

ČESKÉ VYSOKÉ TECHNICKÉ UČENÍ V PRAZE

FAKULTA ELEKTROTECHNICKÁ  
KATEDRA TEORIE OBVODŮ



# DIPLOMOVÁ PRÁCA

Optimalizácia merania a analýza  
vybraných fyzikálnych a chemických  
vplyvov na ultra slabú emisiu  
fotónov z ľudskej ruky

Autor:	Bc. Beáta Ondrušová
Vedúci práce:	prof. Ing. Jan Vrba, CSc.
Konzultanti:	Ing. Michal Cifra, Ph.D. Ing. Michaela Poplová

Praha, Máj 2016

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

**Student:** Bc. Beáta Ondrušová

**Studijní program:** Biomedicínské inženýrství a informatika

**Obor:** Biomedicínské inženýrství

**Název tématu:** Optimalizace měření a analýza vybraných fyzikálních a chemických vlivů na ultra slabou emisi fotonů z lidské ruky

### Pokyny pro vypracování:

1. Seznamte se studiem literatury s problematikou ultra-slabé emise fotonů se zaměřením na lidské subjekty.
2. Z literatury nastudujte a popište endogenní mechanismy, které generují v biosystémech elektronově excitované stavy s následnou emisí fotonů, se zaměřením na procesy v kůži.
3. Seznamte se s laboratorním systémem pro měření nízkých toků světla a optimalizujte jeho nastavení pro detekci záření z lidského těla.
4. Provedte analýzu vlivu teploty a anti- a prooxidativních procesů na parametry ultra slabé emise fotonů z lidské ruky.

### Seznam odborné literatury:

- [1] M. Cifra and J. Pospíšil: Ultra-weak photon emission from biological samples: Definition, mechanisms, properties, detection and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 139, 2-10, 2014. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.009
- [2] P. Pospíšil, A. Prasad, M. Rác: Role of reactive oxygen species in ultra-weak photon emission in biological systems, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 139, 11-23, 2014. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.008
- [3] Khabiri, Faryar, et al.: Non-invasive monitoring of oxidative skin stress by ultraweak photon emission (UPE)-measurement. I: mechanisms of UPE of biological materials. *Skin Research and Technology* 14(1), 103-111, 2008, doi: 10.1111/j.1600-0846.2007.00205.x

**Vedoucí diplomové práce:** prof. Ing. Jan Vrba, CSc.

**Platnost zadání:** do konce letního semestru 2016/2017

L.S.

prof. Ing. Pavel Sovka, CSc.  
**vedoucí katedry**

prof. Ing. Pavel Ripka, CSc.  
**děkan**

V Praze dne 16. 12. 2015

# Anotácia

Diplomová práca je zameraná na detekciu ultra slabej emisie fotónov z rúk ľudského subjektu. V teoretickej časti popisuje mechanizmy generovania elektrónových excitovaných stavov s následnou emisiou fotónov, zhŕňa doterajšie výsledky výskumu so zameraním na ľudské subjekty a popisuje možnosti detekcie ultra slabej emisie fotónov. Experimentálna časť práce obsahuje popis laboratórneho systému pre meranie ultra slabej emisie fotónov, ktorý ako detektor používa fotonásobič HAMAMATSU R2256-02. Práca sa zameriava na nájdenie optimalného nastavenia diskriminátora a vysokého napätia tohto fotonásobiča pre meranie ultra slabej emisie fotónov z ľudského subjektu. Nájdené nastavenie sa používa pri meraní zmien spontánnej ultra slabej emisie fotónov z palmárnej a dorzálnej strany rúk meraného subjektu a pri analýze anti- a prooxidatívnych procesov na parametre ultra slabej emisie fotónov. Súčasťou práce je analýza vplyvu povrchovej teploty a relatívnej kyslíkovej saturácie subjektu na intenzitu UPE.

**Kľúčové slová :** ultra slabá emisia fotónov, elektrónové excitované stavy, reaktívne formy kyslíka, fotonásobič, oxidant, antioxidant.

# Annotation

This thesis is focused on detecting ultra weak photon emission from the hands of human subjects. The theoretical part describes mechanisms generating electronically excited species following with photon emissions. It consists of up to date research results focused on human subjects and describes possibilities of detecting ultra weak photon emission. The experimental part contains a description of a laboratory system for measurement of ultra weak photon emission by using a photomultiplier tube HAMAMATSU R2256-02. This thesis is focused on searching for the optimal setting of a discriminator and high voltage of the photomultiplier tube, required to measure ultra weak photon emission from human subjects. Determined settings are used in measuring of a spontaneous ultra weak photon emission changes from the palmar and dorsal side of subject hands and also they are used in analysis of anti- and pro-oxidant processes on ultra weak photon emission parameters. Part of the work is an analysis of the effect of surface temperature and relative oxygen saturation of a subject on the ultra weak photon emission intensity.

**Key words :** ultra weak photon emission, electronically excited species, reactive oxygen species, photomultiplier tube, oxidant, antioxidant.

# Prehlásenie autora práce

Prehlasujem, že som predloženú prácu vypracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje v súlade s Metodickým pokynom o dodržiavaní etických princípov pri príprave vysokoškolských záverečných prác.

V Prahe dňa 27.5.2016.

Podpis autora práce

# Pod'akovanie

Touto cestou ďakujem pánovi prof. Ing. Janovi Vrbovi, CSc. za jeho odborné vedenie mojej diplomovej práce. Ďakujem pánovi Ing. Michalovi Cifrovi, Ph.D., za to, že mi umožnil podieľať sa na tomto projekte a za jeho podnetné odborné rady. Tiež ďakujem pani Ing. Michaele Poplovej za jej pomoc pri príprave experimentov a pri spracovaní tejto diplomovej práce. Ďakujem pánovi Ing. Janovi Havlíkovi, Ph.D. za zapožičanie pulzného oximetru používaného v tejto diplomovej práci.

Ďakujem všetkým zamestnancom Ústavu fotoniky a elektroniky AV ČR v.v.i., za vytvorenie priateľského prostredia a ich ústretovosť.

Ďakujem mojim rodičom, sestre a priateľovi za ich morálnu ale aj finančnú podporu počas môjho štúdia, ktorú si nesmierne vážim.

# Obsah

Úvod	1
<b>1 Súčasný stav riešenej problematiky</b>	<b>2</b>
1.1 Ultra slabá emisia fotónov	2
1.1.1 Mechanizmus vzniku UPE	2
1.1.2 Reaktívne formy kyslíka	3
1.1.3 Oxidačný stres	5
1.1.4 Antioxidačný obranný systém	6
1.1.5 Generovanie UPE	8
1.1.6 Spektrálne vlastnosti UPE	8
1.1.7 Intenzita UPE	8
1.2 UPE so zameraním na ľudské subjekty	9
1.2.1 UPE na orgánovej a celulárnej úrovni	9
1.2.2 UPE z kože ľudského tela	9
1.3 Detekcia UPE	15
1.3.1 Fotonásobič	16
1.3.2 CCD	19
<b>2 Experimentálna časť práce</b>	<b>21</b>
2.1 Experimentálne zariadenie pre meranie UPE	21
2.2 Nastavenie fotonásobiča R2256-02	25
2.2.1 Závislosť počtu detekovaných pulzov na napájacom napätí fotonásobiča	25
2.2.2 Optimalizácia nastavenia fotonásobiča	27
2.3 Spontánne zmeny UPE	33
2.3.1 Informácie o meranom subjekte	33
2.3.2 Oneskorená luminiscencia	33
2.3.3 Postup merania	34
2.3.4 Spracovanie nameraných dát spontánnej UPE	34
2.3.5 Spontánne zmeny UPE počas dňa	38
2.3.6 Spontánne zmeny UPE počas meraných dní	40
2.3.7 Vplyv spontánnych zmien teploty na intenzitu UPE	42
2.3.8 Vplyv $S_pO_2$ na intenzitu UPE	43
2.4 Zmeny UPE vyvolané aplikáciou oxidantu	45
2.4.1 Luminiscencia $H_2O_2$	45
2.4.2 Porovnanie $H_2O$ a $H_2O_2$	46
2.4.3 Vplyv aplikovaného objemu $H_2O_2$ na intenzitu UPE	47
2.4.4 Opakovaná aplikácia oxidantu	48
2.4.5 Aplikácia rôznych koncentrácií $H_2O_2$	49
2.5 Zmeny UPE vyvolané aplikáciou antioxidantu	54
2.5.1 Interakcia $H_2O_2$ a kyseliny askorbovej	54
2.5.2 Opakovaná aplikácia kyseliny askorbovej	55
2.5.3 Ľavo – pravá symetria jednej ruky	57
2.5.4 Efekt ošetrenia kože kyselinou askorbovou	59
<b>Diskusia</b>	<b>61</b>
<b>Záver</b>	<b>63</b>

# Úvod

Ultra slabú emisiu fotónov môžeme pozorovať u metabolicky aktívnych systémov, od baktérii a rastlín až po človeka. Ide o veľmi slabé svetlo, ktoré nie je možné zaznamenať voľným okom. Použitím vhodných detekčných nástrojov zistíme, že intenzita tohto svetla dosahuje hodnoty desiatok až stoviek fotónov/s·cm<sup>2</sup>. Základný mechanizmus vzniku ultra slabej emisie fotónov nie je ešte plne objasnený, ale výskum v danej oblasti naznačuje, že ultra slabá emisia fotónov súvisí s oxidačno-metabolickými procesmi a oxidatívnymi stresovými procesmi, ktoré sú spojené s produkciou reaktívnych foriem kyslíka. Meraním ultra slabej emisie fotónov môžeme získať informáciu o miere oxidatívneho metabolizmu, čo môže nájsť potencionálne využitie v medicíne. Oxidačný stres urýchľuje procesy starnutia a môže viesť k poškodeniu biologických membrán, k rozvoju infekcií, aterosklerózy, kardiovaskulárnych onemocnení. Keďže hlavným zdrojom fotónovej emisie je u človeka povrchová vrstva kože, môže meranie ultra slabej emisie fotónov predstavovať neinvazívny diagnostický nástroj ochorenia kože.

Prvá kapitola práce obsahuje prehľad súčasného stavu riešenej problematiky. Popisuje endogénne mechanizmy generovania elektrónových excitovaných stavov s následnou emisiou fotónov, zhŕňa doterajšie výsledky výskumu ultra slabej emisie fotónov so zameraním na ľudské subjekty a popisuje možnosti detekcie.

Druhá kapitola diplomovej práce obsahuje výsledky experimentov uskutočnených na jednom meranom subjekte. Pre uskutočnenie týchto experimentov zameraných na meranie ultra slabej emisie fotónov je dôležité najskôr nájsť najvhodnejšie nastavenie detektora nízkych úrovní svetla, ktorým je v tomto prípade fotonásobič HAMA-MATSU R2256-02. Nájdene nastavenie sa potom používa v ďalších častiach práce, ktoré sú zamerané na analýzu spontánnych a indukovaných zmien ultra slabej emisie fotónov. Analýza spontánnych zmien ultra slabej emisie fotónov prebiehala počas 5 dní. Počas každého dňa bolo uskutočnených 5 sád meraní. Pri meraní spontánnej ultra slabej emisie fotónov bola zaznamenávaná povrchová teplota subjektu a relatívna kyslíková saturácia pre účely korelačnej analýzy. Posledná časť práce predstavuje analýzu zmien ultra slabej emisie fotónov po aplikácií exogénnych oxidantov a antioxidantov na pokožku rúk. Ako oxidant bol zvolený peroxid vodíka v troch rôznych koncentráciách a ako antioxidant bola zvolená kyselina askorbová.



## Kapitola 1

# Súčasný stav riešenej problematiky

## 1.1 Ultra slabá emisia fotónov

Biologické systémy neustále emitujú slabé svetlo bez akýchkoľvek vonkajších podnetov alebo dodatočne aplikovaných vonkajších luminofórov. Intenzita tohto slabého endogénneho svetla je modifikovateľná použitím externých stresorov. Tento fenomén, najčastejšie nazývaný ako ultra slabá emisia fotónov (UPE, Ultra-weak photon emission) je prítomný prakticky vo všetkých metabolicky aktívnych systémoch, ako sú napr. baktérie, huby, klíčiace semenná, rastliny, zvieracie tkanivové štruktúry i celé organizmy vrátane človeka. V literatúre sa môžeme stretnúť s alternatívnymi názvami ako autoluminiscencia, slabá luminiscencia, biofotónová emisia, spontánna chemiluminiscencia, spontánna ultra slabá emisia svetla, ultra slabá bioluminiscencia [1].

Za vznik UPE sú vo všeobecnosti zodpovedné elektronové excitované stavy molekúl tvorené počas oxidatívnych metabolických procesov. UPE odlišuje od bežnej bioluminiscencie práve spontánna emisia fotónov bez špeciálnych luminiscenčných enzymatických systémov (napr. luciferín/luciferáza). UPE sa líši od fluorescencie a fosforescencie tým, že existuje aj bez vonkajšej stimulácie[1].

### 1.1.1 Mechanizmus vzniku UPE

UPE má pôvod v relaxácii elektronových excitovaných stavov tvorených v biologických systémoch. Elektronové excitované stavy sú tvorené behom oxidatívnych metabolických procesov a oxidatívnych stresových procesov, ktoré sú spojené s tvorbou reaktívnych foriem kyslíka (ROS, Reactive Oxygen Species). Oxidácia lipidov, proteínov a nukleových kyselín ROS vedie k tvorbe vysoko energetických medziproduktov. Rozkladom týchto medziproduktov sa vytvárajú elektronicky excitované stavy, ktoré podliehajú elektronickému prechodu zo singletového alebo tripletového excitovaného stavu do singletového základného stavu. Prechod elektronových excitovaných stavov je doprevádzaný emisiov fotónov [2].

Na základe procesov, počas ktorých sú tvorené ROS sa v literatúre popisujú dva typy UPE. Prvým typom je spontánna UPE pochádzajúca z relaxácie elektronicky excitovaných stavov tvorených v biologických systémoch počas normálnych oxidatívnych metabolických procesov. Druhým typom

je stresom indukovaná UPE pochádzajúca z relaxácie elektronickej excitovaných stavov tvorených počas abiotických (fyzikálne, chemické) a biotických (vírusy, baktérie, huby) stresových reakcií [2].

### 1.1.2 Reaktívne formy kyslíka

ROS sú tvorené buď sekvenčnou jednoelektrónovou redukciou molekulárneho kyslíka alebo prenosom energie z tripletových excitovaných pigmentov na molekulárny kyslík. Sekvenčná jednoelektrónová redukcia molekulárneho kyslíka vedie k tvorbe superoxidového aniónového radikálu ( $O_2^{\bullet-}$ ), peroxidu vodíka ( $H_2O_2$ ) a hydroxylového radikálu ( $HO^{\bullet}$ ), pričom každý z nich má rozdielny redoxný potenciál a tak rozdielny stupeň reaktivity. Triplet-singletový prenos energie z tripletových excitovaných pigmentov na molekulárny kyslík vedie k vzniku singletového kyslíka ( $^1O_2$ ) [2].

ROS majú významnú úlohu vo fyziológii. V malom množstve sú známe ako modulátory génovej expície, hrajú rolu v bunkovej signalizácii, podieľajú sa na bunkovej proliferácii, transkripcii a apoptóze. Veľké množstvo bunkových ROS má na bunku cytotoxický efekt a vedie k apoptóze a bunkovej smrti [3].

Interakcia reaktívnych foriem kyslíka s biomolekulami iniciuje oxidačné reakcie vedúce k tvorbe nestabilných medziproduktov ako dioxetan a tetraoxid. Dioxetan je tvorený cykloadíciou  $^1O_2$  alebo cyklizáciou peroxylového radikálu, zatiaľ čo tetraoxid je tvorený rekombináciou peroxylového radikálu. Rozklad nestabilného dioxetanu a tetraoxidu vedie k tvorbe elektrónových excitovaných stavov ako tripletové excitované karbonyly [1].

K prevencii nebezpečného efektu ROS na biomolekuly sa v bunkách vytvoril neenzymatický a enzymatický antioxidačný obranný systém. Viaceré typy biotických a abiotických stresových faktorov sú známe tým, že výrazne zvyšujú tvorbu ROS. Za niektorých okolností môže tvorba ROS presiahnuť kapacitu antioxidačného systému a nebezpečné ROS sú nedostatočne eliminované. Nepomer medzi tvorbou a elimináciou ROS spôsobuje oxidáciu lipidov, proteínov a nukleových kyselín [2].

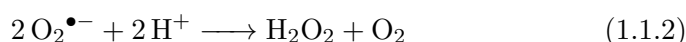
Tvorbu radikálových a neradikálových ROS môže vyvolávať, okrem iného, aj UV žiarenie a viditeľné svetlo. Endogénne pigmenty u rastlín, živočíchov, človeka ako sú porfiríny, bilirubín, melanín, pterín a urokanová kyselina sa chovajú ako fotosenzitizéry. Absorpcia UV žiarenia alebo viditeľného svetla fotosenzitizérmi vedie k vzniku singletového stavu fotosenzitizérov, ktoré vedú k tvorbe tripletového excitovaného stavu cez intersystémový prechod. Excitované fotosenzitizéry podstupujú buď prenos elektrónov, ktorý vedie k tvorbe  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$  (reakcia I typu), alebo prenos energie tvoriaci  $^1O_2$  (reakcia II typu) [2].

**1.1.2.1 Superoxidový radikál ( $O_2^{\bullet-}$ )**

$O_2^{\bullet-}$  je relatívne málo reaktívny v porovnaní s inými voľnými radikálmi, no v biologických systémoch sa premieňa do viacerých reaktívnych foriem ako peroxylový ( $ROO^{\bullet}$ ), alkoxylový ( $RO^{\bullet}$ ) a hydroxylový ( $^{\bullet}OH$ ) radikál. Primárne je  $O_2^{\bullet-}$  formovaný v bunkách redukciami kyslíka  $O_2$ :



Enzýmy ako superoxid dismutáza (SOD) vytvárajú  $H_2O_2$  pridaním dvoch protónov:

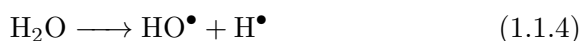


V kyslom/neutrálnom prostredí sa môže vytvárať elektroneutrálny hydroperoxylový radikál [4]:

**1.1.2.2 Hydroxylový radikál ( $HO^{\bullet}$ )**

$HO^{\bullet}$  je nasilnejším oxidantom tvoreným v biologických systémoch, ktorý reaguje veľmi rýchlo. Môže byť vytváraný *in vivo* štyrmi hlavnými procesmi:

- ionizujúcim žiarením - ožarovaním vysokoenergetickými žiaričmi vzniká  $HO^{\bullet}$  homolytickým štiepením molekuly vody (radikál tvorený týmto procesom je zodpovedný za poškodzovanie DNA a vývoj nádorov, napr. rakovina kože):



- Fentonovou reakciou:



- rozpadom peroxyinitritu;
- rozpadom ozónu [5].

