

# ULTRASLABÁ EMISE FOTONŮ Z BIOLOGICKÝCH SYSTÉMŮ: FYZIKÁLNÍ PODSTATA A POTENCIÁLNÍ APLIKACE

Michal Cifra<sup>1</sup>, Pavel Pospíšil<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav fotoniky a elektroniky, AV ČR, v. v. i., Chaberská 58, 182 51, Praha 8; cifra@ufe.cz

<sup>2</sup> Katedra biofyziky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc; pavel.pospisil@upol.cz

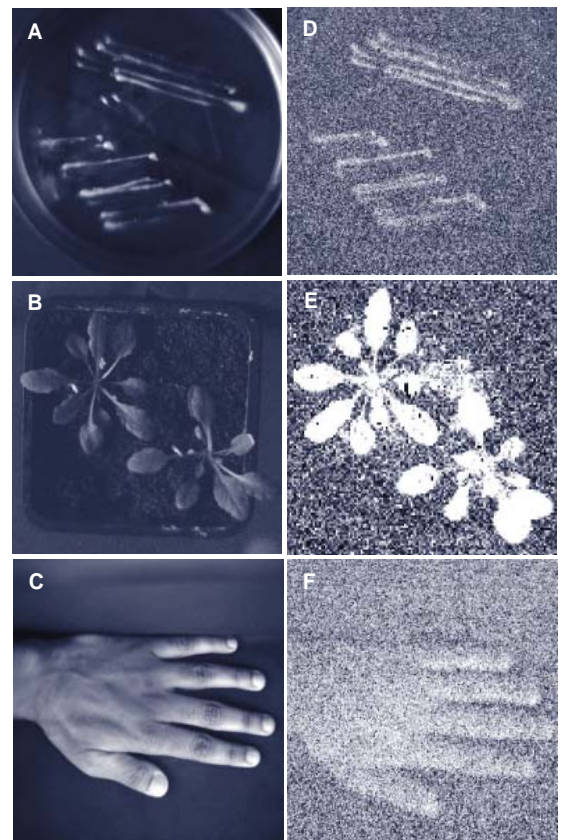
Ultraslabá emise fotonů se vyskytuje prakticky u všech metabolicky aktivních biologických systémů. Jejím zdrojem jsou elektronově excitované stavy molekul vznikající v průběhu oxidativních reakcí biomolekul. Ultraslabá emise fotonů detekovatelná citlivými a nízkošumovými fotonásobiči a CCD kamerami může najít uplatnění v neinvazivních diagnostických metodách v zemědělství a biomedicině.

## Úvod

Vyzařování světla organismy fascinovalo lidstvo od nepaměti. Pozorováno bylo volným okem viditelné světélkování živých organismů, které je dnes známo jako bioluminiscence. Fenomén vyzařování světla biologickými systémy není však omezen pouze na úzkou skupinu organismů se specializovaným enzymatickým aparátem, který bioluminiscenci způsobuje. Je pozoruhodné, že veškeré metabolicky aktivní organismy jsou zdrojem velice slabého světla. Tento fenomén se nazývá *ultraslabá emise fotonů*<sup>1</sup> a je měřitelný pouze pomocí citlivých detektorů světla. Nabízejí se otázky, jaké molekulární mechanismy stojí za tímto vyzařováním fotonů, jaké jsou jeho fyzikální vlastnosti a zda může mít využití v diagnostice procesů probíhajících v biologických systémech.

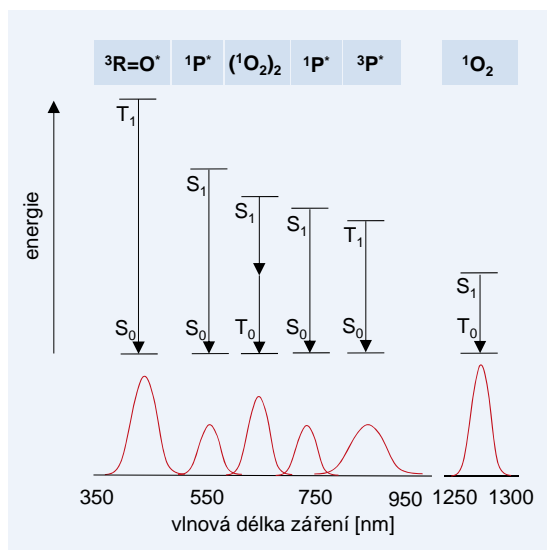
## Co je ultraslabá emise fotonů?

