \mu\text{l}$ luminol, $100 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ a doplněno do 1ml PBS puforem.

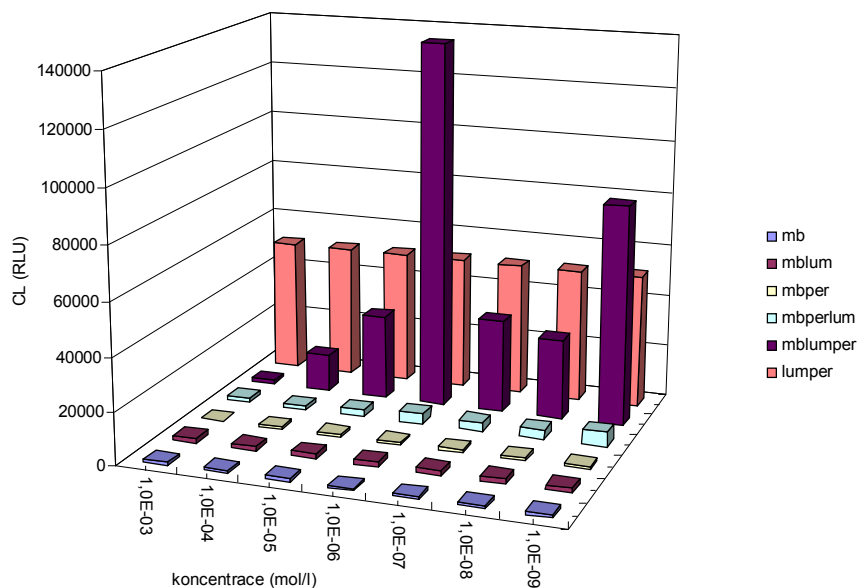
Na následujících sloupcových grafech č. 10, 11, 12 je patrná závislost maximální hodnoty CL v čase 0,2 sekundy na typu směsi. Měření probíhalo pro nekatalyzované reakce všech tří fotosenzibilizátorů v pořadí EY, RB, MB v kombinacích s luminolem, peroxidem, luminolem - peroxidem a peroxidem - luminolem. Poslední sloupec jsou hodnoty chemiexcitační směsi luminol - peroxid v pořadí, která svítí nejvíce a lze vidět rozdíl o více než polovinu při použití fotosenzibilizátoru. Ve výsledcích je vidět reakce, kdy fotosenzibilizátor snižuje CL intenzitu o více než polovinu, kdy CL zůstává stejná jako při použití samotné excitační směsi a také kdy fotosenzibilizátor CL zvýšil třikrát. Další experimenty byly měřeny pouze s roztoky $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ RB a EY a $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ MB.



Graf č. 10 Závislost intenzity CL na koncentraci EY v různých systémech. EY, EY v kombinaci s luminolem $5.10^{-6}M$, peroxidem 0,1M, luminolem a peroxidem, peroxidem a luminolem

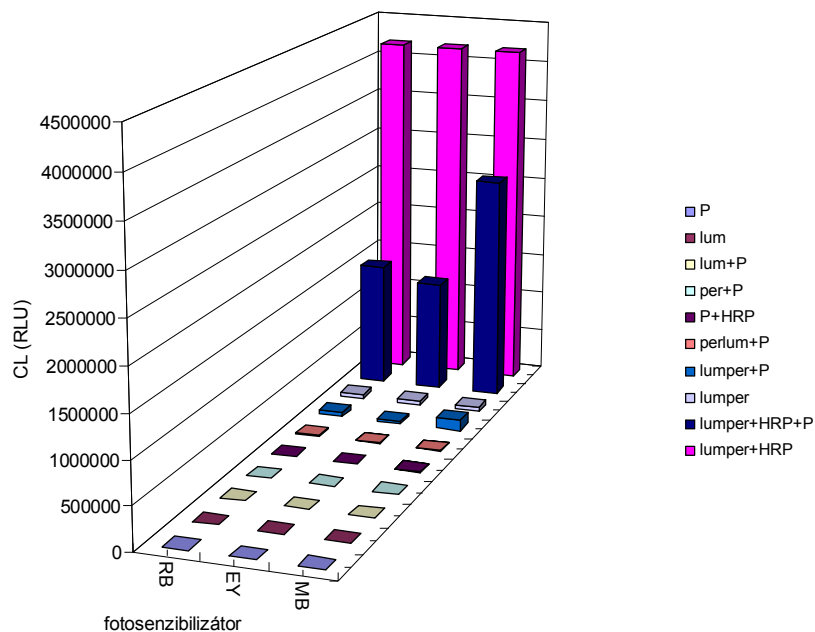


Graf č. 11 Závislost intenzity CL na koncentraci RB v různých systémech. RB, RB v kombinaci s luminolem $5.10^{-6}M$, peroxidem 0,1M, luminolem a peroxidem, peroxidem a luminolem.