**1.1.2.3 Peroxylový ( $ROO^{\bullet}$ ) a alkoxylový ( $RO^{\bullet}$ ) radikál**

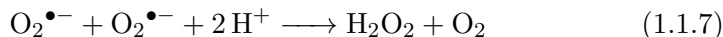
Tieto radikály bývajú vytvárané rozpadom hydroperoxidu ( $ROOH$ ) vyvolaným teplom či radiáciou, alebo  $ROOH$  reakciou s kovovými iónmi, alebo inými oxidantmi schopnými abstrahovať vodíka:



Reaktivita  $ROO^{\bullet}$  a  $RO^{\bullet}$  je ovplyvnená substituentmi na  $\alpha$ -uhlíku [5].

#### 1.1.2.4 Peroxid vodíka $\text{H}_2\text{O}_2$

$\text{H}_2\text{O}_2$  je tvorený z  $\text{O}_2^{\bullet-}$  spontánne či katalyzovane pomocou SOD:



Vo fyziologickom prostredí môže byť  $\text{H}_2\text{O}_2$  rýchlo inaktivo- vaný selen-peroxidázami, hem-peroxidázami, thiol-peroxidázami. Jeho reakti- vity je malá vzhľadom k biologickým molekulám kvôli vysokej aktivačnej energii oxidantov. Za najnebezpečnejší efekt  $\text{H}_2\text{O}_2$  je považovaná jeho schopnosť tvoriť sekundárne zlúčeniny, ktoré sú veľmi reaktívne, ako napr.  $\text{HO}^\bullet$  alebo  $\text{NO}_2^\bullet$  (radikál oxidu dusičitého) [5].

#### 1.1.2.5 Singletový kyslík $^1\text{O}_2$

$^1\text{O}_2$  predstavuje excitovaný stav  $\text{O}_2$ . Fotosenzitizácia je hlavným zdro- jom  $^1\text{O}_2$  v biologických systémoch. Tá zahŕňa fotoexcitáciu (reakcia typu II) endogénnych fotosenzitizérov (porfirín, flavín) vystavených UVA žiareniu. Tieto procesy sú špeciálne dôležité v koži. Nadmerná tvorba  $^1\text{O}_2$  je spojená s chorobnými stavmi, ako napr. porfýria.  $^1\text{O}_2$  podporuje smrť tumorových buniek, čo sa využíva vo fotodynamickej terapii [5].

$^1\text{O}_2$  môže byť tvorený nefotochemickými reakciami, ktoré zvyčajne zahŕňajú anorganické peroxidy ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxyinitrit) alebo organické hydroperoxidy (ROOH). Tvorba  $^1\text{O}_2$  bola potvrdená behom fagocytózy či lipi- dovej peroxidácie [5].

### 1.1.3 Oxidačný stres

Biologické systémy sú neustále vystavené ROS a RNS (Reactive Nitrogen Species, Reaktívne formy dusíka). ROS a RNS sa podieľajú na vzniku via- cerých patologických stavov ako ateroskleróza, reumatická artritída a iných chronických onemocnení ako rakovina, šedý zákal, diabetes melli- tus alebo neurodegeneratívnych ochorení ako Parkinsonova či Alzheim- erova choroba a starnutie. Oxidatívny stres spôsobuje poškodzujúce re- akcie, ktoré sú sprostredkované malým percentom celkového spotrebo- vaného kyslíka. Toto malé percento spotrebovaného kyslíka je transformo- vané do aktívnych kyslíkových vedľajších produktov, ktoré môžu spôsobovať oxidatívne poškodenia biologických molekúl [4].

Obranu proti poškodzujúcemu účinku ROS u organizmov po- skytuje obranný antioxidantný systém. V prípade, že koncentrácia ROS je príliš vysoká, môže dochádzať k oxidácii nukleových kyselín, lipi- dov a proteínov. Väčšina z týchto poškodení môže byť opravená. V prípade, že k oprave nedôjde dochádza k transkripčným/translačným chybám, čo vedie k neustálej tvorbe abnormálnych proteínov, ktoré môžu byť ne- funkčné či viac senzitivne na oxidáciu ROS. Schopnosť bojovať proti oxidačnému stresu klesá s vekom [4].

Lipidová peroxidácia predstavuje proces interakcie ROS s lipidmi, ktorý môže viesť k strate membránovej celistvosti [4].

Jeden z najvýznamnejších dôsledkov oxidatívneho stresu je poškodenie DNA. Vzhľadom na to, že DNA má účinné opravné mechanizmy sa iba malé množstvo poškodení stáva trvalými. Trvalé poškodenia následne vytvárajú mutácie. Oxidatívne poškodenia DNA sa akumulujú s vekom prevažne v mitochondriálnej DNA než v jadrovej DNA. Teória mitochondriálneho starnutia predpokladá, že poškodenia DNA a mutácie akumulované v mitochondriálnom genóme vedú k mitochondriálnej dysfunkcii a bunkovej smrti [4].

Ďalším cieľom oxidatívneho poškodenia spôsobeného ROS bývajú mimo lipidov, či nukleových kyselín aj proteíny. Akumulácia oxidovaných proteínov je charakteristická pre starnúce bunky. Oxidatívne poškodenie proteínov hrá dôležitú úlohu vo fungovaní bunky, pretože oxidované proteíny strácajú katalytické funkcie. Oxidatívne poškodenie špecifického proteínu vedie k čiastočnej alebo úplnej strate príslušnej biochemickej funkcie [4].

### 1.1.4 Antioxidačný obranný systém

Aerobné organizmy a teda i človek sú neustále vystavené ROS a RNS. ROS môžu spôsobiť oxidatívne poškodenie biomolekúl, preto sa vyvinul systém veľkého počtu endogénnych antioxidantov a proteínov, ktoré majú neutralizovať škodlivé účinky ROS. Rovnováha medzi tvorbou ROS a ich detoxikáciou antioxidantmi priebeha zvyčajne za normálnych fyziologických podmienok. Porušenie rovnováhy zvýšenou tvorbou ROS vedie k vzniku oxidatívneho stresu a poškodeniu tkaniva [6].

Antioxidant sa dá definovať ako substancia, ktorá bráni, redukuje alebo opravuje poškodenie ROS cielených biomolekúl. V zásade chráni pred poškodením ROS pomocou troch mechanizmov:

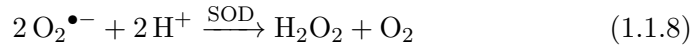
- inhibuje tvorbu ROS;
- odstraňuje už vytvorené ROS;
- opravuje poškodenia spôsobené ROS [6].

Do antioxidačného systému môžeme zaradiť antioxidanty ako SOD, CAT, GPx, vitamín E a vitamín C, ktoré sú ďalej bližšie popísané.

#### 1.1.4.1 Superoxid dismutáza (SOD)

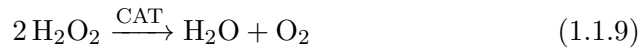
SOD sa vyskytuje v troch izoformách (Cu,ZnSOD (hlavne v cytosole), MnSOD (v mitochondriálnom matrixe) a extracelulárna SOD (v plazmatickej membráne a medzibunkovom priestore)). Všetky tri izoformy katalyzujú

vznikajúci  $O_2^{\bullet-}$  na  $H_2O_2$  a molekulárny kyslík podľa [6]:



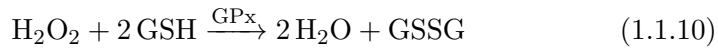
#### 1.1.4.2 Kataláza (CAT)

CAT je hem obsahujúci enzým, primárne prítomný v perioxozómoch. Je schopná katalyzovať rozklad  $H_2O_2$ , teda produkt enzymatickej aktivity SOD na vodu a molekulárny kyslík [6]:



#### 1.1.4.3 Gluthation peroxidáza (GPx)

V tkanivách cicavcov sa vyskytuje 6 izoenzýmov GPx. Všetky GPx sú schopné katalyzovať redukciu  $H_2O_2$  alebo organických hydroperoxidov (LOOH) na vodu a odpovedajúci alkohol pomocou GSH (tripeptid syntetizovaný z troch aminokyselín cez dve postupné enzymatické reakcie v cytoplazme) [6]:



#### 1.1.4.4 Vitamín E

Názov vitamín E zahŕňa skupinu tokoferolov a predstavuje fenolový antioxidant. Takéto molekuly ľahko darujú vodík z hydroxylovej skupiny ( $OH^-$ ) voľným radikálom, ktoré sa potom stávajú nereaktívnymi. Po darovaní vodíka sa fenolová zlúčenina sama stane relatívne nereaktívnym radikálom, pretože nepárový elektrón na atóme kyslíka je zvyčajne delokalizovaný do aromatickej štruktúry, čím sa zvyšuje stabilita radikálu. Vitamín E je lokalizovaný hlavne vo fosfolipidovej dvojvrstve bunkových membrán. Hlavnou úlohou vitamínu E je teda chrániť bunkové membrány a lipoproteíny s nízkou hustotou pred oxidáciou voľnými radikálmi [7].

#### 1.1.4.5 Vitamín C

Vitamín C (kyselina askorbová) je šesť-uhlíkový laktón, ktorý je syntetizovaný z glukózy. Niektoré organizmy ako primáty a človek nie sú schopné syntetizovať tento vitamín a preto ho musia prísť v potrave. Vitamín C je silným antioxidantom, pretože daruje atóm vodíka a vytvára relatívne stabilný askorbylový voľný radikál. Vitamín C je účinný proti radikálom kyslíka [7].

### 1.1.5 Generovanie UPE

UPE vzniká rozpadom elektrónových excitovaných stavov [2]. Odobratím vodíka z lipidov, proteínov a nukleových kyselín prostredníctvom  $\text{HO}^\bullet$ , dochádza k tvorbe alkylového radikálu ( $\text{R}^\bullet$ ), ktorý reaguje s molekulárnym kyslíkom a tvorí peroxylový radikál ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Neskorším odobratím elektrónu z iného lipidu, proteínu a nukleovej kyseliny sa tvorí iný  $\text{R}^\bullet$  a hydroperoxid ( $\text{ROOH}$ ).  $\text{ROOH}$  sa v prítomnosti kovu redukuje na alkoxylový radikál ( $\text{RO}^\bullet$ ). Cyklizáciou  $\text{ROO}^\bullet$  a rekombináciou dvoch  $\text{ROO}^\bullet$  sa tvoria vysokoenergetické medziprodukty ako dioxetan ( $\text{ROOR}$ ) a tetraxid ( $\text{ROOOOR}$ ). Rozpadom  $\text{ROOR}$  a  $\text{ROOOOR}$  sa vytvárajú tripletové excitované karbonyly ( $^3(\text{R}=\text{O})^*$ ). Energetickým prenosom z  $^3(\text{R}=\text{O})^*$  na pigment alebo molekulárny kyslík sa tvorí excitovaný pigment ( $\text{P}^*$ ) alebo  $^1\text{O}_2$  [2].

Počas oxidatívnych stresových procesov nastáva oxidácia biomolekúl buď odobratím vodíka  $\text{HO}^\bullet$  alebo cyklizáciou  $^1\text{O}_2$ . Tvorba  $\text{HO}^\bullet$  a  $^1\text{O}_2$  je počas stresových procesov zreteľne zvýšená v porovnaní s tvorbou ROS počas metabolických procesov. Vďaka tomu je tvorba  $\text{ROOR}$  cyklizáciou  $\text{ROO}^\bullet$  a cyklizáciou  $^1\text{O}_2$  zvýšená. Podobne i koncentrácia  $\text{ROO}^\bullet$  tvorených interakciou  $\text{R}^\bullet$  s molekulárnym kyslíkom je zvýšená. Za týchto podmienok je pravdepodobnosť rekombinácie dvoch  $\text{ROO}^\bullet$  do vysokoenergetických medziproduktov ako  $\text{ROOOOR}$  väčšia. Rozpad  $\text{ROOR}$  a  $\text{ROOOOR}$  je tak vyšší ako u spontánnej emisie fotónov [2].

### 1.1.6 Spektrálne vlastnosti UPE

Fotóny vytvorené z elektrónových excitovaných stavov sú emitované v blízkej UVA (350 - 400 nm), viditeľnej (400 - 700 nm) a blízkej IR (750 - 1300 nm) oblasti spektra. Emisia fotónov v blízkej modrozelennej oblasti spektra (350 - 550 nm) je spojená s tripletovými excitovanými karbonylmi  $^3(\text{R}=\text{O})^*$ . Emisia v zelenočervenej oblasti spektra (550 - 750 nm) pochádza z excitovaných pigmentov a dimolovej emisie  $\text{O}_2$ . Spontánna emisia fotónov na dlhších vlnových dĺžkach nebola doteraz skúmaná kvôli technickým limitáciám pri meraní veľmi nízkych signálov v blízkej IR oblasti spektra [1].

### 1.1.7 Intenzita UPE

Intenzita spontánnej UPE zo vzorky býva v rozmedzí od desiatok do niekoľko stoviek fotónov/ $\text{s}\cdot\text{cm}^2$ , čo je niekoľko rádov pod hranicou citlivosti ľudského oka, ktorá je približne  $10^6$  fotónov/ $\text{s}\cdot\text{cm}^2$ . Počet nameraných fotónov/ $\text{s}\cdot\text{cm}^2$  môže byť o jeden alebo dva rády nižší ako skutočný počet emitovaných fotónov zo vzorky v dôsledku vzdialenosti vzorky od detektora a ďalších optických faktorov ako absorpcia, rozptyl, difrakcia, odraz a lom [1].

## 1.2 UPE so zameraním na ľudské subjekty

UPE v rádoch  $10\text{--}10^4$  fotónov/s·cm<sup>2</sup> môžeme pozorovať z baktérií, kvasiniek, celých živočíchov a rastlín ale i samotných buniek pochádzajúcich z organizmov. UPE z cicavcov je študovaná na orgánovej, celulárnej a subcelulárnej úrovni [8].

### 1.2.1 UPE na orgánovej a celulárnej úrovni

Prvé štúdie preukázali závislosť medzi viacerými ochoreniami a intenzitou UPE meraním rozdielu medzi luminiscenciou krvi zdravých a chorých ľudských subjektov. UPE z krvi pacientov s diabetes mellitus, karcinómom, či hyperlipidémiou preukázala vyššiu úroveň emisie ako zo vzoriek krvi zdravých subjektov [8].

Niekoľko štúdií naznačuje, že neurónová aktivita môže korelovať s intenzitou UPE. Pri pozorovaní UPE z kultivovanej hipokampálnej vzorky bolo zistené, že pridaním tetrodotoxínu, ktorý potlačuje neuronovú aktivitu došlo k zníženiu intenzity UPE. Pri snímaní UPE z mozgu potkanov in vivo cez sklenené okno v lebke bola nájdená korelácia medzi theta vlnami EEG a intenzitou UPE. Predpokladá sa tak, že UPE z mozgu môže predstavovať novú metódu pre extrakciu patologických procesov spojených s neuronálnym metabolizmom a oxidatívnou dysfunkciou mozgu [1].

Bunkový metabolizmus sprevádzaný tvorbou ROS je často spojený s tempom bunkového rastu. Je tak vhodné merať UPE zo vzoriek, ktorých rast je veľmi rýchly, ako napr. rakovinové tkanivo. Charakteristika nameranej UPE môže nájsť potencionálne využitie ako neinvazívna a jednoduchá optická biopsia tumoru [1]. Meranie fotónovej emisie ľudských buniek hepatómu a hepatocytov v statickej bunkovej kultúre nepreukázalo zvýšenie emisie z buniek hepatómu ale preukázalo zvýšenie intenzity svetlom indukovanej emisie excitovanej bielym svetlom [9]. Preukázaný bol rozdiel v intenzite emisií medzi fázami proliferácie z maligného melanómu bunkovej kultúry, no výskum nebol uskutočnený za fyziologických podmienok [9].

Významné využitie môže nájsť meranie UPE v dermatológii, pretože UPE prezentuje hlavne oxidatívne procesy v ľudskej koži [1] a v onkologickom výskume, ako metóda optickej biopsie [9]. V ďalšej časti tejto práce sa zameriame na výsledky výskumu v oblasti sledovania oxidatívnych procesov v epidermálnych bunkách ľudskej kože.

### 1.2.2 UPE z kože ľudského tela

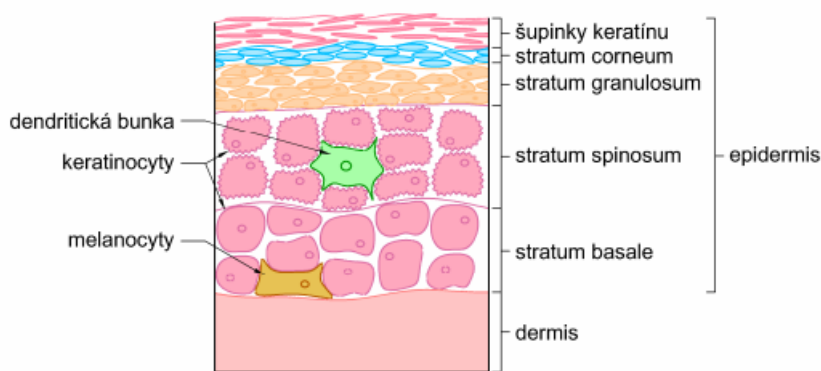
Je známe, že fotóny ľudského tela sú emitované hlavne z povrchu ľudského tela a teda hlavným príspevkom k UPE sú metabolické procesy vrstvy kože.



### 1.2.2.1 Fyziológia kože

Koža (cutis) tvorí ucelený vonkajší povrch ľudského tela. Predstavuje styčnú plochu medzi telom a prostredím a súčasne ochrannu proti jeho vplyvom. Koža dospelého človeka má povrch 1,6 až 2 m<sup>2</sup>, jej hrúbka je od 1,5 mm do 4 mm (v závislosti na anatomickej lokalizácii a na výžive) [10].

Koža je tvorená z vrstiev s rôznymi chemickými a fyzikálnymi vlastnosťami. Dve hlavné vrstvy kože, epidermis a dermis, sa pozoruhodne líšia v ich štruktúre a funkcii. Na Obr.1.1 sú zobrazené jednotlivé vrstvy kože.