V biologických systémech na všech stupních evolučního vývoje, včetně mikroorganismů, rostlin a živočichů (obr. 1), dochází v průběhu metabolismu k oxidativním procesům [1]. Při těchto chemických procesech vznikají elektronově excitované molekuly, které při přechodu z excitovaného do základního stavu vyzařují fotony. Tato chemiluminiscence z živých organismů se nazývá ultraslabá emise fotonů [2]. Na rozdíl od bioluminiscence, která vyžaduje přítomnost enzymatické reakce (luciferin a luciferáza) pro bezprostřední vytvoření elektronově excitovaného stavu, elektronově excitované molekuly spojené s ultraslabou emisí fotonů jsou tvořeny jako druhotné produkty metabolických nebo stresem vyvolaných oxidativních procesů. Ultraslabou emisí fotonů spojenou s metabolickými oxidativními



**Obr. 1** Ultraslabá emise fotonů je generována metabolicky aktivními organismy, jako jsou mikroorganismy, rostliny a živočichové včetně člověka. Obrázek ukazuje v levém sloupci černobílé fotografie (A–C) a v pravém sloupci zobrazení ultraslabé emise fotonů (D–F) kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* na Petriho misce s agarem (A a D), rostliny *Arabidopsis thaliana* (B a E) a lidské ruky (C a F). Převzato z [1] a upraveno.

1 V literatuře se někdy uvádějí i pojmy *autoluminiscence*, *biofotony/emise biofotonů*, *ultraslabá chemiluminiscence*.



**Obr. 2** Zářivé přechody elektronově excitovaných molekul vedoucí k ultraslabé emisi fotonů: tripletní excitovaný karbonyl ( ${}^3R = O^*$ ), singletní excitovaný pigment (melanin nebo chlorofyl,  ${}^1P^*$ ), singletní kyslík (dimolová emise,  $({}^1O_2)_2$ ), tripletní excitovaný pigment ( ${}^3P^*$ ), singletní kyslík (monomolová emise,  ${}^1O_2$ ).

procesy nazýváme spontánní, zatímco emise fotonů spojená s oxidativními procesy, které jsou vyvolané stresem, je nazývána indukovaná.

Elektronově excitované stavy vznikají jako druhotný produkt oxidativních procesů v živých organismech ve velmi nízkých koncentracích. Množství vyzařovaných fotonů je tak značně nízké. Počet fotonů vyzařovaných živými organismy během metabolických oxidativních procesů je v řádu desítek fotonů  $s^{-1} cm^{-2}$ , zatímco při stresem vyvolaných oxidativních procesech se počet vyzařovaných fotonů může zvýšit na tisíce fotonů  $s^{-1} cm^{-2}$  [2]. Vezmeme-li v úvahu, že spodní práh citlivosti lidského oka je v řádu milionů fotonů  $s^{-1} cm^{-2}$ , je patrné, že ultraslabou emisi fotonů lidským okem spatřit nelze. I přesto, že je množství fotonů vyzařovaných živými organismy nízké, je o několik desítek řádů vyšší, než množství fotonů vyzařovaných v důsledku tepelné excitace atomů (záření černého tělesa). Tato skutečnost umožňuje měření ultraslabé emise fotonů ve viditelné oblasti spektra bez vlivu tepelné emise. V infračervené oblasti spektra je však množství fotonů vyzařovaných v důsledku tepelné excitace srovnatelné s množstvím fotonů vytvořených v důsledku oxidativních procesů, a tak tepelné záření představuje překážku v měření ultraslabé emise fotonů v infračervené oblasti [2].

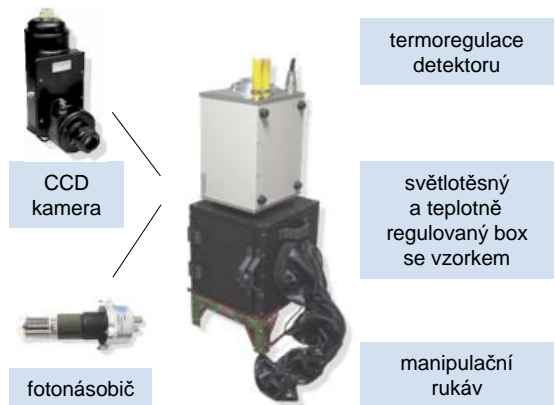
Elektronově excitované molekuly vzniklé jednak při metabolických a jednak při stresem vyvolaných oxidativních procesech mohou být v singletním nebo tripletním stavu. Tyto elektronově excitované molekuly a jejich energie jsou znázorněny na obr. 2. Zářivý přechod tripletního excitovaného karbonylu do základního stavu je spojen s emisí fotonů v spektrálním rozmezí 350–550 nm. Za přítomnosti pigmentů v živých organismech, jako je lidská kůže (melanin) nebo fotosyntetické organismy (chlorofyl) může být tripletní excitační energie karbonylů přenesena na pigmenty za vzniku singletních (550–750 nm) a tripletních (750–1 000 nm) excitovaných molekul pigmentů. V přítomnosti molekulárního kyslíku může být excitační energie tripletních karbonylů přenesena