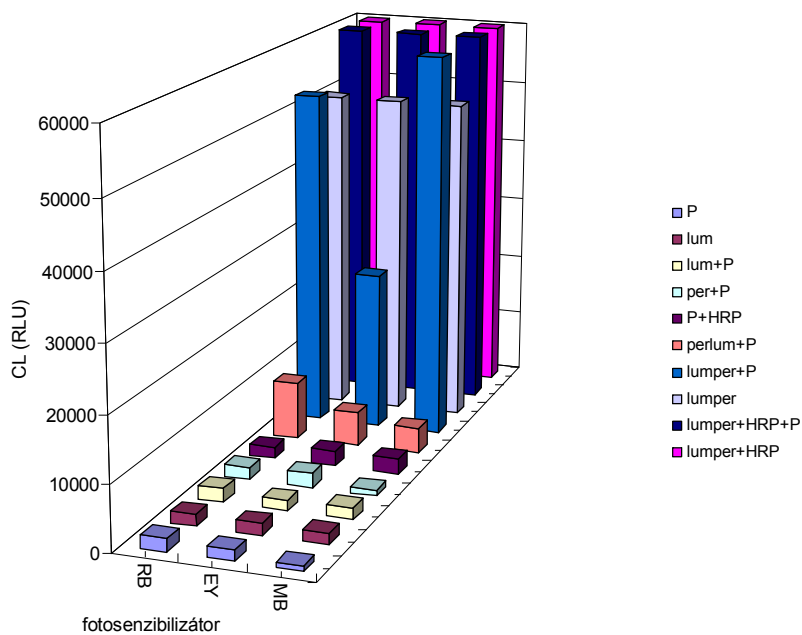


Graf č. 12 Závislost intenzity CL na koncentraci MB v různých systémech. MB, MB v kombinaci s luminolem $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$, peroxidem $0,1 \text{M}$, luminolem a peroxidem, peroxidem a luminolem.

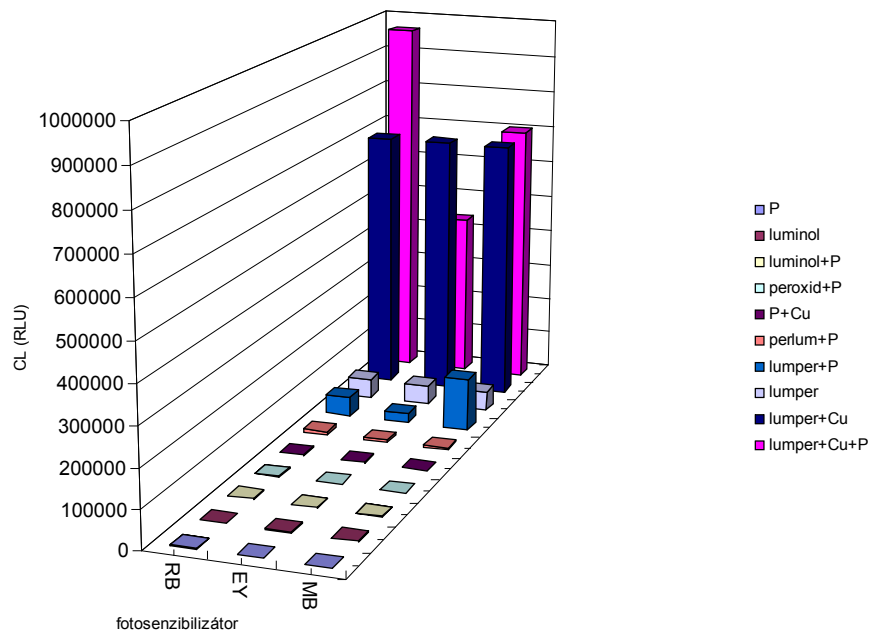
Nyní následují grafy 13, 14, kde jsou zobrazeny výsledky měření rozkladu H_2O_2 křenovou peroxidasou za použití všech systému. Graf 14 má zkrácenou osu y na hodnotu 50 000, aby byl jasně vidět rozdíl mezi katalyzovaným systémem luminol – H_2O_2 – HRP. A nakonec jsou zde grafy 15 a 16, představující stejné reakce ovšem s jinými katalyzátory a jinými průběhy. Systém luminol – H_2O_2 – HRP vykazuje nejintenzivnější CL a fotosenzibilizátory bez výjimky tuto CL mírně zhaší. U katalýzy roztoku modrou skalici RB intenzitu zvyšuje, EY snižuje a u MB zůstává přibližně stejná. A nakonec katalýza Fe^{2+} ionty vykazuje mírné zvýšení CL v řádech desítek tisíc RLU.