Obr. 1.1: Vrstvy kože

Najvrchnejšia vrstva kože, epidermis, chráni človeka pred oxidantmi prostredia, teplom a zároveň je rezistentná voči vode, poškodeniu, mikróboom a mnohým chemikáliam. Epidermis je tvorená hlavne špecializovaným typom epitelu pozostávajúceho z viacerých vrstiev. Vrstvy majú vysokú koncentráciu protektívneho proteínu keratínu. Keratinocyty sú hlavným typom buniek, ktoré môžeme nájsť v epidermis. Sú zodpovedné za pevnosť, rozťažnosť a rezistenciu povrchu kože. Zaujímavá vrstva je stratum corneum, pretože pozostáva z relatívne tenkých listov mŕtvych buniek, sploštených buniek s hladkým a vode odolným povrchom. Povrch je prerušovaný iba vlasovými folikulmi a pórami potných žliaz. Jedným zo spôsobov ako sa koža bráni niektorým enviromentálnym stresorom je, že sa stáva hrubšou. Ak je koža opakovane vystavovaná UV žiareniu, narastá bunkové delenie v najhlbšej vrstve epidermis, stratum basale, ktorá je zdrojom epitelových buniek a tým zhrubšuje stratum corneum. Ak je stresový faktor príliš extrémny, stráca stratum corneum svoju schopnosť byť efektívnou bariérov, čo vedie k poškodeniam kože [11].

Dermis pozostáva z kombinácie kolagénových a elastických vlákien, ktoré dávajú koži pevnosť a pružnosť. Hlavnými bunkami dermis sú bunky bohaté na kolagén, tzv. fibroblasty. Produkcia kolagénových a elastických vlákien sa spomaľuje s vekom a je nepriaznivo ovplyvňovaná nadmerným vystavovaním

kože slnečnému svetlu. Uprostred spleti tkanivových vlákien môžeme v dermis nájsť systém cievneho riečiska, rozsiahlu sieť nervov, veľký počet potných žliaz, vlasové folikuly a ich svalstvo a žľazy produkúcie maz [11].

Predpokladá sa, že ultraslabé fotóny pochádzajú z vrstvy stratum corneum a životaschopného epidermisu a dermisu [1].

### 1.2.2.2 Generovanie UPE z kože ľudského tela

Koža je najokrajovejšia vrstva ľudského tela, ktorá je vystavená oxidatívne poškodeniu ROS vychádzajúcich z exogénnych fyzikálnych (ultrafialové žiarenie, teplota, mechanické poškodenie) a chemických (toxické látky, produkty metabolizmu) faktorov. Epidermis tak poskytuje ochranu proti týmto exogénnym faktorom.

Závislosť UPE z ľudskej kože na koncentrácií molekulárneho kyslíka ukazuje, že molekulárny kyslík je potrebný k reakciám, ktoré vedú k následnej emisii fotónov. Vystavenie ľudskej kože ozónu a cigaretovému dymu zvyšuje UPE, zatiaľ čo lokálna aplikácia antioxidantov na ľudskú kožu vedie k zníženiu fotónovej emisie [12].

Emisia fotónov z tela človeka nie je rozložená rovnomerne po tele. Na tele sú oblasti s relatívne vysokou UPE a oblasti s nízkou UPE. Napr. pri meraní štyroch subjektov sa priemerná intenzita UPE líšila, no špecifické oblasti s vysokou a nízkou intenzitou boli anatomicky podobné. Oblasť hrudníka a brucha mala najnižšiu intenzitu, končatiny a hlava odhalili najvyššiu úroveň. Opakované merania naznačujú, že UPE sa mení v čase, no anatomický vzor intenzity zostáva s vysokým stupňom ľavo-pravej a ventrálne-dorzálnej symetrie [13].

Pri sledovaní UPE z rúk môžeme obecné povedať, že oblasti nechtov emitujú viac svetla než zvyšok ruky [15], ako vidieť na Obr. 1.2.



Obr. 1.2: Snímok UPE z dorzálnej strany ruky [15]

Štúdium UPE z prstov vo vzťahu k hypotyreóze ukazuje možnosť merania UPE z prostredného prstu a ukazováka k rozlíšeniu hypotyreózy subjek-

tov. Výsledky ukazujú, že intenzita UPE pacientov z hypotyreóзов je vždy nižšia ako u kontrolných subjektov. Nižšia intenzita bola pozorovaná aj u pacientov, ktorí mali odstránenú štítnu žľazu [15].

Zaujímavá oblasť výskumu je spojitosť medzi meditáciou a psychickým stavom meraného subjektu a intenzitou UPE. Pri praktizovaní transcendentálnej meditácie a iných meditačných techník majú merané subjekty nižšiu emisiu fotónov pre všetky anatomické oblasti ako kontrolná skupina subjektov, ktorí nepraktizujú žiadne meditačné techniky [13].

Skúmanie vplyvu teploty a koncentrácie kyslíka na emisiu fotónov ukázalo, že s klesaním teploty dochádza k poklesu intenzity UPE z dlane ruky. Autori predpokladajú, že vplyv teploty na intenzitu UPE je založený hlavne na oxidačno-redukčných reakciách. Znížením koncentrácie kyslíka v okolí dlane ruky poklesla intenzita UPE daného miesta, naopak zvýšením koncentrácie kyslíka sa zvýšila intenzita UPE daného miesta. Výsledky tak naznačujú, že UPE pozostáva z emisie fotónov založenej na oxidačných reakciách na povrchu kože [16].

Svalová aktivita zvyšuje teplotu tela, preto sa kladie otázka, či termálne zmeny nekorelujú so zmenami intenzity UPE. Efekt cvičenia na UPE sa skúmal na zápästí subjektov, ktorý počas merania vykonávali cvičenia rukou. Počas merania došlo k malému nárastu intenzity UPE. Simultánne s emisiou sa zaznamenávala teplota kože blízko zápästia, ktorá vykazovala stabilný nárast ešte aj po skončení cvičenia. Z výsledkov autori potvrdili nekoreláciu medzi UPE a telesnou teplotou [17].

Zistené zmeny intenzity UPE viedli k tomu, že sa štúdium UPE rozdelilo na skúmanie spontánnych zmien a indukovaných zmien UPE. Skúmanie spontánnych zmien so sebou prináša značné nepohodlie pre meraný subjekt, pretože sa musí merania účastniť pravidelne po dlhší časový úsek a tak sa týchto štúdií zúčastnilo menej subjektov ako pri skúmaní indukovaných zmien [13].

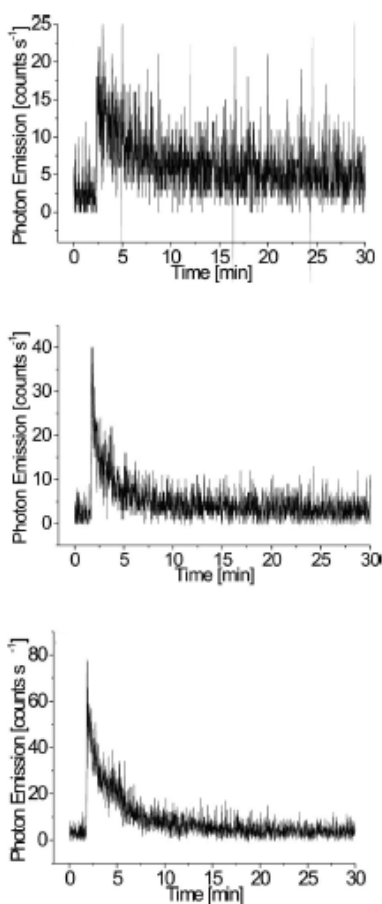
### 1.2.2.3 Spontánne zmeny UPE

Výsledky ročného merania UPE z rúk troch subjektov naznačujú, že priemerná intenzita emisie fotónov závisí na mesiacoch v roku. Sezónne výkyvy boli výraznejšie na dorzálnej strane ruky. Táto fluktuácia nemôže byť vysvetlená iba na základe externých podmienok, ako napr. expozícia slnečnému žiareniu. Autori premýšľajú o vzťahu medzi dynamikou denného a ročného rytmu UPE a yin/yang dynamikou podľa tradičnej čínskej medicíny [13].

Študovanie zmien UPE behom dňa ukazuje, že intenzita, ale i ľavo-pravá symetria sa mení v priebehu dňa. Intenzita emisie býva najnižšia behom dňa, vzrastá behom večera a najvyššia býva v noci. Výkyvy intenzity boli výraznejšie na dorzálnej strane rúk [13].

1.2.2.4 Indukované zmeny UPE

Vplyv ROS na emisiu fotónov z rúk je študovaný pomocou aplikácie exogénnych oxidantov a antioxidantov na pokožku rúk. Po lokálnej aplikácii  $H_2O_2$  dochádza k zvýšeniu intenzity UPE. Výrazný nárast je sprevádzaný pomalým návratom do ustáleného stavu, ako vidieť na Obr.1.3. Vyšší nárast UPE ako po aplikácii  $H_2O_2$  dosiahneme lokálnou aplikáciou  $O_2^{\bullet-}$  a najvyšší po aplikácii  $HO^{\bullet}$  [14]. Po aplikácii antioxidantov dochádza k zníženiu emisie fotónov [12].



Obr. 1.3: Indukovaná UPE z dorzálnej strany ruky (hore – indukovaná UPE po aplikácii  $O_2^{\bullet-}$  (25 mM xantín + 0,05 U ml<sup>-1</sup> xantín oxidáza), v strede – indukovaná UPE po aplikácii  $H_2O_2$  (50 mM  $H_2O_2$ ), dole – indukovaná UPE po aplikácii  $HO^{\bullet}$  (50 mM  $H_2O_2$  + 10 mM  $FeSO_4$ )) [14]

Koža človeka je každý deň vystavená UVA žiareniu, preto je významnou oblasťou skúmania UVA indukovanej UPE. Koža je schopná zotaviť sa z malej dávky žiarenia, ale chronická expozícia žiareniu vedie k rozvoju elastózy, k štruktúrnym zmenám spojivového tkaniva a dokonca k vzniku rakoviny. Metódy merania UPE tak môžu pomôcť študovať viaceré dôležité problémy v kožnej fotobiológii, ako napr. ako sa koža zotavuje z malej dávky UVA expozície a z akej dávky sa už nie je schopná zotaviť. Na základe súčasného výskumu vieme, že dávka UVA žiarenia  $0,5 \text{ J/cm}^2$ , ktorá je ekvivalentná pár minútam strávených na slnečnom svetle môže vyvolať prechodné ale merateľné zmeny oxidatívneho stavu kože. Expozícia  $2 \text{ J/cm}^2$  širokopásmového UVA žiarenia, ktorá odpovedá asi 10 minútam strávených na slnečnom svetle predlžuje zotavenie kože na viac ako 5 minút. Čím vyššia dávka UVA žiarenia, tým dlhší čas trvá koži sa zotaviť [18].

### 1.2.2.5 Využitie merania UPE v dermatológií

Koža, ako naša najvrchnejšia vrstva tela, predstavuje vhodný cieľ pre in vivo UPE štúdie, pretože fotóny nemusia prejsť cez iné tkanivá pred ich zachytením detekčným zariadením [18].

Medzi výhody merania UPE z kože patrí neinvazívnosť metódy oproti iným metódam, ako napr. biopsia kože. Meranie prebieha v nepretržitom režime, čo umožňuje detailné profilovanie kože za rôznych podmienok, rôznych procedúr a stimulov. Vzhľadom na to, že meranie UPE poskytuje informáciu priamo spojenú s ROS v koži, môže byť potenciálne použité ako diagnostický nástroj spojený so štúdiom oxidatívneho stavu kože [18].

Nevýhodou je, že meraním UPE nemôžeme získať detailnú biochemickú informáciu o oxidačných procesoch kože, preto by bolo vhodné meranie UPE kombinovať s inými fyzikálno-chemickými technikami, ako napr. s fluorescenčnými metódami. Ďalej je dôležité brať na vedomie, že koža je tvorená vrstvami a optické vlastnosti sú rôzne v rôznych vrstvách [18].

Vďaka výhodám a napriek nevýhodám môže meranie UPE nájsť svoju úlohu napr. pri vývoji opaľovacích krémov, či kozmetiky obsahujúcej antioxidanty, môže pomôcť pri štúdiu kožných problémov ako akné alebo porfýria. V neposlednom rade môže byť meranie UPE použité pri skúmaní rakoviny [18].

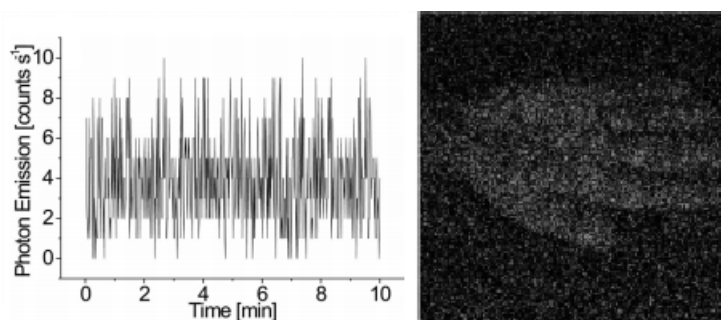
### 1.3 Detekcia UPE

Obečne môžeme rozdeliť detekčné techniky na tie, ktoré poskytujú informáciu o integrálnej intenzite bez priestorového rozlíšenia alebo priestorovo rozlíšenú intenzitu UPE zo vzorky. Pri meraní UPE zo vzorky musíme brať do úvahy, že biologická vzorka je zdrojom difúzneho svetla, a preto musíme použiť vhodné detekčné techniky a optické prvky. Existuje viacero typov fotodetektorov [1].

Tie najvhodnejšie pre meranie nízkej úrovne svetla majú niekoľko spoločných rysov:

- vysoké prúdové zosilnenie;
- malý šum na jednotku plochy citlivej oblasti detektora;
- vysoká kvantová účinnosť;
- režim jedno-fotónovej detekcie [1].

Pre detekciu UPE sa štandardne používa fotonásobič, ktorý má veľmi nízky šum na jednotku plochy citlivej oblasti fotokatódy, má vysoké zosilnenie ( $10^5 - 10^7$ ), primeranú kvantovú účinnosť a časové rozlíšenie v rádoch *ns*. Snímanie UPE s vysokým priestorovým rozlíšením môžeme dosiahnuť iba s použitím nábojovo viazanej štruktúry CCD. Pre získanie obrazu sa expozičný čas pohybuje od 15 min do 60 min [1]. Na Obr.1.4 je vidieť rozdiel medzi výstupom merania UPE pomocou fotonásobiča a pomocou CCD. Pri použití fotonásobiča získame jednorozmerný signál, teda priebeh UPE v čase a pri použití CCD získame dvojrozmernú snímku.



Obr. 1.4: Možnosti detekcie UPE (Vľavo – spontánna UPE meraná z palmárnej strany ruky pomocou fotonásobiča, vpravo – snímka spontánnej UPE z palmárnej strany ruky získaná pomocou CCD) [14]

Pri porovnávaní počtu detekovaných fotónov z rôznych detekčných systémov laboratórií musíme byť opatrný, pretože vždy musíme

brať do úvahy veľkosť vzorky, vzdialenosť vzorky od detektoru, veľkosť plochy citlivej oblasti detektora, spektrálnu citlivosť a optické prvky, ktoré môžu spôsobiť rozdiel o niekoľko rádov [1].

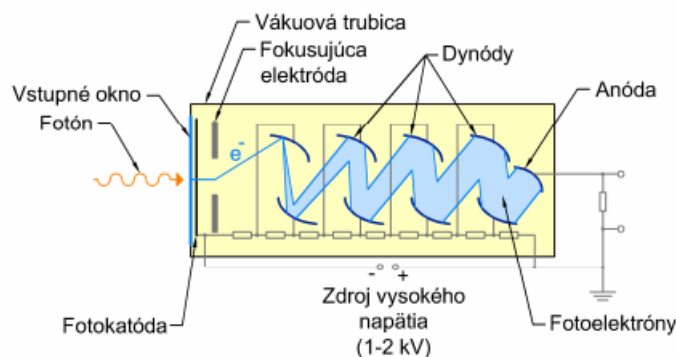
Pri detekcii UPE je základným cieľom nazbierať čo najviac fotónov zo vzorky. To dosiahneme tak, že vzorku umiestnime čo najbližšie k detektoru, pretože intenzita UPE klesá so vzdialenosťou  $r$  približne v pomere  $1/r^2$  (platí pre difúzne svetelné zdroje, ktorých veľkosť je menšia ako svetlocitlivá oblasť detektora). Obecným pravidlom tak je, že povrch vzorky by mal byť rovnaký alebo väčší ako svetlocitlivá oblasť detektora [1].

Efektívne fokusovanie difúzneho svetla, ako je UPE, je komplikované. Zrkadlá a odrazové plochy môžu byť použité k zvýšeniu zberu fotónov. UPE je polychromatické žiarenie, takže ak použijeme transmisné optické elementy k fokusovaniu svetla, musíme brať do úvahy problémy s chromatickou aberáciou optiky [1].

### 1.3.1 Fotonásobič

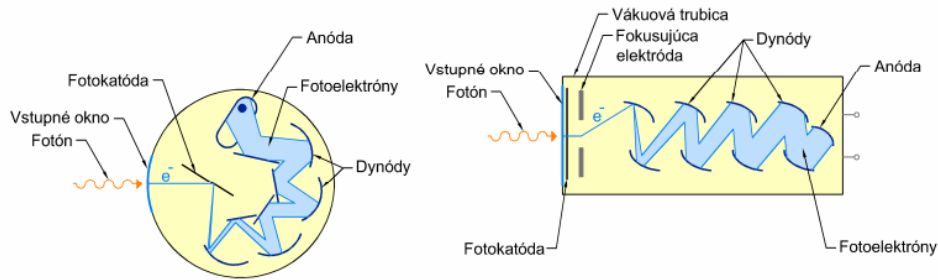
Fotonásobič je veľmi citlivý senzor svetla, ktorého prúdový výstup je priamo úmerný intenzite svetla. Umožňuje merať akýkoľvek proces, ktorý priamo alebo nepriamo emituje svetlo. Veľkoplošná detekcia svetla, vysoké zosilnenie a schopnosť detekovať jednotlivé fotóny dávajú fotonásobiču zreteľné výhody oproti iným svetelným detektorom [19].

Svetlo dopadá na fotokatódu, ktorá emituje elektróny vonkajším fotoelektrickým javom. Tieto fotoelektróny sú potom elektrostaticky urýchľované a fokusované na prvú dynódu elektrónového multiplikátora. Pri náraze každý elektrón uvoľňuje rad sekundárnych elektrónov, ktoré sú v poradi elektrostaticky urýchľované a zamerané na ďalšiu dynódu. Tento proces sa opakuje na každej dynóde, sekundárne elektróny z poslednej dynódy sú zhromažďované na anóde [19]. Konštrukciu fotonásobiča môžeme vidieť na Obr.1.5.