na molekulární kyslík za vzniku singletního kyslíku. Kolize dvou molekul singletního kyslíku vede k dimolové emisi v červené oblasti spektra při vlnových délkách 634 nm a 703 nm, zatímco monomolová emise singletního kyslíku je v infračervené oblasti spektra (1 270 nm).

### Jak měřit ultraslabou emisi fotonů?

Ultraslabá emise fotonů má kromě velice nízké intenzity i difuzní charakter a je inherentně nestacionární, což je potřeba zohlednit v návrhu vhodného měřicího systému a metod analýzy signálu. Měření ultraslabé emise fotonů vyžaduje použití detektorů, které mají velice nízký vlastní šum (temnostní proud) a vysokou účinnost detekce (kvantovou účinnost). Pro prostorově integrální měření ultraslabé emise fotonů se využívají nejvíce fotonásobiče. Pro její zobrazování se používají speciální CCD kamery se zpětným osvětlením snímače nebo využívajícím násobení elektronů (obr. 3). Zobrazování má význam v případech, kdy je prostorová distribuce ultraslabé emise fotonů z měřeného objektu nehomogenní. Detektory se pro snížení šumu často chladí hluboko pod úroveň pokojové teploty, běžně na  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  až  $-100\text{ }^\circ\text{C}$ . Měření musí probíhat za vyloučení všech ostatních nechtěných zdrojů světla, tedy ve speciálních světlotěsných komorách a místnostech.

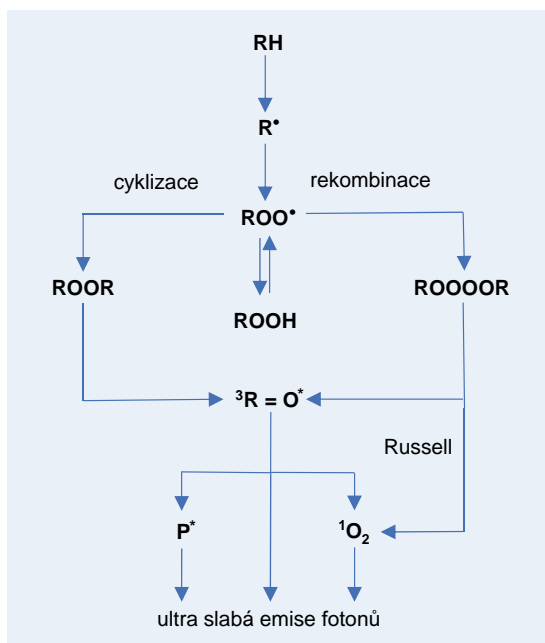
Znalost spektrálního složení ultraslabé emise fotonů z různých biologických systémů je důležitá nejenom z hlediska objasnění mechanismů, které ji generují, ale také pro diagnostické využití. Měření spekter ultraslabé emise fotonů je však často náročné kvůli nízké intenzitě a také v důsledku jejího difuzního charakteru a nestacionarity. Její detekovatelnou intenzitu snižuje kolimace, která je potřebná pro vysoké spektrální rozlišení při použití interferenčních filtrů nebo disperzních elementů, a také samotné spektrální filtrování. Běžné metody ke zvýšení odstupu signálu od šumu, jako je například časové integrování signálu, jsou často omezeny v důsledku nestacionarity ultraslabé emise fotonů. Tato nestacionarita má původ v dynamice biochemických a biologických procesů, které ultraslabou emisi fotonů generují. Perspektiva měření ultraslabé emise fotonů proto spočívá zejména ve zdokonalení, vývoji a rozšíření nových typů detektorů světla s vysokou účinností detekce a minimálním šumem. Tato zařízení jsou například kryogenicky chlazené detektory na bázi změny kinetické indukce jednotlivých



**Obr. 3** Ukázka jedné z měřicích aparatur využívaných autory k měření ultraslabé emise fotonů. Pro detekci se používá fotonásobič s nízkým šumem nebo kryogenicky chlazená CCD kamera.