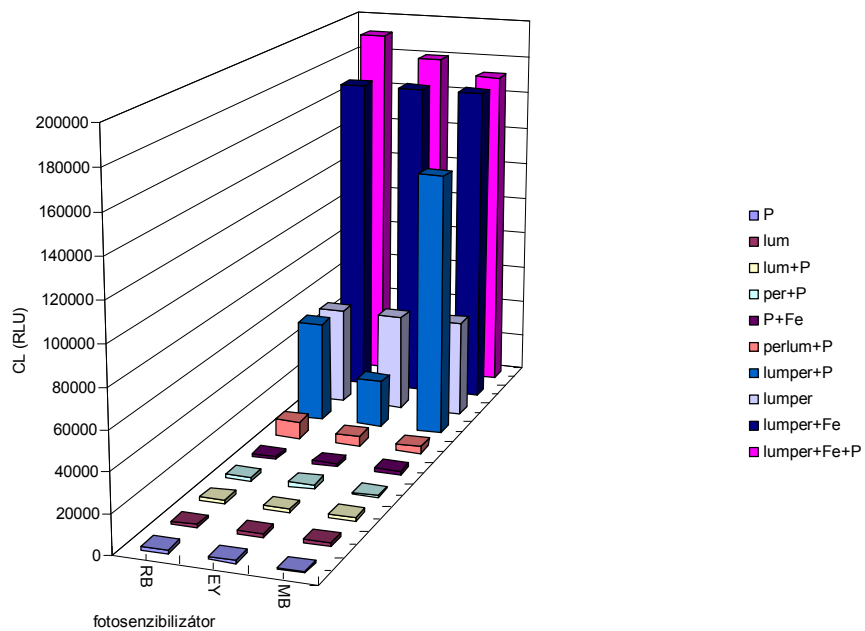
Graf č. 13 Závislost intenzity CL na složení směsi. $5 \cdot 10^{-8}$ M HRP spolu s luminolem a H_2O_2 svítí nejintenzivněji a je znatelný pokles při senzibilizaci barvivy. MB snižuje CL přibližně 0,5 krát, RB a EY 3-4 krát.



Graf č. 14 Stejná závislost jako graf č. 10 s upravenou maximální intenzitou CL na 50 000.



Graf č. 15 Závislost intenzity CL na složení směsi. Katalyzátorem byly $5.10^{-6}M Cu^{2+}$



Graf č. 16 Závislost intenzity CL na složení systémů. Katalyzátorem byly Fe^{2+} ionty.

7. Závěr

Byla změřena relativní intenzita chemiluminiscence vybraných excitačních systémů ve fyziologickém pufru pH 7,4. CL excitačních systémů luminol, luminol a peroxid vodíku, luminol a peroxid vodíku a katalyzátor byla naměřena na luminometru Berthold Sirius 2C. Jako katalyzátory byly použity křenová peroxidasa, Cu^{2+} ionty a Fe^{2+} ionty. Všechny tyto systémy byly proměřeny v přítomnosti fotosenzibilizátorů a výsledné hodnoty byly následně porovnány.

Hodnoty naměřené relativní intenzity chemiluminiscence se při různých použitých systémech měnily. CL luminolu samotného lze podle výsledků této práce hodnotit jako 50krát menší než systém luminol peroxid vodíku a 5000krát menší oproti systému peroxid vodíku, křenová peroxidasa. Katalýza peroxidasou zvýšila intenzitu stokrát oproti systému luminol - peroxid. Katalýza železnatými ionty zvýšila chemiluminiscenci 3krát. Poslední katalýza ionty měďnatými zvýšila CL 14 krát, přičemž CL se po celou minutu téměř nezměnila. Jako důležitá se zdála volba katalyzátoru, kdy bylo zjištěno, že přítomnost fotosenzibilizátoru intenzitu chemiluminiscence zvyšovala, snižovala nebo neovlivnila.

8. Summary

Relative (chemi)luminescent intensities of possible excitation systems in phosphate buffer saline pH 7,4 were measured. CL of excitation systems luminol, luminol-hydrogen peroxide, luminol-hydrogen peroxide-catalyst were measured using luminometer Berthold Sirius 2C. As catalyst was used horseradish peroxidase, Cu^{2+} ions and Fe^{2+} ions. All of the systems were measured in the presence of photosensitizers and results were compared.