Obr. 1.5: Konštrukcia fotonásobiča

Fotokatóda má fotoemisný povrch obvykle tvorený alkalickými kovmi. Fotokatóda býva v dvoch konfiguráciách. Typ *head on* má polopriehľadnú fotokatódu uloženú na vnútornej ploche vstupného okna. Ide o tzv. transmisný mód, kedy je fotoelektrón emitovaný z opačnej strany fotokatódy vzhľadom k dopadu fotónu. Typ *side on* predstavuje reflexný mód, fotoelektrón býva emitovaný proti dopadajúcemu fotónu. Svetlo dopadá cez sklenený obal na fotokatódu, ktorá je umiestnená na bočnej strane obalu [19]. Rozdiel medzi transmisným a reflexným módom prezentuje Obr.1.6.



Obr. 1.6: Vľavo – reflexný mód, vpravo – transmisný mód fotokatódy

Citlivosť fotokatódy popisuje účinnosť konverzie fotónov do fotoelektrónov. Vzťah medzi citlivosťou fotokatódy a vlnovou dĺžkou sa nazýva spektrálna odozva. Na určenie odozvy fotokatódy sa používajú veličiny ako kvantová účinnosť, rezponzivita, a svetelná citlivosť [19].

**Kvantová účinnosť** ( $\eta(\lambda)$  alebo **QE%**) udáva pomer výstupných elektrických pulzov k počtu dopadajúcich fotónov. Celková kvantová účinnosť  $\eta$  je súčinom priepustnosti vstupnej optiky, účinnosti naviazania svetla do materiálu detektoru, účinnosti konverzie z fotónu na fotoelektrón a účinnosti zberu primárnych konvertovaných nábojov [20].

**Rezponzivita** ( $E(\lambda)$ ) je definovaná ako prúd fotokatódy emitovaný na watt dopadajúceho žiarenia pri vlnovej dĺžke  $\lambda$  a je vyjadrená v mA/W. Vzťah medzi rezponzivitou a kvantovou účinnosťou je vyjadrený ako [19]

$$E(\lambda) = \frac{\lambda\eta(\lambda)}{1.24} \quad (1.3.1)$$

**Svetelná citlivosť** ( $S$ ) je najdôležitejšou špecifikáciou pre svetelné zdroje, ktoré majú spektrálnu odpoveď odpovedajúcu ľudskému oku [19]. Ľudské oko je citlivé na elektromagnetické žiarenie s vlnovou dĺžkou medzi 400 a 760 nm. Štandardné hodnoty relatívnej svetelnej účinnosti oka ( $V(\lambda)$ ) boli prijaté Medzinárodnou komisiou pre osvetlenie (CIE) a schválené Medzinárodným výborom pre miery a váhy (CIPM) [21]. Hodnoty  $S$  sa pohybujú v rozmedzí od 20  $\mu\text{A}/\text{lm}$  do viac ako 400  $\mu\text{A}/\text{lm}$  v závislosti na type fotokatódy [19].

Fotoelektróny z fotokatódy sú urýchľované elektrickým poľom priamo



na prvú dynódu, kde dochádza k emisii sekundárnych elektrónov. Tieto elektróny narážajú na ďalšie dynódy, kde dochádza k emisii ďalších elektrónov. Opakovaním tohto procesu cez všetky nasledujúce dynódy sa dosahuje vysoké prúdové zosilnenie. Veľmi malý fotoelektrický prúd z fotokatódy môže byť tak sledovaný ako veľký výstupný prúd anódy fotonásobiča. Zisk (prúdové zosilnenie) je vyjadrený ako pomer anódového výstupného prúdu k fotoelektrickému prúdu fotokatódy. Ideálne by mal byť zisk fotonásobiča majúceho  $n$  dynodových stupňov a priemerný pomer sekundárnych emisií  $\delta$  na stupeň  $\delta^n$ . Vzťah pre sekundárnu emisiu elektrónov je daný ako [22]

$$\delta = AE^\alpha \quad (1.3.2)$$

kde  $A$  je konštanta,  $E$  je medzistupňové napätie a  $\alpha$  je koeficient daný materiálom dynódy a geometrickou štruktúrou, ktorý obvykle máva hodnoty od 0.7 do 0.8. Keď aplikujeme napätie  $V$  medzi katódu a anódu fotonásobiča s  $n$  stupňami dynód, zisk  $\mu$  je daný ako [22]

$$\mu = \delta^n = (AE^\alpha)^n = \left\{ A \left( \frac{V}{n+1} \right)^\alpha \right\}^n = \frac{A^n}{(n+1)^{n\alpha}} V^{n\alpha} = KV^{n\alpha} \quad (1.3.3)$$

kde  $K$  je konštanta.

Malé množstvo prúdu preteká vo fotonásobiči aj keď pracujeme v úplnej tme. Tento výstupný prúd sa nazýva anódový temnostný prúd a výsledný šum je kritický faktor v stanovovaní najnižšieho limitu svetelnej detekcie. Temnostný prúd výrazne závisí na napájacom napätí. Hlavnými zdrojmi temnostného prúdu môžu byť:

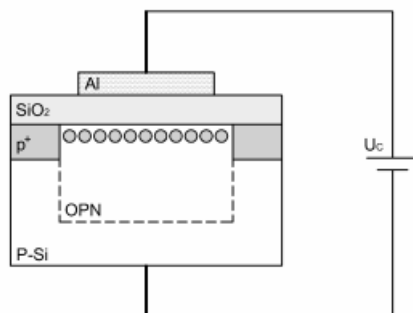
- Termoionická emisia elektrónov – materiál fotokatódy emituje malé množstvo termoionických elektrónov i pri izbovej teplote. Pri redukcii termoionickej emisie sa využíva chladenie fotokatódy.
- Ionizácia zvyškového plynu – zvyškový plyn vo vnútri fotonásobiča môže byť ionizovaný kolíziou s elektrónmi. Ak tieto ióny zasiahnu fotokatódu alebo skoršie stupne dynód môže dôjsť k emisii sekundárnych elektrónov. Tieto sekundárne elektróny môžu spôsobiť relatívne veľký výstupný šum.
- Scintilácia skla – keď elektróny odchyľujúce sa od svojej normálnej trajektórie zasiahnu sklenený obal môže dôjsť k scintilácii. K eliminácii týchto temnostných pulzov pracujú fotonásobiče s vysokým anódovým napätím a katódou na zemnom potenciále.
- Unikajúce prúdy – unikajúci prúd spôsobený nedokonalou izoláciou sklenenej základne a dutiny môže byť ďalším zdrojom temnostného prúdu.

- Emisia poľom – ak fotonásobič pracuje na napätí blízkom maximu menovitej hodnoty napätia môžu byť elektróny emitované silným elektrickým poľom z elektród [22].

### 1.3.2 CCD

CCD (Charged Coupled Device) je nábojovo viazaná štruktúra, v ktorej sa náboj vytvorený dopadajúcim žiarením ukladá do povrchových potenciálových jám vytvorených pod blízko seba usporiadanými hradlami MIS. Vhodne usporiadanou sekvenciou napät'ových pulzov priložených na sekvenciu hradiel sa náboje posúvajú pozdĺž reťazca a na výstupe sa prevádzajú na sériový sled pulzov (posuvný register). Tým je možné prevádzať, prenášať, spracovávať ako digitálne tak aj analógovo vzorkované signály [23].

Základným elementom reťazca CCD je štruktúra MIS (štruktúra kov-izolant-polovodič). Tá je tvorená kremíkovou (Si) doštičkou typu P pokrytou izolačnou vrstvou  $\text{SiO}_2$  (oxid kremičitý) s nanesenými kontaktmi. Ak na štruktúru MIS priložíme kladné napätie, dochádza pod kontaktmi k vytvoreniu ochudobnenej vrstvy. Pre vyššie kladné napätie sa pod kontaktmi vytvorí inverzná vrstva elektrónov. V prípade záporného napätia sa vytvára akumuláčna vrstva. Na Obr.1.7 je model CCD. Na hradlo je priložený kladný pulz  $U_G$ , ten vytvorí pod kontaktom oblasť hlbokého ochudobnenia OPN, tá vytvára potenciálovú jamu, v ktorej sa môžu zachytávať generované elektróny, ktoré predstavujú signálny náboj. Ak pulz  $U_G$  trvá dlhšie môže sa signálny náboj skladovať pod hradlom. Pozdĺž reťazca CCD je nadifundovaná oblasť  $P^+$ , ktorá vytvára ochranný prstenec, ktorý zabraňuje rozširovaniu OPN do strán a tak zabraňuje úniku náboja z kanálu. Činnosť prebieha v nerovnovážnom stave, to znamená, že všetky operácie s nábojom (skladovanie a presun k susednému hradlu) musia byť uskutočnené v podstatne kratšej dobe ako je relaxačná doba potrebná k vytvoreniu kompletnej inverznej vrstvy [23].



Obr. 1.7: CCD element

CCD štruktúra sa využíva ako snímač obrazu. Svetlo, ktoré dopadá na povrch Si doštičky v podobe fotónov sa ukladá ako náboj v potenciálových jamách. Tie zabráňujú pohybu náboja a dochádza tu k jeho akumulácii. Každá potenciálová jama predstavuje jeden pixel CCD snímača. Veľkosť zachyteného náboja je ovplyvnená intenzitou dopadajúceho svetla a dobou, po ktorú necháme CCD čip svetlu vystavený. Zachytený náboj musíme po určitej dobe odobrať a previesť na elektrický signál, ináč by došlo k pretečeniu potenciálovej jamy. Obrazové CCD preto obsahujú maticu pixelov, u ktorých postupným presúvaním náboja z jednej jamy do ďalšej dochádza k jeho postupnému presúvaniu na koniec čipu, kde je prevádzaný prevodníkom na napätový signál [23].

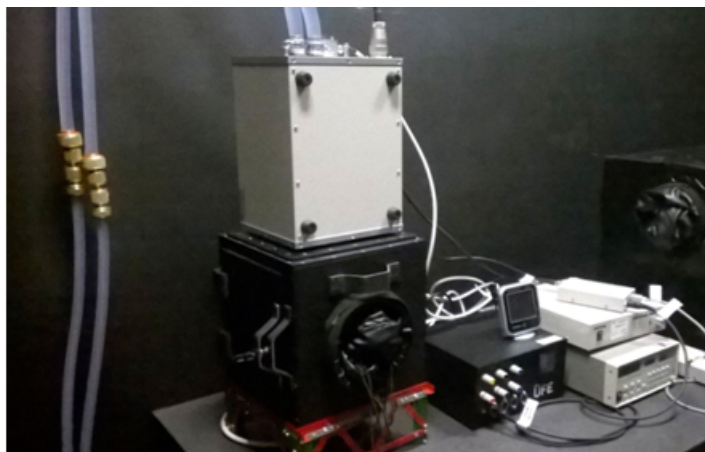
Aby sa čo najviac zabránilo stratám v detekcii svetla spôsobenej neregistrovaním fotónov dopadajúcich na zakryté plošky, implementujú sa na povrch CCD snímača miniatúrne šošovky, ktoré lámu svetlo a smerujú ho do citlivej oblasti. Pre tvorbu farebného obrazu je nutné CCD snímač doplniť o farebné filtre. Nad obrazovými bunkami máme umiestnené tzv. Bayerove masky, ktoré predstavujú RGBG filtre. Každý z filtrov prepúšťa iba svetlo svojej vlnovej dĺžky a farebnosť sa potom interpoluje z niekoľkých okolitých pixelov [23].

## Kapitola 2

# Experimentálna časť práce

### 2.1 Experimentálne zariadenie pre meranie UPE

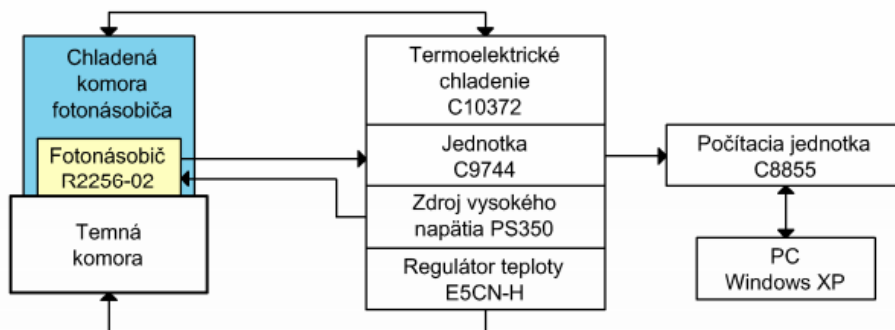
Súčasný vývoj techniky umožňuje snímať spontánnu UPE z mikroorganizmov, rastlín, zvierat, vrátane človeka, pomocou fotonásobičov a veľmi citlivých CCD kamier. Výber medzi jednorozmernou detekciou emisie fotónov pomocou fotonásobičov alebo dvojrozmerného snímania použitím CCD kamier by mal byť založený na celi experimentu [2]. My využívame ako senzor fotonásobič. Na Obr.2.1 môžeme vidieť celé experimentálne zariadenie, ktoré pozostáva z fotonásobiča, chladienia fotonásobiča, svetlotesného a teplotne regulovaného boxu s rukávom pre meranie UPE z pokožky na ruke, zdroja vysokého napätia a jednotiek pre meranie počtu detekovaných fotónov.



Obr. 2.1: Experimentálne zariadenie pre meranie UPE z pokožky ruky

Na Obr.2.2 je podrobnejšia schéma experimentálneho zariadenia s jednotlivými časťami, ktoré budú ďalej bližšie popísané.

## 2.1. EXPERIMENTÁLNE ZARIADENIE PRE MERANIE UPE



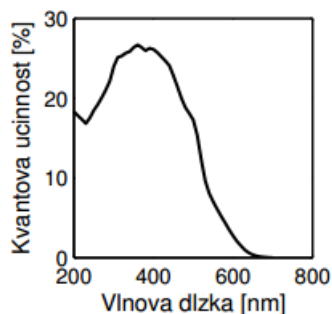
Obr. 2.2: Schéma meracieho zariadenia

### Fotonásobič R2256-02 HAMAMATSU

Fotonásobič R2256-02 je head on typ, to znamená, že fotokatóda je umiestnená priamo na vnútornom povrchu vstupného okna ako semitransparentná vrstva [24]. V Tab. 2.1 sú uvedené niektoré základné vlastnosti fotonásobiča R2256-02. Na Obr.2.3 je zobrazená kvantová účinnosť fotonásobiča R2256-02. Najvyššiu kvantovú účinnosť nad 25 % dosahuje pri vlnových dĺžkach 310 až 420 nm.

<b>Photomultiplier Tube R2256-02, Hamamatsu Photonics</b>	
Priemer fotonásobiča	51 mm
Tvar fotokatódy	kruhový
Priemer fotokatódy	46 mm
Materiál fotokatódy	Bialkalický kov
Spektrálna odozva	160 do 650 nm
Materiál okna	Kremičité sklo, typ RR329-02

Tab. 2.1: Základné vlastnosti fotonásobiča R2256-02 [24]



Obr. 2.3: Kvantová účinnosť fotonásobiča R2256-02

### **Temná komora**

Ultraslabá fotonová emisia má veľmi nízku intenzitu, preto meranie musí byť uskutočnené v svetlotesnej komore, do ktorej nebude prenikať svetlo z okolia. Vnútorne steny komory majú čiernu farbu, ktorá neodráža svetlo. Subjekt vkladá ruku do komory prostredníctvom čierneho rukáva, ktorý sa musí dobre utiahnuť tak, aby do komory neprenikalo svetlo z miestnosti, v ktorej je umiestnené meracie zariadenie. Teplota vo vnútri komory je kontrolovaná pomocou teplotu regulujúcej jednotky.

### **Regulátor teploty (E5CN-H, OMRON Industrial Automation)**

Prístroj umožňuje nastaviť a kontrolovať teplotu v temnej komore.

### **Zdroj vysokého napätia (PS350, $\pm 5$ kV, Stanford Research Systems)**

Zdroj vysokého napätia umožňuje nastavovať napájacie napätie fotonásobiča. Zdroj umožňuje nastaviť napätie v rozmedzí  $\pm 5$  kV s rozlíšením 1 V. Má 25 W výstupný výkon, reguláciu 0,001 % a presnosť 0,05 % [25].

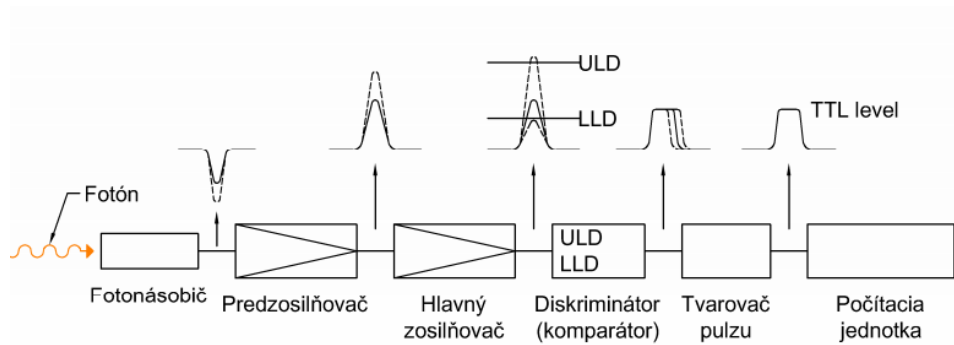
### **Termoelektrické chladenie (C10372, Hamamatsu Photonics)**

Fotonásobič je chladený pomocou termoelektrického chladenia, ktorého cieľom je znížiť redukciu tepelných elektrónov emitovaných z fotokatódy použitého fotonásobiča a tým zlepšiť pomer signál-šum. K zníženiu vplyvu okolitého prostredia obsahuje chladiaca jednotka ešte magnetické a elektrické tienenie. Teplota chladenia je približne  $-30$  °C s výmenou tepla prostredníctvom vody chladenej na  $14$  °C [26].

### **Jednotka (C9744, Hamamatsu Photonics)**

Jednotka je určená na prevod jednotlivých fotoelektrických impulzov z fotonásobiča do 5 V digitálnych signálov pomocou vstavaného zosilňovača a selektívnych obvodov. Ak je intenzita svetla tak nízka, že dopadajúce fotóny na fotokatódu sú separované v čase, budú výstup predstavovať diskkrétne pulzy z anódy. Takýto stav sa nazýva SPE (Single Photon event). Počet týchto výstupných pulzov je úmerný množstvu svetla, takže počítanie týchto pulzov je výhodné z hľadiska pomeru signál-šum. Počítanie fotónov zobrazuje Obr.2.4. Prúd z fotonásobiča je zosilnený pomocou predzosilňovača a hlavného zosilňovača. Zosilnené signály sú potom rozlíšené pomocou diskriminátora podľa výšky pulzu a konvertované do digitálneho signálu. Digitalizovaný signál (1 alebo 0) je tvarovaný tak, že výstupný signál má konštantnú časovú šírku. Tieto výstupné pulzné signály sú potom počítané pomocou počítacej jednotky [27].