» Měření ultraslabé emise fotonů vyžaduje použití detektorů, které mají velice nízký vlastní šum a vysokou účinnost detekce. «

» Spektrum a intenzita ultraslabé emise fotonů mohou být využity k monitorování odezvy různých druhů rostlin na působení stresu rozličného typu. «



**Obr. 4** Molekulární mechanismus tvorby elektronově excitovaných molekul. RH – lipid nebo protein; R• – alkylový radikál; ROO• – peroxylový radikál; ROOH – hydroperoxid; ROOR – dioxetan; ROOOOR – tetroxid;  $^3R = O^*$  – tripletní excitovaný karbonyl; P\* – excitovaný pigment;  $^1O_2$  – singletní kyslík.

mikrovlňných rezonančních obvodů, které tvoří pixely detekčního čipu. Tyto detektory mají prakticky nulový šum a umožňují určení energie každého detekovaného fotonu v pásmu 200–3000 nm s kvantovou účinností mezi 0,2 až 0,8 s počtem několika tisíc pixelů na zobrazovacím čipu [3].

### Jaké molekulární mechanismy generují ultraslabou emisi fotonů?

Oxidativní procesy v živých organismech jsou úzce spjaty s oxidací biomolekul (lipidy nebo proteiny) a následně s tvorbou elektronově excitovaných stavů molekul [4, 5]. Oxidace biomolekul spojená s tvorbou elektronově excitovaných stavů může být zahájena reaktivními formami kyslíku (hydroxylový radikál) [6] nebo enzymaticky (lipoxygenáza) [7]. Vytržení vodíkového atomu (protonu a elektronu) z molekuly lipidu nebo proteinu hydroxylovým radikálem nebo lipoxygenázou vede k tvorbě lipidového nebo proteinového alkylového radikálu. Interakce alkylového radikálu a molekulárního kyslíku vytvoří peroxylový radikál, který může způsobit vytržení vodíkového atomu z další molekuly lipidu nebo proteinu za vzniku dalšího alkylového radikálu a hydroperoxidu. Za oxidačních podmínek může být hydroperoxid zpět oxidován na peroxylový radikál, který může cyklizovat na dioxetan nebo rekombinovat na tetroxid. Rozpad dioxetanu nebo tetroxidu vede k tvorbě tripletního excitovaného karbonylu, který může přenášet tripletní excitační energii na pigmenty za vzniku excitovaných pigmentů nebo na molekulární kyslík za vzniku singletního kyslíku. Alternativně může singletní kyslík vzniknout přímo dekompozicí tetroxidu tzv. Russellovým mechanismem [8] (obr. 4).

### K čemu lze ultraslabou emisi fotonů využít?

Ultraslabá emise fotonů nese informaci o procesech, které ji generují, tedy o oxidativních procesech probí-

hajících v biologických systémech. Tato informace je obsažena v intenzitě, spektru a prostorové distribuci. Někteří autoři navrhuji, že užitečná informace je obsažena také ve statistických vlastnostech ultraslabé emise fotonů [9]. Oxidativní procesy, které jsou vyvolané stresem, jsou často spojovány se vznikem mnohých onemocnění [10]. Obecně tedy lze předpokládat, že se ultraslabá emise fotonů dá využít pro diagnostické účely v biologických vědách. Hlavní předností této diagnostické metody je její kompletní neinvazivnost, absence potřeby kontrastních látek, barviv či vnější excitace a také její rychlost a nízké provozní náklady. Pionýrské využití ultraslabé emise fotonů je zejména v zemědělském a biomedicinském výzkumu. Bylo zjištěno, že spektrum a intenzita ultraslabé emise fotonů mohou být využity k monitorování odezvy různých druhů rostlin na působení různých typů biotického (patogeny) a abiotického (UV záření, teplota, herbicidy, sucho, sůl) stresu [11]. V biomedicíně je několik aplikací směrů, kde byly zkoumány korelace parametrů ultraslabé emise fotonů a biologických procesů. Právě z hlediska přímočaré optické dostupnosti kůže se dermatologie zdá být jedním z oborů, kde může najít ultraslabá emise fotonů využití. Například bylo ukázáno, že lokální aplikace reaktivních forem kyslíku na kůži nebo poškození kůže UV zářením vyvolá zvýšení intenzity ultraslabé emise fotonů, zatímco přidání antioxidantů intenzitu naopak snižuje [12–15]. Tyto práce ukazují, že parametry ultraslabé emise fotonů mohou být využity ke sledování oxidativních procesů v kůži. Studie z oblasti neurověd ukázaly, že neuronální aktivity včetně théta pásma elektroencefalografického signálu u potkanů koreluje s intenzitou ultraslabé emise fotonů z mozku [16]. Autoři těchto prací navrhuji, že ultraslabá emise fotonů by mohla sloužit jako nová metoda pro extrakci patofyziologických procesů spojených s neuronálním metabolismem a oxidativní dysfunkcí mozku. Intenzita ultraslabé emise fotonů také koreluje s růstem a viabilitou nádorů [17], což naznačuje možnost jejího použití v onkologii.