Values of relative chemiluminescent intensities has changed depending on each system used. Luminol alone chemiluminescence could be interpreted using our measuring data as 50-fold lower than chemiluminescent intensity of luminol-hydrogen peroxide system and 5000-fold lower than chemiluminescence catalyzed with horseradish peroxidase. Compared horseradish catalyzed oxidation by hydrogen peroxide with pure oxidation by hydrogen peroxide, the HRP increased 100-fold CL intensity. When Fe^{2+} as catalyst was used, CL increased 3-fold. The last catalyst Cu^{2+} improved CL approx. 14-fold but with same level of intensity for one minute measurement. As an important step seemed to be selection of the catalyst, which caused all the higher intensity, same level intensity and lower intensity when photosensitizer were added to the system. This work should be the first for further research with another work which applies these systems to unicellular organism *in vitro* and will continue this study about chemiluminescent excitation of photosensitizers and mainly formation of reactive oxygen species.

Seznam literatury

- [1] Haliwell B., Gutteridge J.M.S. (1989): **Free Radical in Biology and Medicine.** *Clarendon Press, Oxford*
- [2] Zhao L. (2001): **Singlet Oxygen.** *Clin. Chem.* 25, 1531
- [3] Theodossiou T., Hothersall J.S., Woods E.A., Okkenhaug K., Jacobson J., MacRobert A.J. (2003): **Firefly Luciferin-activated Rose Bengal: In Vitro Photodynamic Therapy by Intracellular Chemiluminescence in Transgenic NIH 3T3 Cells¹.** *Cancer Research* 63, 1818–1821
- [4] Ringem H.A.H. et al. (1996): **Application of xanthine oxidase-catalyzed luminol chemiluminescence in a mouse interleukin-5 immunoassay.** *Journal of Immunological Methods* 197, 161-169
- [5] Nakamura M., Nakanuta S. (1998): **One and two electron oxidations of luminol by peroxidase systems.** *Free Radical Biology & Medicine*, 24/ 4, 537-544
- [6] Yamaguchi S. et al. (2010): **Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species.** *Analytica Chimica Acta* 665, 74–78
- [7] Conner G.E. et al. (2002): **Lactoperoxidase and Hydrogen Peroxide Metabolism in the Airway.** *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 57–61
- [8] Diaz A.N. et al. (1996): **Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂ -horseradish peroxidase system: Comparative studies.** *Analytica Chimica Acta* 327, 161-165
- [9] Lang K. et al. (2005): **Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku.** *Chem. Listy* 99, 211-221

- [10] Bancířová M., Kolářová H., Lenobel R., Frébortová J., Medková J., Lasovský J. (2000): **The Chemiexcitation of the photosensitizers.** *Photobiology* 2000
- [11] Rychtařiková R., Kuncová G.: **Imobilizované fotosenzitizátory singletového kyslíku a jejich účinek na mikroorganismy.** *Chem. Listy* 103, 800-813
- [12] Tardivo J.P. (2005): **Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2, 175–191
- [13] Palilis L.P., Calokerinos A.C.(2000): **Analytical applications of chemiluminogenic reactions.** *Analytica Chimica Acta* 41, 175–186
- [14] García-Campaña A.M., Baeyens W.R.G (2001): **Chemiluminiscence in Analytical Chemistry** *Marcel Dekker, USA*
- [15] Thorpe G.H.G, Kricka L.J. et al. (1985): **Phenolsas Enhancers of the Chemiluminescent Horseradish Peroxidase-Luminol-Hydrogen Peroxide Reaction: Application in Luminescence-Monitored Enzyme Immunoassays.** *Clin. chem.* 31/8, 1335-1341
- [16] Dougherty T.J. (1993): **In situ photodynamic therapy/US Patent.** *Patent Number: 5 257 979*
- [17] Castano A.P., Baeyens W.R.G(2004): **Mechanism in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1, 279-293
- [18] Rijcken C.J.F. et. al (2007): **Photosensitiser-loaded biodegradable polymeric micelles: Preparation, characterisation and in vitro PDT efficacy.** *Journal of Controlled Release* 124, 144–153

- [19] Fuchs J., Weber S., Kaufmann R.(2000): **Genotoxic potential of porphyrin type photosensitizers with particular emphasis on 5-aminolevulinic acid: Implications for clinical photodynamic therapy.** *Free Radical Biology & Medicine*, 28/ 4, 537-548
- [20] Castor T., Lallo L.B., Ilynskii P.O.(2004): **Inactivation of viral infections agents by chemiluminescence activated light-sensistive compounds.** *US 0029975 A1*
- [21] Rozanowska M. et al.(1995): **Rose bengal photosensitized formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 29, 71-77
- [22] Dulbecco R., Vogt M. (1953) : **Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.** *From the California Institute of Tecknology, Pasadena*
- [23] Coteur G. and Dubios P. (2004): **Interaction of metals with peroxidase—mediated luminol-enhanced, chemiluminescence (PLmCL).** *Luminescence* 19, 283–286