## 2.1. EXPERIMENTÁLNE ZARIADENIE PRE MERANIE UPE



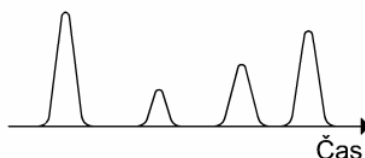
Obr. 2.4: Typická konfigurácia obvodu pre počítanie fotónov

### Počítacia jednotka (C8855, Hamamatsu Photonics)

C8855 je počítacia jednotka s USB rozhraním pre počítanie fotónov v kombinácii s jednotkou C9744. Má dva počítacie obvody, ktoré sú schopné počítať vstupné signály bez mŕtveho času. Maximálne časové rozlíšenie prístroja je  $50 \mu\text{s}$ . Štandardne dodávanou položkou je aj software, ktorý je používaný v tejto práci [28].

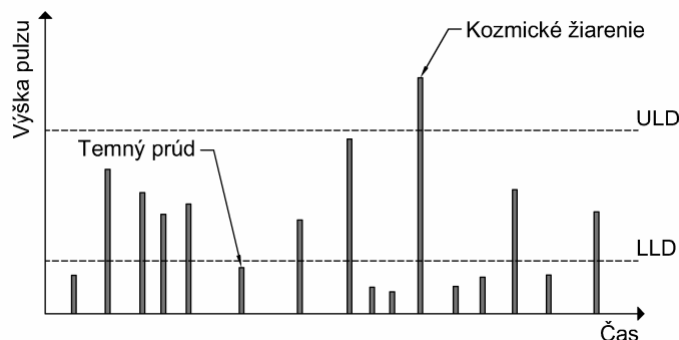
## 2.2 Nastavenie fotonásobiča R2256-02

Počítanie fotónov je efektívny spôsob použitia fotonásobiča k meraniu nízkej úrovne svetla. Keď je intenzita svetla tak nízka, že dopadajúce fotóny sú separované ako na Obr.2.5 ide o SPE (Single Photon Event) [22].



Obr. 2.5: Separované fotóny SPE (Single Photon Event)

Jednoduché počítanie z výstupu fotonásobiča by nevedlo k správnym výsledkom, pretože výstup obsahuje šum spôsobený temnostnými pulzmi, pulzmi kozmického žiarenia, ktoré nepatria k signálu pozostávajúceho z fotoelektrónov, ako na Obr.2.6. Najefektívnejšia metóda k eliminácii šumu je diskriminácia výstupných pulzov podľa ich amplitúdy. Väčšina pulzov nižšia ako najnižšia úroveň diskriminantu (LLD) je šum a pulzy vyššie ako najvyššia úroveň diskriminantu (ULD) sú spôsobené kozmickým žiarením. Počítaním pulzov medzi najnižšou a najvyššou úrovňou diskriminantu môžeme dosiahnuť presné meranie svetla. Obr.2.6 ukazuje typickú výškovú distribúciu pulzu pre počítanie fotónov [22].



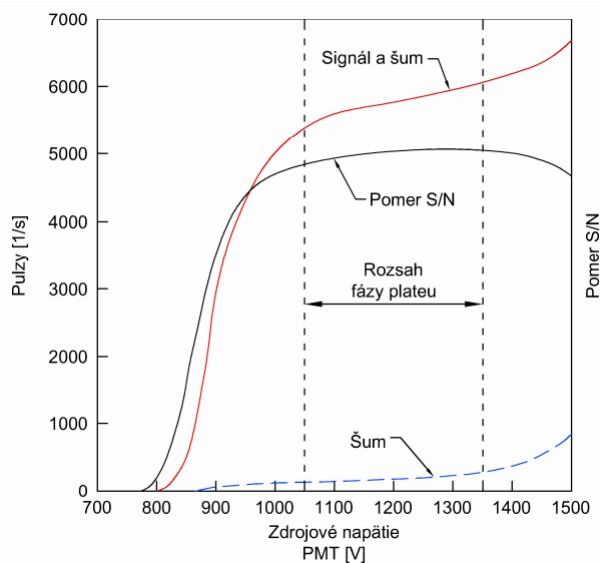
Obr. 2.6: Výstupné pulzy a diskriminačný level

### 2.2.1 Závislosť počtu detekovaných pulzov na napájacom napätí fotonásobiča

Multiplikačný faktor fotonásobiča sa mení s napájacím napätím fotonásobiča. Počítaním počtu výstupných pulzov s fixovanou hodnotou diskriminátoru a zmenou napájacieho napätia by sme mali získať krivku podobnú krivke na Obr.2.7. Sklon signálovej krivky sa mierne



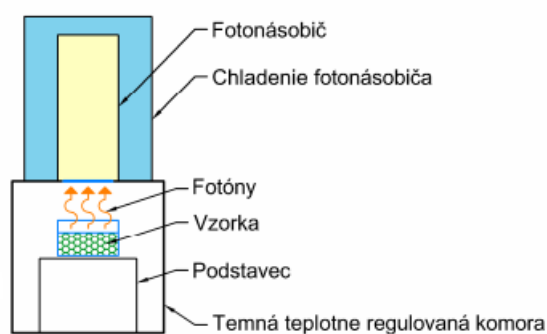
líši od krivky šumu. Zatiaľ čo signálová krivka vykazuje fázu plateau v širokom rozsahu, šum rastie rýchlejšie ako signálová krivka ale takisto vykazuje jemnejšiu fázu plateau v oblasti nízkeho napájacieho napätia. Dôvodom je, že tým ako sa zvyšuje napájacie napätie fotonásobiča, tak výška signálového pulzu je vyššia ako diskriminačný level, čo vedie k zarátaniu väčšiny signálových pulzov. Vo výsledku dochádza k saturácii hladiny. Šum nevykazuje saturáciu, pretože sa tu započítava viac tepelných elektrónov emitovaných z dynód. Ak vykreslíme pomer signál-šum  $S/N$  do grafu, získame krivku, ktorú vidieť na Obr.2.7. Z grafu je vidieť, že pomer  $S/N$  nie je výrazne ovplyvnený nastavenou hodnotou diskriminátoru. K dosiahnutiu čo najlepších výsledkov pri meraní veľmi nízkych úrovni svetla, kde sa počet fotónov svetla približuje šumu, by mal byť diskriminačný level nastavený po spočítaní pomeru  $S/N$  z nameraných signálov a šumu. Pri počítaní počtu fotónov je odporúčané zvoliť hodnotu diskriminátoru medzi začiatkom fázy plateau a maximálnym napájacím napätím fotonásobiča [27].



Obr. 2.7: Závislosť počtu detekcií na napájacom napätí fotonásobiča

### 2.2.2 Optimalizácia nastavenia fotonásobiča

Cieľom tejto časti práce je nájsť najvhodnejšie nastavenie fotonásobiča R2256-02 pre meranie UPE z kože. Hľadáme tak vhodné nastavenie napájacieho napätia fotonásobiča a napätia diskriminátora, pre ktoré získame najvyšší odstup  $S/N$ . Meranie prebiehalo podľa schémy na Obr.2.8. Vzorka (klíčky Mungo (*Vigna radiata*) a rastlinný olej) bola umiestnená do temnej komory na podstavci tak, aby bola čo najbližšie k vstupnému oknu fotonásobiča.



Obr. 2.8: Usporiadanie pri meraní v temnej komore

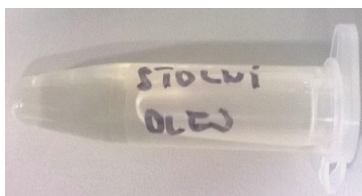
#### 2.2.2.1 Príprava vzoriek

Príprava klíčkov mungo pre meranie UPE pozostáva z ich povrchovej sterilizácie 70% ethanolom po dobu 1 min. Po uplynutí tejto doby sa ethanol odstráni a klíčky sa dezinfikujú 50% dezinfekčným prostriedkom (SAVO, CZ). Po 8 minútach sa dezinfekčný prostriedok odstráni a klíčky sa premyjú 6 krát Q-vodou. Po premytí sa nechajú v Q-vode po dobu 6 hodín a každú pol hodinu sa premiešajú. Po uplynutí 6 hodín sa presunú do tmavého boxu a nechajú sa klíčiť vo veľkej Petriho miske s ultračistou vodou. Na Obr.2.9 môžeme vidieť použitú vzorku klíčkov mungo s odstráneným zeleným obalom.



*Obr. 2.9: Použitá vzorka klíčkov mungo*

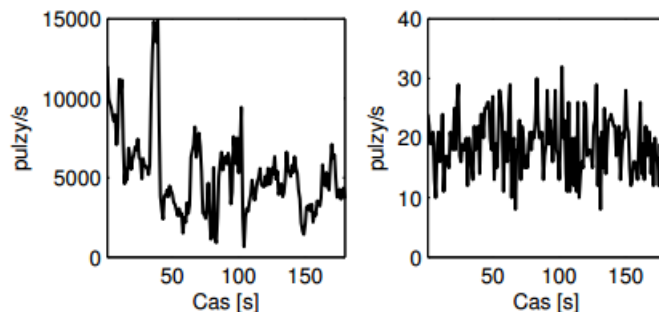
Ako druhá vzorka bol zvolený rastlinný olej, ktorý vidieť na Obr.2.10.



*Obr. 2.10: Použitá vzorka rastlinného oleja*

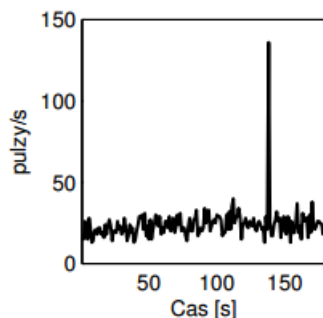
### 2.2.2.2 Spracovanie signálov

Namerané signály po načítaní v Matlabe R2012a prevedieme do formátu *csv*, s ktorým budeme ďalej pracovať. Pre ďalšiu prácu so signálmi je potrebné vizuálne prejsť všetky signály a vyradiť tie, ktoré sú výrazne nestabilné, pretože pri hľadaní vhodného nastavenia fotonásobiča bude potrebné pracovať s priermi týchto signálov. Na Obr.2.11 je ukážka nestabilného priebehu signálu z klíčkov mungo pri diskriminátore -400 mV a napájacom napätí 1500 V a stabilného priebehu pri diskriminátore -500 mV a napájacom napätí 1500 V. Zo všetkých zaznamenaných signálov boli vyradené signály pre nastavenie diskriminátoru -400 mV vo všetkých sériách meraní kvôli ich nestabilným priebehom.



Obr. 2.11: Vľavo – nestabilný priebeh signálu pri napájacom napätí 1500 V z klíčkov mungo, vpravo – stabilný priebeh signálu pri napájacom napätí 1500 V z klíčkov mungo

V prípade výskytu extrémnej hodnoty v signále ako na Obr.2.12, sa táto hodnota nahradí hodnotou NaN. Takéto artefakty boli zvyčajne spôsobené zapnutím prístroja v laboratóriu.



Obr. 2.12: Artefakt v signále z oleja pri napätí diskriminátora -600 mV a napájacom napätí fotonásobiča 1600 V

Pre nájdenie vhodného nastavenia fotonásobiča je potrebné vyniesť závislosť pomeru signál-šum  $S/N$  na hodnote napájacieho napätia fotonásobiča. Ukazateľ  $S/N$  vypočítame podľa vzťahu

$$S/N = \frac{Signal - Sum}{Sum} \quad (2.2.1)$$

kde *signál* predstavuje priemerné hodnoty signálu z klíčkov alebo oleja pre danú hodnotu diskriminátora a vysokého napätia a *šum* predstavuje priemerné hodnoty šumu pre danú hodnotu diskriminátora a vysokého napätia. Pomocný je ešte pomer strednej hodnoty k smerodatnej odchyľke  $\mu/\sigma$ , ktorý získame podľa vzťahu

$$\mu/\sigma = \frac{Signal - sum}{\sqrt{Signal + Sum}} \quad (2.2.2)$$

### 2.2.2.3 Diskriminátor -500 až -1200 mV

Pre účely prvotnej analýzy, ktorej cieľom je nájsť najvhodnejšie nastavenie fotonásobiča R2256-02, prebiehalo meranie pri fixnej hladine diskriminátora v rozmedzí od -400 mV do -1200 mV v 100 mV kroku a postupnom zvyšovaní napájacieho napätia fotonásobiča od 1300 V do 2200 V v 100 V kroku pri fixnej hladine diskriminátora. Jeden záznam signálu pri danej hodnote napätia diskriminátora a vysokého napätia sa zaznamenával po dobu 180 s. Teplota v tmavej komore bola nastavená na 24 °C. Celkovo sme získali 3 série dát. Prvá séria obsahuje namerané signály pre jednotlivé hodnoty napätia diskriminátora a vysokého napätia pre šum, druhá séria obsahuje namerané signály z klíčkov mungo, tretia séria obsahuje namerané signály z oleja. Každá séria obsahuje 90 signálov.

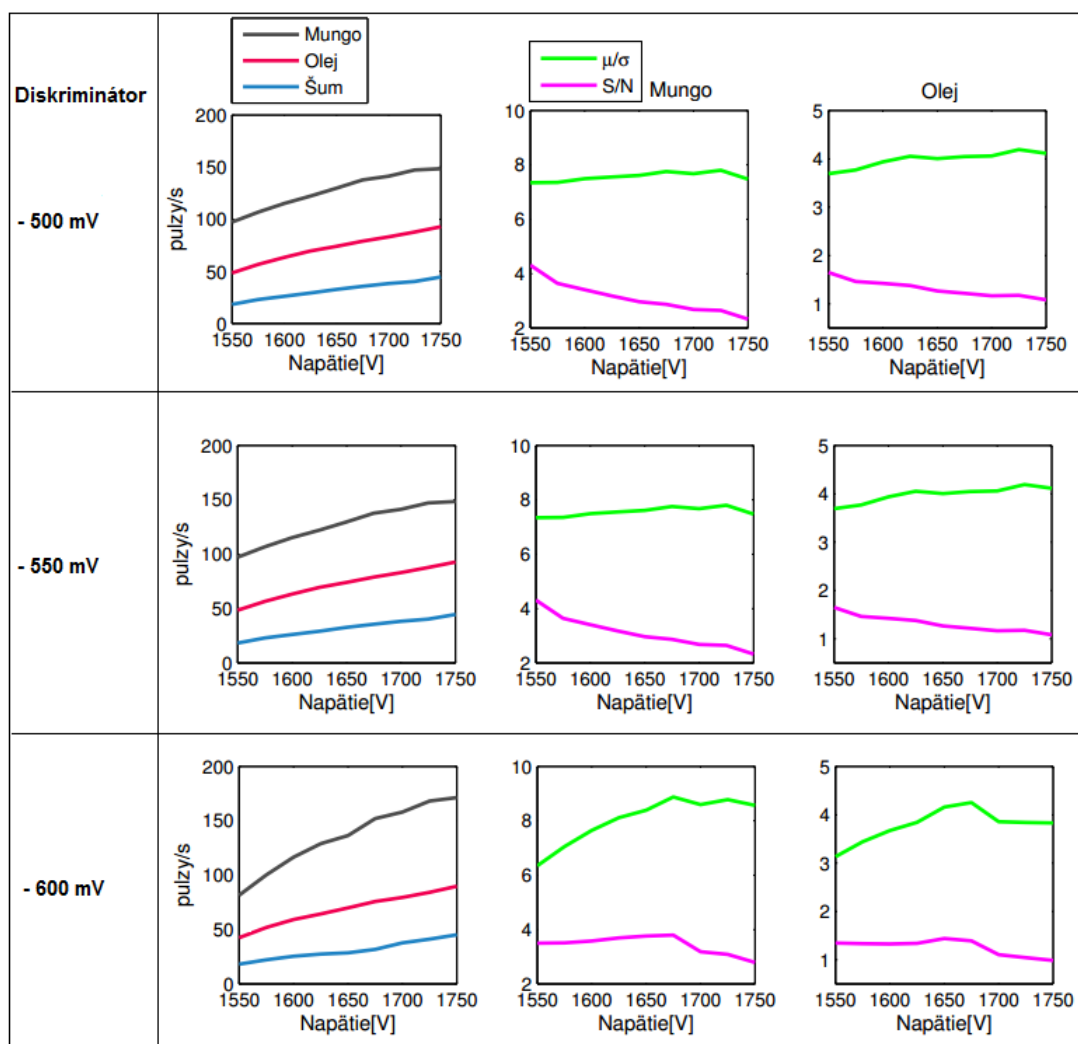
V Tab.2.2 sú vynesené najlepšie hodnoty pomeru  $S/N$  a pomeru  $\mu/\sigma$  a príslušných hodnôt napájacieho napätia. Najlepšie pomery  $S/N$  a  $\mu/\sigma$  pre mungo a olej sú vyznačené farebne. Najlepší pomer  $S/N$  pre signál z munga sme získali pri napätí diskriminátora -600 mV a napájacom napätí fotonásobiča 1600 V. Najlepší pomer  $S/N$  pre signál z oleja sme získali pri napätí diskriminátora -600 mV a napájacom napätí fotonásobiča 1500 V.

Diskriminátor [mV]	Mungo				Olej			
	$\frac{S}{N}$	$U_{\frac{S}{N}}[V]$	$\frac{\mu}{\sigma}$	$U_{\frac{\mu}{\sigma}}[V]$	$\frac{S}{N}$	$U_{\frac{S}{N}}[V]$	$\frac{\mu}{\sigma}$	$U_{\frac{\mu}{\sigma}}[V]$
-500	1,97	1600	5,44	1600	0,19	1600	0,69	1600
-600	2,09	1600	5,28	1700	0,45	1500	1,18	1600
-700	184	1600	4,79	1700	0,33	1600	1,14	1700
-800	1,61	1600	4,63	1700	0,36	1700	1,30	1700
-900	1,30	1700	4,07	1700	0,26	1700	0,98	1700
-1000	1,40	1700	4,07	1800	0,31	1700	1,08	1800
-1100	1,35	1700	4,00	1800	0,37	1700	1,22	1700
-1200	1,29	1700	3,85	1800	0,43	1700	1,36	1800

Tab. 2.2: Hodnoty pomeru  $S/N$  a  $\mu/\sigma$  a príslušných napájacích napätí fotonásobiča pre diskriminátor -500 mV až -1200 mV

## 2.2.2.4 Diskriminátor -500 až -600 mV

Po vynesení príslušných pomerov sme sa zamerali podrobnejšie na napätia diskriminátora  $-500$  mV až  $-600$  mV a napájacie napätie fotonásobiča  $1550$  V až  $1750$  V. Meranie prebiehalo pri fixnej hladine diskriminátora  $-500$  mV,  $-550$  mV a  $-600$  mV pri postupnom znižovaní napájacieho napätia fotonásobiča od  $1750$  V do  $1550$  V v  $25$  V kroku. Jeden záznam signálu pri danej hodnote napätia diskriminátora a vysokého napätia sa zaznamenával po dobu  $300$  s. Teplota v tmavej komore bola nastavená na  $24$  °C. Opäť sme namerali tri sady dát, každá sada merania obsahuje  $27$  signálov. Výsledné priebehy sú na Obr.2.13.