### Závěr a perspektivy

Ultraslabá emise fotonů z biologických systémů je dobře prokázaným fenoménem, který má také dobře rozvinutý koncepční rámec generujících mechanismů. V posledních desetiletích se otevírá možnost využití ultraslabé emise fotonů v oblasti neinvazivní a nízkonákladové diagnostiky. Dochází k tomu zejména díky kombinaci základních znalostí molekulárních mechanismů daného fenoménu a vývoje nízkošumových a citlivých detektorů slabých toků fotonů. Pro plné využití v diagnostice a správnou interpretaci je potřeba



**Obr. 5** Ilustrace aplikací ultraslabé emise fotonů v zemědělském výzkumu, dermatologii, neurovědách a v onkologii

přesná charakterizace elektronově excitovaných molekul odpovědných za ultraslabou emisi fotonů. Zároveň zůstává otevřená otázka, zda ultraslabá emise fotonů může být využita nejenom pro diagnostické účely, ale také jestli je využívána v biologických systémech samotných pro vnitrobuněčné a mezibuněčné interakce [18–20].

#### Poděkování

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře ČR (projekt č. GP13-29294S, Fotonické biosignály: měření a charakterizace), MŠMT (projekt č. LO1204, Udržitelný rozvoj výzkumu Centrum regionu Haná z Národního programu udržitelnosti I) a firmě Smartbrain, s. r. o.

#### Literatura

- [1] A. Prasad, P. Pospíšil: *Sci. Rep.* **3**, 1211 (2013).
- [2] M. Cifra, P. Pospíšil: *J. Photochem. Photobiol. B* **139**, 2 (2014).
- [3] B. Mazin a kol.: *Publ. Astron. Soc. Pac.* **125**, 1348 (2013).
- [4] M. Havaux a kol.: *Trends Plant Sci.* **11**, 480 (2006).
- [5] P. Pospíšil a kol.: *J. Photochem. Photobiol. B* **139**, 11 (2014).
- [6] M. Rác a kol.: *Sci. Rep.* **5**, 8882 (2015).
- [7] A. Prasad, P. Pospíšil: *PLoS ONE* **6**(7), e22345 (2011).
- [8] S. Miyamoto a kol.: *IUBMB Life* **59**, 322 (2007).
- [9] M. Cifra a kol.: *J. Lumin.* **164**, 38 (2015).
- [10] B. N. Ames a kol.: *PNAS* **90**, 7915 (1993).
- [11] K. Kato a kol.: *J. Photochem. Photobiol. B* **139**, 54 (2014).
- [12] H. Ou-Yang a kol.: *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1020 (2004).
- [13] A. Prasad, P. Pospíšil: *J. Biophoton.* **4**, 840 (2011).
- [14] A. Rastogi, P. Pospíšil: *J. Biomed. Opt.* **16**, 096005 (2011).
- [15] A. Prasad, P. Pospíšil: *J. Biomed. Opt.* **17**, 085004 (2012).
- [16] M. Kobayashi a kol.: *Neurosci. Res.* **34**, 103 (1999).
- [17] M. Takeda a kol.: *Cancer Sci.* **95**, 656 (2004).
- [18] O. Kučera a M. Cifra: *Cell Comm. Signal.* **11**, 87 (2013).
- [19] A. Prasad a kol.: *J. Photochem. Photobiol. B* **139**, 47 (2014).
- [20] F. Laager: *Front. Phys.* **3**, 55 (2015).