Obr. 2.13: Spočítaný pomer  $S/N$  a  $\mu/\sigma$  pre zvolené nastavenie napätia diskriminátora

## 2.2. NASTAVENIE FOTONÁSOCIČA R2256-02

V Tab.2.3 sú vynesené najlepšie hodnoty pomeru  $S/N$  a pomeru  $\mu/\sigma$  a príslušných hodnôt napájacích napätí fotonásobiča. Najlepší pomer  $S/N$  sme pre signál z munga získali pri napätí diskriminátora -550 mV a napájacom napätí fotonásobiča 1550 V. Najlepší pomer  $S/N$  pre signál z oleja sme získali pri napätí diskriminátora -500 mV a napájacom napätí fotonásobiča 1550 V.

Diskriminátor [mV]	Mungo				Olej			
	$\frac{S}{N}$	$U_{\frac{S}{N}}[V]$	$\frac{\mu}{\sigma}$	$U_{\frac{\mu}{\sigma}}[V]$	$\frac{S}{N}$	$U_{\frac{S}{N}}[V]$	$\frac{\mu}{\sigma}$	$U_{\frac{\mu}{\sigma}}[V]$
-500	3,68	1550	8,90	1750	1,72	1550	4,23	1650
-550	4,31	1550	7,76	1675	1,65	1550	4,19	1725
-600	3,80	1675	8,88	1675	1,44	1650	4,25	1675

Tab. 2.3: Hodnoty pomeru  $S/N$  a  $\mu/\sigma$  a príslušných napájacích napätí fotonásobiča pre diskriminátor -500 mV až -600 mV

Zvolené nastavenie sa bude používať pri meraní UPE z ľudských rúk. Pri výbere najvhodnejšieho nastavenia fotonásobiča sa rozhodneme podľa spočítaných pomerov  $S/N$  pre signály oleja. Priemerné intenzity signálu z oleja sú nižšie ako priemerné intenzity signálu munga a viac sa približujú intenzite spontánnej emisie z rúk ľudských subjektov. Preto ako najvhodnejšie nastavenie fotonásobiča bolo vybrané napájacie napätie 1550 V a napätie diskriminátora -500 mV, pri ktorom sme získali najlepší pomer  $S/N$  pre olej.

## 2.3 Spontánne zmeny UPE

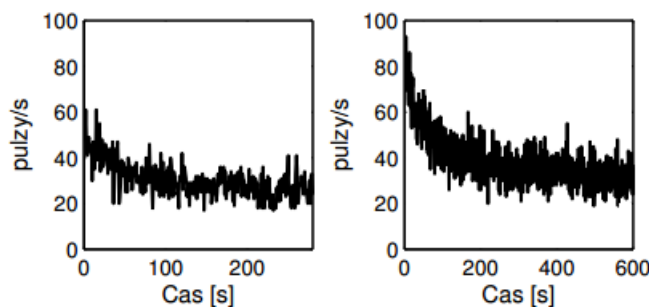
Spontánne zmeny intenzity UPE boli skúmané počas 5 dní z jedného subjektu. UPE bola zaznamenávaná z palmárnej a dorzálnej strany oboch rúk pomocou experimentálneho zariadenia popísaného v sekcii 2.1.

### 2.3.1 Informácie o meranom subjekte

Meraný subjekt bol ženského pohlavia vo veku 24 rokov. Subjekt nemal žiadne kožné ani iné zdravotné problémy a je nefajčiar. Dni pred meraním a počas dní merania spontánnej UPE sa vyhol používaniu krémov.

### 2.3.2 Oneskorená luminiscencia

Počas merania spontánnej, ale i indukovanej UPE je potrebné zaisťiť, aby subjekt zotrval dostatočný čas pred meraním v zatemnenej miestnosti. Tým sa vyhneme zaznamenávaniu oneskorenej luminiscencie, ktorá súvisí s expozíciou meraného subjektu svetlu. Na Obr. 2.14 môžeme vidieť nameraný signál UPE bez adaptácie subjektu na tmu z dorzálnej strany pravej ruky. Subjekt pred meraním vykonával bežné činnosti v osvetlenej miestnosti. Z grafu je vidieť, že približne za dobu 120 s poklesol signál UPE na úroveň intenzity spontánnej UPE. Ak subjekt zámerne vystaví dorzálnu stranu rúk svetlu po dobu 5 minút je pokles intenzity meranej UPE pomalší. Na úroveň spontánnej UPE klesne približne za dobu 300 s.



Obr. 2.14: UPE z dorzálnej strany ruky bez adaptácie subjektu na tmu (vľavo – bez zámerného vystavenia rúk svetlu, vpravo – po zámernom vystavení rúk svetlu)



Aby sme zabezpečili, že pri meraní UPE nebude signál obsahovať oneskorenú luminiscenciu strávi subjekt pred meraním minimálne 20 minút v zatemnenej manipulačnej miestnosti.

### 2.3.3 Postup merania

V priebehu každého dňa bolo zaznamenaných celkom 5 sád dát obsahujúcich signál šumu fotonásobiča a signály UPE z oboch rúk.

Prvá sada meraní začala o 09:00 z dlane pravej ruky, o 9:15 z dlane ľavej ruky, 09:30 z chrbta pravej ruky a 09:45 z chrbta ľavej ruky. Meranie ďalších sád dát prebiehalo v dvojhodinových intervaloch v danom poradí. Posledná sada meraní začala o 17:00.

Subjekt pred meraním a po meraní dodržiaval nasledujúci postup:

- Pred každou sadou meraní UPE zotrval meraný subjekt v zatemnenej manipulačnej miestnosti minimálne 20 minút. Manipulačná miestnosť bola osvetlená iba monitorom PC a LED osvetlením prístrojov.
- Pred každou sadou meraní bol zaznamenaný šum fotonásobiča.
- Pred každým meraním UPE boli zaznamenané nasledujúce hodnoty: teplota v miestnosti a vlhkosť vzduchu v miestnosti (digitálny teplomer s vlhkomerom Proskit NT-312), teplota v tmavej komore (regulátor teploty Omron E5CN-H), relatívna kyslíková saturácia subjektu ( $S_pO_2$ ) a tepová frekvencia subjektu (pulzný oximeter Nonin 9590 Onyx), povrchová teplota danej časti ruky subjektu (infračervený lekárske teplomer NFS 100).
- Minimálne 1 minútu pred začiatkom každého merania UPE z danej časti ruky vložil subjekt ruku do tmavej komory a stabilizoval ju na podstavci.
- Po nameraní signálu UPE z danej časti ruky sa zaznamenali opäť hodnoty  $S_pO_2$ , tepová frekvencia a povrchová teplota daného miesta ruky.

### 2.3.4 Spracovanie nameraných dát spontánnej UPE

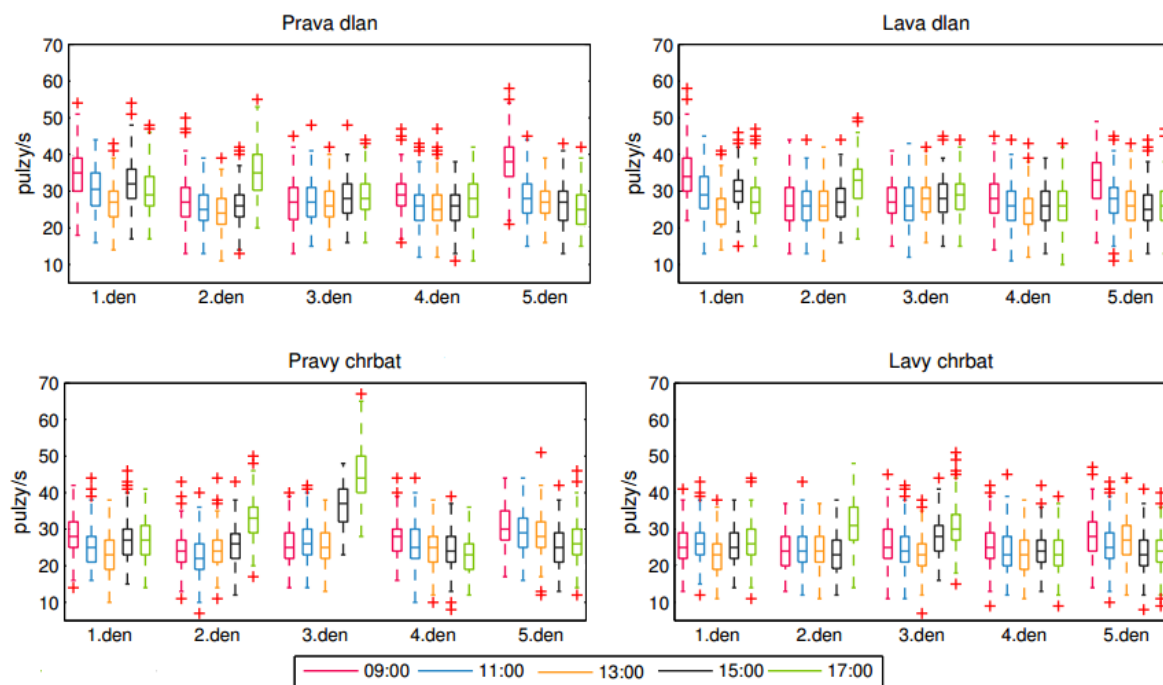
Namerané dáta boli prevedené do formátu csv a následne spracované v Matlabe R2012a a RStudio 0.99.486. Extrémne hodnoty v signáloch boli nahradené hodnotou NaN. Pre samotné spracovanie bol použitý záznam UPE s trvaním 230 s ( $N = 230$ ).

Pri hodnotení zmien intenzity spontánnej UPE nás budú zaujímať zmeny intenzity UPE počas jedného dňa a zmeny intenzity UPE počas

### 2.3. SPONTÁNNE ZMENY UPE

všetkých dní. Na Obr.2.15 vidíme prvotnú vizualizáciu signálov, bez odstránenia šumu fotonásobiča. Z grafov vidieť fluktuácie spontánnej UPE subjektu od 09:00 do 17:45 počas 5 dní zo všetkých meraných polôh rúk.

Pre vizualizáciu bolo zvolené zobrazenie pomocou krabicových grafov (boxplotov). Línia, ktorá prechádza každým boxom predstavuje výberový medián, vzdialenosť medzi vrchnou a spodnou časťou boxu reprezentuje medzikvartilové rozsahy (rozdiel 3. a 1. kvartilu). Z každého boxu vystupujú z hornej a dolnej časti fúzy. Znamienkom  $+$  sú označené odľahlé hodnoty, ktoré sú väčšie ako 1,5 násobok medzikvartilového rozpätia od hornej a dolnej časti každého boxu [29].



Obr. 2.15: Boxplot nameraných signálov spontánnej UPE počas dňa

Z boxplotov vidíme rozdiely v rámci meraného dňa, no nevieme určiť medzi ktorými meraniami je štatisticky významný rozdiel. Preto sme uskutočnili neparametrické štatistické testovanie v RStudio 0.99.486. Zvolený bol štatistický balík *dunn.test*, ktorý predstavuje neparametrický Kruskal-Wallis test s mnohonásobným porovnávaním Dunn testom. Balík nám umožňuje testovať rozdiely v rozdelení premennej medzi viacerými súbormi. Výstupom testu je hodnota testovej štatistiky Kruskal-Wallis, stupne voľnosti,  $p$  - hodnota a hodnoty testovej štatistiky a  $p$  - hodnoty pre párové pozorovania [30]. Pre náš účel bola testovaná vždy skupina meraní, ktorá odpovedá jednému dňu a všetkým časom meraní v rámci daného dňa, tzn. že testujeme 5 na-

meraných signálov (napr. signály UPE pravej dlane z 1. dňa pre čas 09:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00) na zvolenej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Za štatisticky významný rozdiel medzi nameranými signálmi UPE sme považovali výsledok, pre ktorý platí, že  $p$  - hodnota  $< \alpha$ .

Z výsledkov štatistického testovania môžeme tvrdiť, že pre všetky merané polohy ruky a všetky dni sme mali štatisticky významný rozdiel v rámci jednotlivých meraní v čase od 09:00 do 17:45.

Následne sme sa podrobnejšie zamerali na jednotlivé polohy ruky a rozdiely nameraných signálov UPE v rámci jednotlivých časov a dní. To znamená, že nás zaujímajú rozdiely medzi kombináciami nameraných signálov UPE v rámci meraných časov pre jednotlivé dni.

Pre dľaň pravej ruky sme štatisticky nevýznamný rozdiel v nameraných signáloch UPE zaznamenali pre nasledujúce dni a časy: 1. deň (11:00 a 17:00), 2. deň (11:00 a 15:00), 3. deň (09:00 a 11:00, 09:00 a 13:00, 11:00 a 13:00, 09:00 a 15:00, 11:00 a 15:00, 15:00 a 17:00), 4. deň (11:00 a 13:00, 11:00 a 15:00, 13:00 a 15:00), 5. deň (13:00 a 15:00).

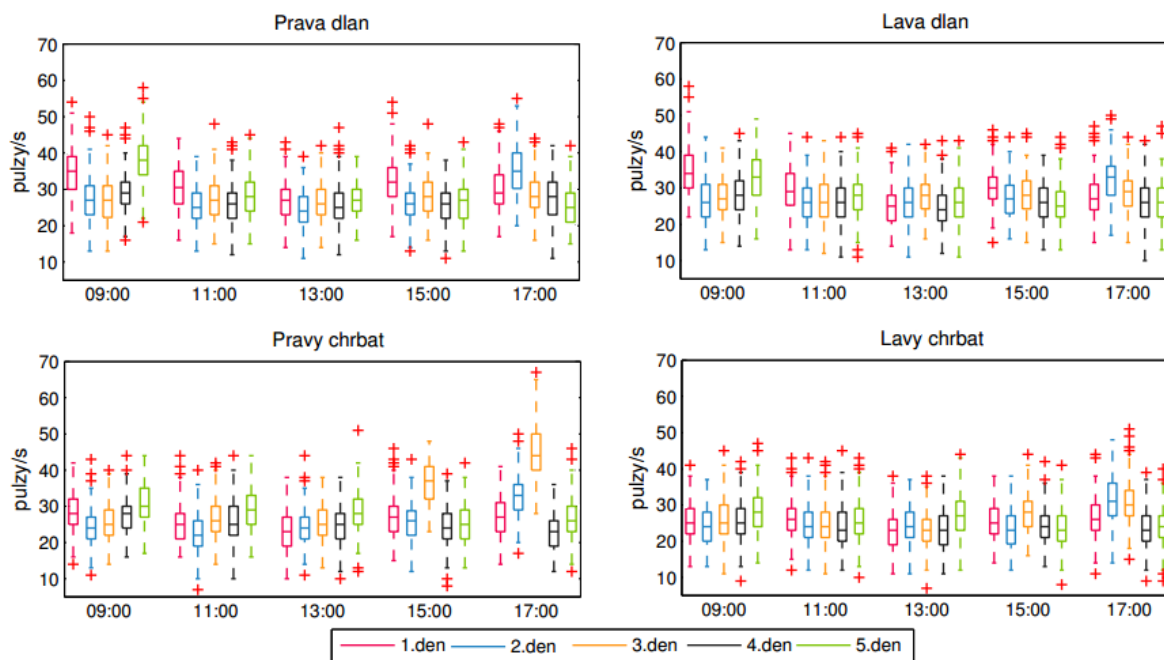
Pre dľaň ľavej ruky sme štatisticky nevýznamný rozdiel zaznamenali pre: 1. deň (11:00 a 15:00), 2. deň (09:00 a 11:00, 09:00 a 13:00, 11:00 a 13:00, 09:00 a 15:00, 11:00 a 15:00), 3. deň (09:00 a 11:00, 09:00 a 13:00, 11:00 a 13:00, 15:00 a 17:00), 4. deň (11:00 a 15:00, 11:00 a 17:00, 15:00 a 17:00), 5. deň (13:00 a 15:00, 13:00 a 17:00, 15:00 a 17:00).

Pre chrbát pravej ruky sme štatisticky nevýznamný rozdiel zaznamenali pre: 1. deň (09:00 a 15:00, 09:00 a 17:00, 15:00 a 17:00), 2. deň (09:00 a 13:00), 3. deň (09:00 a 13:00, 11:00 a 13:00), 4. deň (11:00 a 13:00, 13:00 a 15:00), 5. deň (11:00 a 13:00).

Pre chrbát ľavej ruky sme štatisticky nevýznamný rozdiel zaznamenali pre: 1. deň (09:00 a 15:00, 11:00 a 15:00, 11:00 a 17:00), 2. deň (09:00 a 11:00, 09:00 a 13:00, 11:00 a 13:00), 4. deň (11:00 a 13:00, 11:00 a 15:00, 13:00 a 15:00, 11:00 a 17:00, 13:00 a 17:00, 15:00 a 17:00), 5. deň (09:00 a 13:00, 15:00 a 17:00).

Podobne sa môžeme pozrieť na fluktuácie nameraných signálov v rámci všetkých meraných dní ako je vidieť na Obr.2.16.

### 2.3. SPONTÁNNÉ ZMENY UPE



Obr. 2.16: Boxplot nameraných signálov spontánnej UPE v rámci meraných dní

Podobne ako v predchádzajúcom prípade nevieme určiť štatisticky významné rozdiely nameraných signálov UPE a preto sme opäť využili štatistický balík *dunn.test*. Pre testovanie rozdielov sme použili signály pre rovnaký čas v rámci jednotlivých dní, tzn. že testujeme opäť 5 signálov (napr. signály UPE pravej dlane pre čas 09:00 z 1., 2., 3., 4., 5. dňa merania). Testovali sme na zvolenej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Pre všetky merané polohy ruky a všetky časy sme zaznamenali štatisticky významný rozdiel meraných signálov spontánnej UPE.

Následne sme sa opäť podrobnejšie zamerali na rozdiely v rámci testovanej skupiny signálov.

Pre dľaň pravej ruky sme štatisticky nevýznamný rozdiel v nameraných signáloch UPE zaznamenali pre nasledujúce časy a príslušné dni merania: 09:00 (2. a 3. deň), 11:00 (2. a 4. deň), 13:00 (1. a 3., 1. a 5., 3. a 5. deň), 15:00 (2. a 4., 2. a 5., 4. a 5. deň).

Pre dľaň ľavej ruky sme štatisticky nevýznamný rozdiel v nameraných signáloch UPE zaznamenali pre nasledujúce časy a príslušné dni merania: 09:00 (2. a 3., 3. a 4. deň), 11:00 (2. a 3., 2. a 4., 3. a 4. deň), 13:00 (1. a 2., 1. a 4., 2. a 5. deň), 15:00 (1. a 2., 1. a 4., 2. a 5. deň), 17:00 (1. a 4. deň).

Pre chrbát pravej ruky sme štatisticky nevýznamný rozdiel v nameraných signáloch UPE zaznamenali pre nasledujúce časy a príslušné dni merania: 09:00 (1. a 4. deň), 11:00 (1. a 4. deň), 13:00 (1. a 2., 2. a 4. deň), 15:00 (2. a 4., 2. a 5., 4. a 5. deň), 17:00 (1. a 5. deň).

Pre chrbát ľavej ruky sme štatisticky nevýznamný rozdiel v nameraných signáloch UPE zaznamenali pre nasledujúce časy a príslušné dni merania: 09:00 (1. a 2., 1. a 3., 1. a 4., 3. a 4. deň), 11:00 (2. a 3., 2. a 4., 3. a 4., 1. a 5., 2. a 5. deň), 13:00 (1. a 3., 1. a 4., 3. a 4. deň), 15:00 (2. a 4., 2. a 5., 4. a 5. deň), 17:00 (2. a 3., 4. a 5. deň).

### 2.3.5 Spontánne zmeny UPE počas dňa

V nasledujúcej časti práce sa zameriame na zmeny UPE počas dňa, pretože nás zaujíma ako sa mení intenzita UPE meraného subjektu v rámci dňa, a či zmeny intenzity vykazujú určitý vzor.

Pri analýze spontánnych zmien UPE počas dňa budeme pracovať so signálmi po odčítaní priemerného šumu fotonásobiča, ktorý bol zaznamenaný pred každou sadou merania. Na Obr.2.17 vidíme rozdiely v pulzoch/s medzi nameranými signálmi pre príslušnú časť ruky.

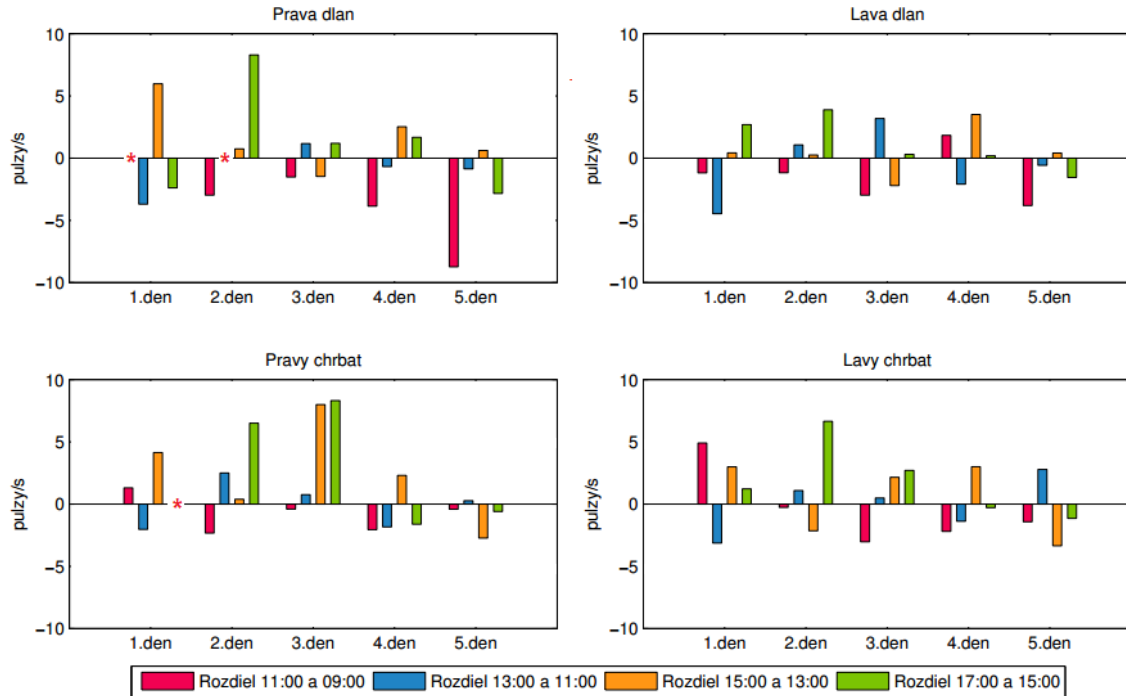
Intenzita spontánnej emisie z pravej dlane vykazovala počas všetkých 5 dní meraní pokles medzi 09:00 a 11:00. Medzi 11:00 a 13:00 došlo počas 4 dní k zníženiu intenzity spontánnej UPE a počas 1 dňa k zvýšeniu. Medzi 13:00 a 15:00 došlo počas 4 dní k zvýšeniu intenzity emisie a počas 1 dňa k jej zníženiu. Medzi 15:00 a 17:00 došlo počas 3 dní k zvýšeniu intenzity spontánnej emisie a počas 2 dní k zníženiu intenzity.

Intenzita spontánnej emisie z ľavej dlane vykazovala pokles emisie počas 4 dní medzi 09:00 a 11:00 a nárast počas 1 dňa. Medzi 11:00 a 13:00 došlo počas 3 dní k poklesu intenzity a 2 dní k nárastu. Medzi 13:00 a 15:00 došlo počas 4 dní k nárastu intenzity spontánnej UPE a počas 1 dňa k poklesu a medzi 15:00 a 17:00 došlo počas 4 dní k nárastu emisie a počas 1 dňa k poklesu.

Intenzita spontánnej emisie z chrbta pravej ruky vykazovala počas 4 dní pokles medzi 09:00 a 11:00 a počas jedného dňa vykazovala nárast. Počas 3 dní došlo k nárastu intenzity medzi 11:00 a 13:00 a počas 2 dní k poklesu. Počas 4 dní došlo k nárastu medzi 13:00 a 15:00 a počas jedného k poklesu. Medzi 15:00 až 17:00 došlo k poklesu intenzity spontánnej emisie počas 3 dní a počas 2 dní došlo k nárastu intenzity spontánnej UPE.

Intenzita spontánnej emisie z chrbta ľavej ruky vykazovala pokles počas 4 dní medzi 09:00 až 11:00 a počas 1 dňa nárast. Počas 2 dní došlo k poklesu medzi 11:00 a 13:00 a počas 3 dní k nárastu intenzity. Počas 3 dní došlo k nárastu intenzity spontánnej emisie medzi 13:00 a 15:00 a počas 2 dní k poklesu. Medzi 15:00 a 17:00 došlo počas 3 dní k nárastu a počas 2 dní k poklesu spontánnej UPE.

### 2.3. SPONTÁNNE ZMENY UPE



Obr. 2.17: Rozdiel spontánnej UPE medzi jednotlivými časmi merania

Z výsledkov by sa dalo usudzovať, že intenzita spontánnej emisie subjektu vykazuje pokles medzi 09:00 a 11:00 a medzi 13:00 až 15:00 vykazuje nárast. V ďalších časoch boli zmeny intenzity rôzne a neukazujú tak na jednoznačný vzor.

Následne sme spočítali priemerné rozdiely v intenzite meranej UPE medzi časmi meraní vo všetky dni merania. Priemerné hodnoty sme spočítali z absolútnych hodnôt rozdielov intenzít. Výsledky sú v Tab.2.4. Najvýraznejšie hodnoty priemerných rozdielov sú zvýraznené farebne. Je vidieť, že k zmenám intenzity UPE dochádzalo z každej meranej polohy ruky rôzne. Ak sa pozrieme na celkové priemerné hodnoty rozdielov intenzity UPE, tak je vidieť, že najvyššiu priemernú hodnotu zmien v rámci meraného dňa sme pozorovali pri meraní intenzity UPE pravej dlane.

### 2.3. SPONTÁNNÉ ZMENY UPE

Rozdiel časov	Pravá dlaň	Ľavá dlaň	Pravý chrbát	Ľavý chrbát
11:00 a 09:00	3,43	2,20	1,30	2,37
13:00 a 11:00	1,30	2,28	1,48	1,77
15:00 a 13:00	2,26	1,36	3,51	2,73
17:00 a 15:00	3,27	1,72	3,41	2,40
Priemer	2,57	1,89	2,43	2,32

Tab. 2.4: Priemerné hodnoty rozdielov meranej UPE medzi časmi meraní (hodnoty sú uvedené v pulzoch/s)

#### 2.3.6 Spontánne zmeny UPE počas meraných dní

Intenzitu UPE sme zaznamenávali počas 5 dní, preto nás môže zaujímať, ako sa menila intenzita v rámci týchto dní meraní pre jednotlivé časy merania. Zistíme tak, či zmeny intenzity UPE vykazujú určitý vzor v rámci dní merania.

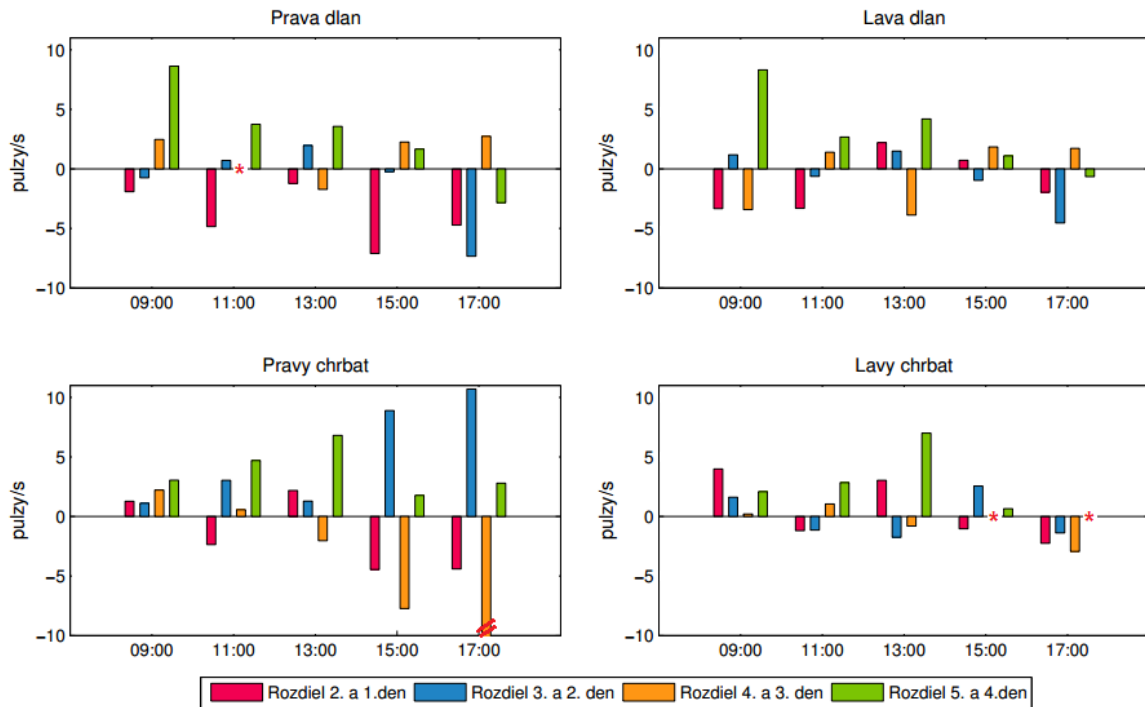
Na Obr.2.18 vidíme rozdiely spontánnej UPE medzi jednotlivými dňami meraní. Z grafov je vidieť, že pre dlane oboch rúk bol rozdiel spontánnej UPE najvýraznejší medzi 4. a 5. dňom v čase 09:00.

Pre chrbát pravej ruky sme zaznamenali najvýraznejší rozdiel spontánnej UPE medzi 3. a 4. dňom merania v čase 17:00.

Pre chrbát ľavej ruky sme zaznamenali najväčší rozdiel spontánnej UPE medzi 4. a 5. dňom v čase merania 13:00.

Počas všetkých časov merania okrem 17:00 došlo medzi 4. a 5. dňom k nárastu intenzity spontánnej emisie.

### 2.3. SPONTÁNNÉ ZMENY UPE



Obr. 2.18: Rozdiel spontánnej UPE medzi dňami meraní

Z výsledkov meraní nie je vidieť jednoznačný vzor v zmene intenzity UPE v rámci meraných dní. U každej meranej polohy ruky dochádzalo k zmenám rôzne s inými úrovňami.

V Tab.2.1 sú uvedené priemerné zmeny intenzity medzi meranými dňami, ktoré sú spočítané pre všetky časy meraní z absolútnych hodnôt rozdielov intenzít. Najvyššie priemerné hodnoty sú vyznačené farebne. Je vidieť, že okrem chrbta pravej ruky sme zaznamenali najvyššie priemerné rozdiely medzi 5. a 4. dňom merania. K najvýraznejším zmenám dochádzalo na chrbte pravej ruky.

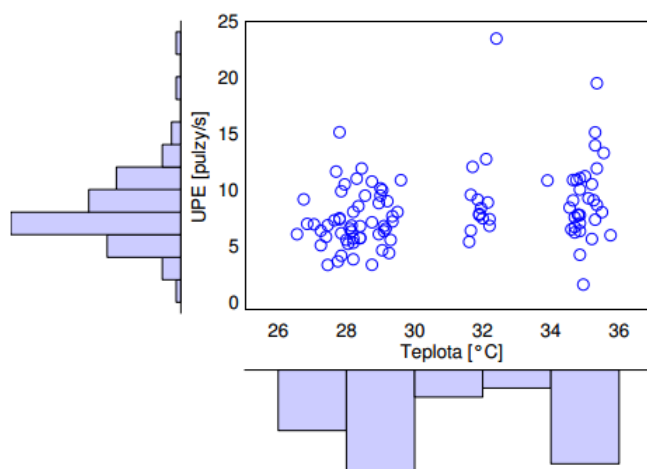
Rozdiel dní	Pravá dlaň	Ľavá dlaň	Pravý chrbát	Ľavý chrbát
2. a 1.	3,96	2,31	2,94	2,30
3. a 2.	2,20	1,76	5,0	1,69
4. a 3.	1,86	2,45	6,05	1,01
5. a 4.	4,09	3,39	3,83	2,55
Priemer	3,03	2,48	4,46	1,89

Tab. 2.5: Priemerné hodnoty rozdielov meranej UPE medzi dňami meraní (hodnoty sú uvedené v pulzoch/s)



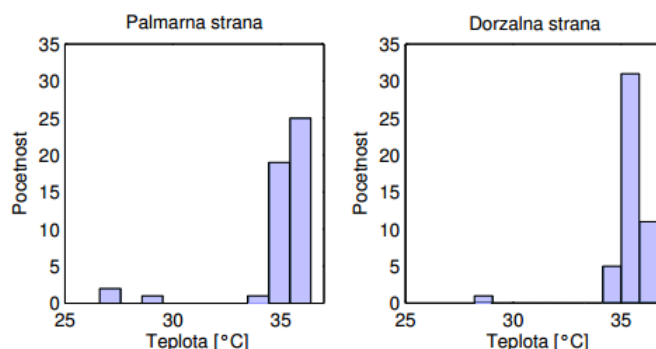
### 2.3.7 Vplyv spontánnych zmien teploty na intenzitu UPE

Cieľom merania povrchovej teploty daného miesta meranej končatiny bolo zistiť, či intenzita spontánnej UPE môže byť ovplyvnená povrchovou teplotou subjektu. Na Obr.2.19 vidíme graf závislosti priemerných hodnôt spontánnej UPE na priemernej povrchovej teplote subjektu spolu s histogramom početností.



Obr. 2.19: Závislosť priemernej spontánnej UPE na priemernej povrchovej teplote subjektu

Z Obr.2.19 je vidieť, že povrchová teplota subjektu má tendenciu kolísať medzi hodnotami 34 až 36 °C, 32 °C a 26 až 30 °C. Aby sa potvrdil vzor zmien povrchovej teploty a potvrdilo sa, že nejde o chybu merania, zaznamenával subjekt povrchovú teplotu počas jedného dňa od 08:00 do 20:00 v 30 minútových intervaloch pre všetky merané polohy rúk. Počas dňa vykonával bežné činnosti. Výsledný histogram teplôt je na Obr.2.20. Z histogramov je vidieť, že povrchová teplota meraného subjektu sa pohybuje v intervaloch medzi 34 až 36 °C a 26 až 30 °C a namerané povrchové teploty subjektu počas merania spontánnej UPE sa nepovažujú za chybu merania.



Obr. 2.20: Histogramy povrchovej teploty subjektu zaznamenanej počas jedného dňa z palmárnej a dorzálnej strany oboch rúk

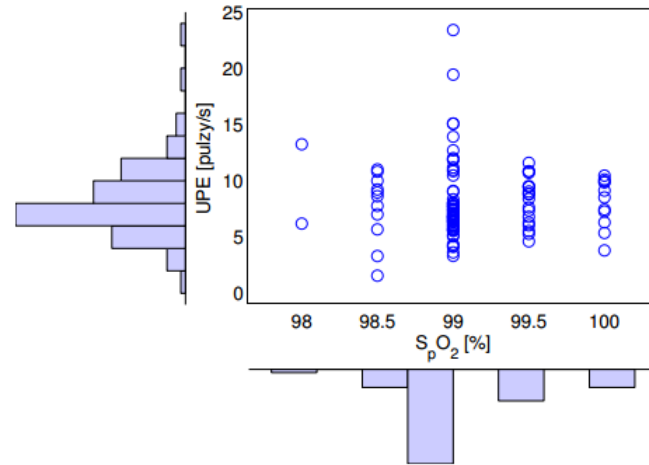
Pre zistenie sily vzťahu medzi priemernou povrchovou teplotou a priemernou intenzitou spontánnej UPE bola použitá korelačná analýza. Pre výpočet bola zvolená neparametrická metóda, pretože nevyžaduje normalitu dát. Pomocou RStudia bol spočítaný Kendallov korelačný koeficient, označovaný  $\tau$  a  $p$  – hodnota, ktorú porovnáme so zvolenou hladinou významnosti  $\alpha = 0,05$ . Kendallov korelačný koeficient bol zvolený pre výpočet pretože sa dá uplatniť aj v prípade výskytu tzv. zviazaných poradí (tied ranks) [31].

Spočítaný koeficient korelácie je  $\tau = 0,23$  a predstavuje tak slabý pozitívny vzťah priemernej povrchovej teploty subjektu a priemernej intenzity spontánnej UPE.  $P$  – hodnota je rovná 0,0008, platí tak, že  $\alpha > p$  – hodnota, čo značí, že korelačný koeficient  $\tau$  je významný na zvolenej hladine  $\alpha$ .

### 2.3.8 Vplyv $S_pO_2$ na intenzitu UPE

Pred meraním a po meraní spontánnej UPE subjekt zaznamenával hodnotu  $S_pO_2$  pomocou pulzného oximetru pre účely korelačnej analýzy, pretože sa naskytá otázka, či intenzita UPE môže byť ovplyvnená práve  $S_pO_2$ . Na Obr.2.21 vidíme graf závislosti priemerných hodnôt UPE na priemerných hodnotách  $S_pO_2$  počas merania.

### 2.3. SPONTÁNNE ZMENY UPE



Obr. 2.21: Závislosť priemernej spontánnej UPE na priemernej  $S_pO_2$

Rovnako ako v prípade povrchovej teploty bol spočítaný korelačný koeficient  $\tau = 0,038$  a jeho hodnota naznačuje neexistenciu korelácie medzi  $S_pO_2$  a spontánnou UPE. Spočítaná  $p$  – hodnota je rovná 0,618. Zvolená hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ . Korelačný koeficient  $\tau$  je nevýznamný na zvolenej hladine  $\alpha$ , pretože platí  $\alpha < p$  – hodnota.

## 2.4 Zmeny UPE vyvolané aplikáciou oxidantu

Indukované zmeny UPE boli vyvolané povrchovou aplikáciou oxidantu. Ako oxidant bol zvolený  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ktorý sa nanášal na palmárnu a dorzálnu stranu rúk subjektu. Pred všetkými meraniami subjekt zotrval 20 minút s rukou uloženou na podstavci v tmavej komore. Subjekt aplikoval oxidant pomocou pipety a nanosené množstvo rovnomerne rozotrel po danej časti ruky pomocou ochranných rukavíc.

Cieľom týchto experimentov bolo analyzovať vplyv aplikácie exogénneho oxidantu na intenzitu meranej UPE a vyšetriť vplyv rôznych koncentrácií na meranú intenzitu UPE. Experimentmi sme chceli potvrdiť, že po aplikácii oxidantu skutočne dochádza k nárastu intenzity UPE [14].

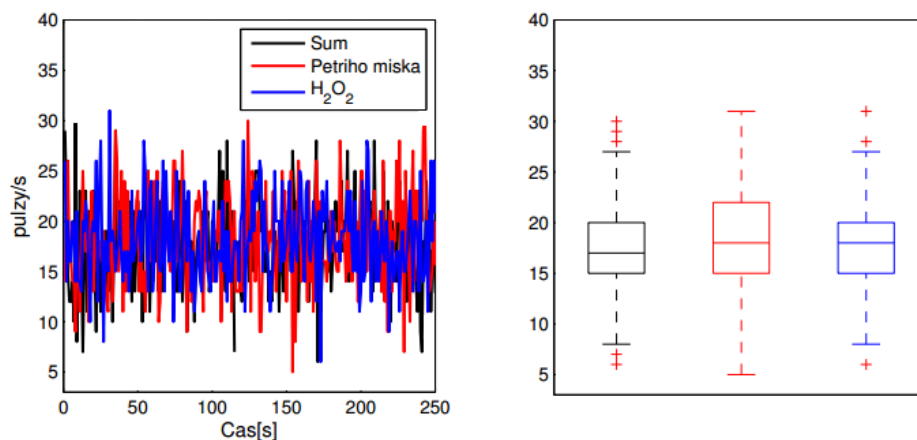
### 2.4.1 Luminiscencia $\text{H}_2\text{O}_2$

Experimenty s meraním UPE po aplikácii  $\text{H}_2\text{O}_2$  na povrch rúk meraných subjektov sú založené na predpoklade, že  $\text{H}_2\text{O}_2$  sám nevykazuje žiadnu luminiscenciu. Aby sme potvrdili tento predpoklad uskutočnili sme nasledujúci experiment.

Luminiscencia  $\text{H}_2\text{O}_2$  bola skúmaná pomocou 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pred meraním sme zaznamenali šum fotonásobiča. Potom sme na podstavec v tmavom boxe uložili Petriho misku a opäť namerali signál, čím sme si overili, že použitá Petriho miska nevykazuje žiadnu luminiscenciu. Na túto misku sme potom napipetovali  $240 \mu\text{l}$  3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  a opäť zaznamenali signál.

Výsledné priebehy sú na Obr.2.22, z ktorých vidieť, že signál zaznamenaný s prázdnu Petriho miskou a s Petriho miskou s  $\text{H}_2\text{O}_2$  mal podobné intenzity. Aby sme potvrdili, že rozdiely medzi nameranými signálmi sú štatisticky nevýznamné uskutočnime štatistické testovanie pomocou balíka *dunn.test* v RStudio 0.99.486 na hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p$  - hodnota  $< \alpha$ ) bol zaznamenaný medzi signálom šumu a Petriho misky ( $p$  - hodnota = 0,001) a signálom šumu a Petriho misky s  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $p$  - hodnota = 0,001). Štatisticky nevýznamný rozdiel sme zaznamenali medzi signálom Petriho misky a Petriho misky s  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $p$  - hodnota = 0,490). Rozdiel medzi signálom šumu a Petriho misky mohol byť spôsobený prípadnými nečistotami na Petriho miske. Dôležité je, že rozdiel medzi signálom Petriho misky a Petriho misky s  $\text{H}_2\text{O}_2$  je štatisticky nevýznamný, čo nám umožňuje predpokladať, že  $\text{H}_2\text{O}_2$  nevykazuje luminiscenciu.

## 2.4. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU OXIDANTU



Obr. 2.22: Šum fotonásobiča, luminiscencia Petriho misky a luminiscencia Petriho misky s 240  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

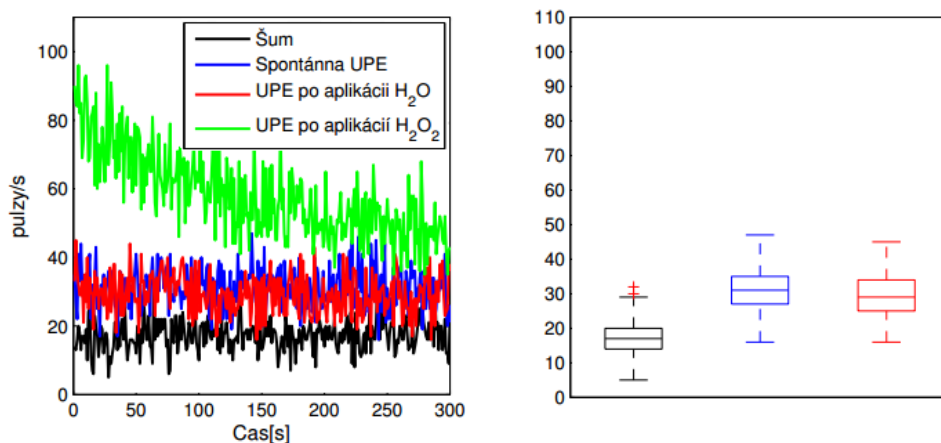
### 2.4.2 Porovnanie $\text{H}_2\text{O}$ a $\text{H}_2\text{O}_2$

Aby sme potvrdili predpoklad, že k zmene intenzity UPE môže dôjsť aplikáciou exogénnych oxidantov, naniesieme na povrch ruky 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  a 20  $\mu\text{l}$  0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{H}_2\text{O}$  nepatrí do skupiny oxidantov, preto by nemala ovplyvniť intenzitu UPE.  $\text{H}_2\text{O}_2$  je oxidant, ktorý by mal viesť k zvýšeniu intenzity UPE.

Výsledné priebehy UPE z palmárnej strany pravej ruky po nanosení 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  a 20  $\mu\text{l}$  0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  sú na Obr.2.23. Z grafu je vidieť, že po aplikácii  $\text{H}_2\text{O}_2$  došlo k prudkému zvýšeniu intenzity až na hodnotu 90 pulzov/s s pomalým návratom k pôvodným hodnotám spontánnej UPE. Tým sme potvrdili predpoklad, že aplikáciou oxidantu dochádza k zvýšeniu intenzity UPE.

Rozdiely medzi signálmi šumu fotonásobiča, spontánnej UPE a UPE po aplikácii  $\text{H}_2\text{O}$  sme otestovali rovnako ako v predchádzajúcom prípade. Štatisticky významný rozdiel bol zaznamenaný medzi šumom fotonásobiča a spontánnou UPE a šumom fotonásobiča a UPE po aplikácii  $\text{H}_2\text{O}$  ( $p$  - hodnota  $< 0,001$ ), rozdiel medzi nameranou UPE a UPE po aplikácii  $\text{H}_2\text{O}$  bol takisto štatisticky významný ( $p$  - hodnota = 0,002). Z toho vyplýva, že nanosenie  $\text{H}_2\text{O}$  na povrch ruky meraného subjektu ovplyvnilo intenzitu meranej UPE v porovnaní s intenzitou UPE bez aplikácie  $\text{H}_2\text{O}$ . Rozdiel by mohol byť spôsobený tým, že povrchová teplota subjektu sa zvyčajne pohybuje v rozsahu 34 až 36  $^\circ\text{C}$  a aplikovaná  $\text{H}_2\text{O}$  mala izbovú teplotu, ktorá bola 24  $^\circ\text{C}$ . Teplotný rozdiel by mohol byť príčinou zmeny intenzity UPE po aplikácii  $\text{H}_2\text{O}$ .

## 2.4. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU OXIDANTU



Obr. 2.23: Priebeh spontánnej UPE a UPE po aplikácii 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O a 20  $\mu\text{l}$  0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 2.4.3 Vplyv aplikovaného objemu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na intenzitu UPE

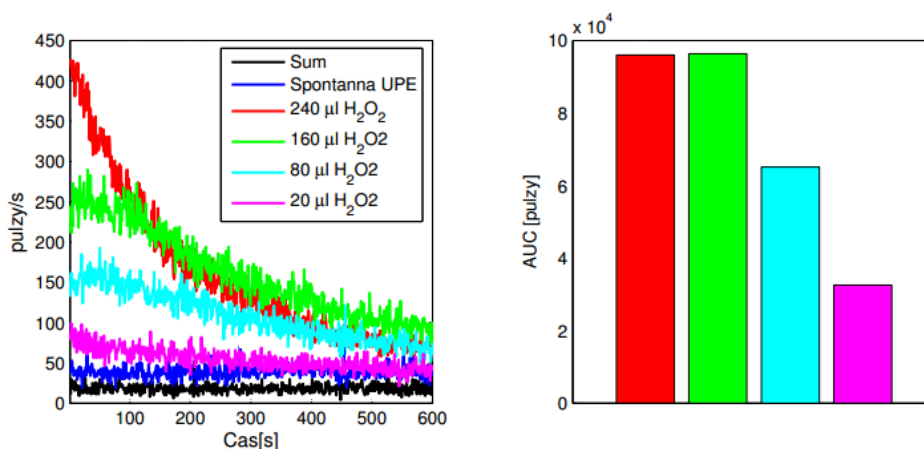
Pre ďalšie meranie indukovaných zmien UPE vyvolaných povrchovou aplikáciou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> musíme zvoliť najvhodnejší objem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Objem musí byť dostatočne malý, aby sa povrch rúk, čo najskôr osušil pred samotným zaznamenávaním, ale musí byť dostatočne veľký na to, aby efekt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bol po osušení pokožky ešte zreteľný.

Vplyv aplikovaného objemu 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na intenzitu UPE bol zaznamenávaný postupne od aplikácie 240  $\mu\text{l}$ , 160  $\mu\text{l}$ , 80  $\mu\text{l}$  a 20  $\mu\text{l}$  0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na palmárnu stranu pravej ruky.

Pre názornejšie porovnanie bola spočítaná pre každý zaznamenaný signál plocha pod krivkou (AUC, Area Under Curve) ako integrál podľa času v Matlabe R2012a.

Z Obr.2.24 je vidieť, že najvyšší nárast intenzity UPE bol dosiahnutý po aplikácii 240  $\mu\text{l}$  0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a so znižujúcim objemom klesala aj počiatočná intenzita UPE po nanesení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Je vidieť, že hodnoty AUC sú veľmi podobné v prípade aplikácie 240  $\mu\text{l}$  a 160  $\mu\text{l}$ . Po aplikácii 240  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bol nárast počiatočnej intenzity vyšší, no zároveň pokles bol prudší ako v prípade aplikácie 160  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, čo ovplyvnilo výsledné hodnoty AUC. Pomalší návrat do pôvodného stavu v prípade aplikácie 160  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by mohol byť spôsobený krátkym časovým intervalom medzi aplikáciami H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 2.4. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU OXIDANTU



Obr. 2.24: Priebeh UPE po aplikácii rôznych objemov 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ako najvhodnejší objem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bol zvolený objem 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pretože počiatočný nárast intenzity UPE je stále dostatočný a zároveň sa pri tomto objeme ruka po aplikácii osuší najskôr, vďaka čomu je možné zaznamenávať UPE takmer ihneď po nanesení oxidantu.

### 2.4.4 Opakovaná aplikácia oxidantu

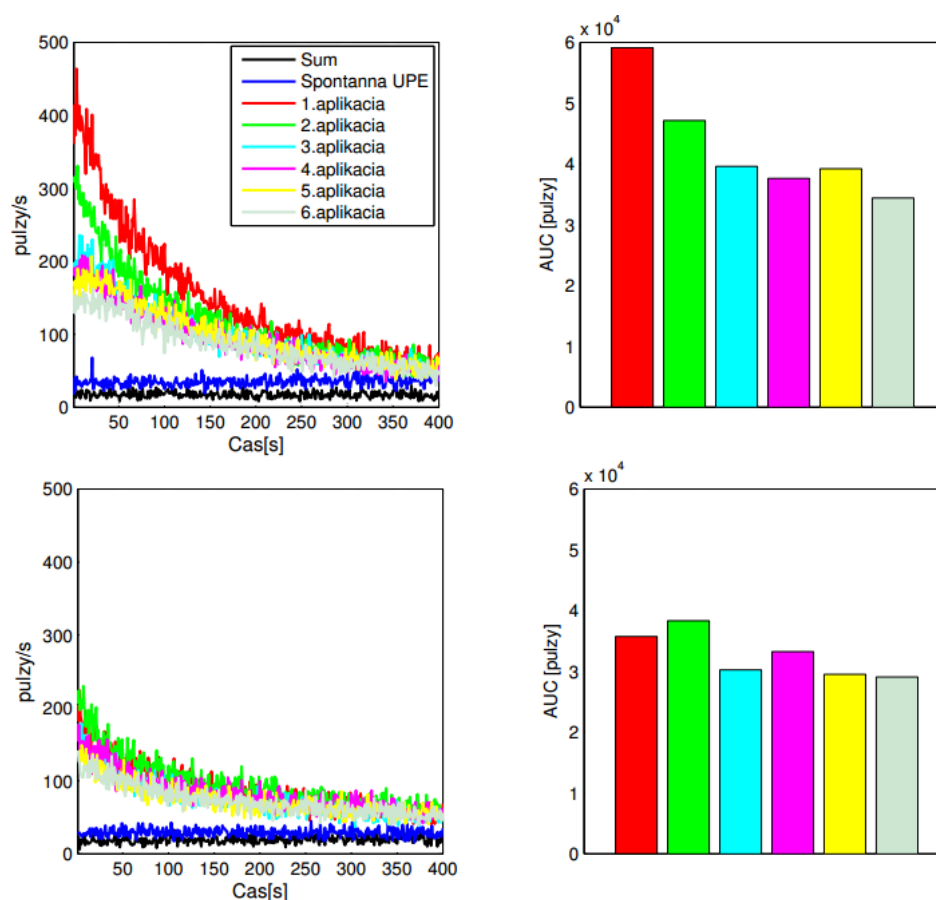
Pri meraní zmeny intenzity UPE po aplikácii oxidantov na pokožku ruky je dôležité vedieť, ako vplýva opakovaná aplikácia oxidantu na intenzitu meranej UPE.

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bol v objeme 20 µl aplikovaný 6 krát na dorzálnu stranu pravej ruky. Medzi každou aplikáciou oxidantu uplynulo vždy 530 s (400 s záznam UPE, 130 s príprava pre ďalšiu aplikáciu). Výsledné grafy sú zobrazené na Obr.2.25. Je vidieť, že efekt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na počiatočnú intenzitu UPE bol najvýraznejší po prvej aplikácii H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Po 3. aplikácii začala mať každá ďalšia aplikácia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veľmi podobný efekt na priebeh UPE, ako vidieť z vypočítaných hodnôt AUC.

Rovnaké meranie sme uskutočnili s časovým odstupom 3 hodín, pretože nás zaujímalo, či mohlo za daný časový interval dôjsť k obnove oxidatívneho stavu kože. Opäť sme 6 krát za sebou aplikovali 20 µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Výsledné priebehy UPE sú na Obr.2.25.

Z grafu je vidieť, že po 3 hodinách nedošlo k úplnej obnove stavu kože, pretože aplikovaný H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nemá rovnaký efekt na intenzitu UPE. Z vypočítaných hodnôt AUC je vidieť, že sú nižšie ako po prvej sade meraní a vykazujú saturáciu po 3. aplikácii. To znamená, že pri zaznamenávaní UPE po aplikácii externých oxidantov na pokožku rúk musíme uvažovať znižujúci sa efekt oxidantu na UPE a počítať s časom, ktorý je potrebný pre obnovu pôvodného stavu kože.

## 2.4. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU OXIDANTU



Obr. 2.25: Hore – priebeh UPE po aplikácii 20 µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 krát za sebou, dole – priebeh UPE po aplikácii 20 µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 krát za sebou po uplynutí 3 hodín

### 2.4.5 Aplikácia rôznych koncentrácií H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Pri experimentoch s aplikáciou exogénnych oxidantoch nás môže zaujímať efekt koncentrácie aplikovaného oxidantu na meranú UPE. Zaujímá nás, či so zvyšujúcou sa koncentráciou aplikovaného oxidantu sa zvyšuje efekt oxidantu na meranú UPE.

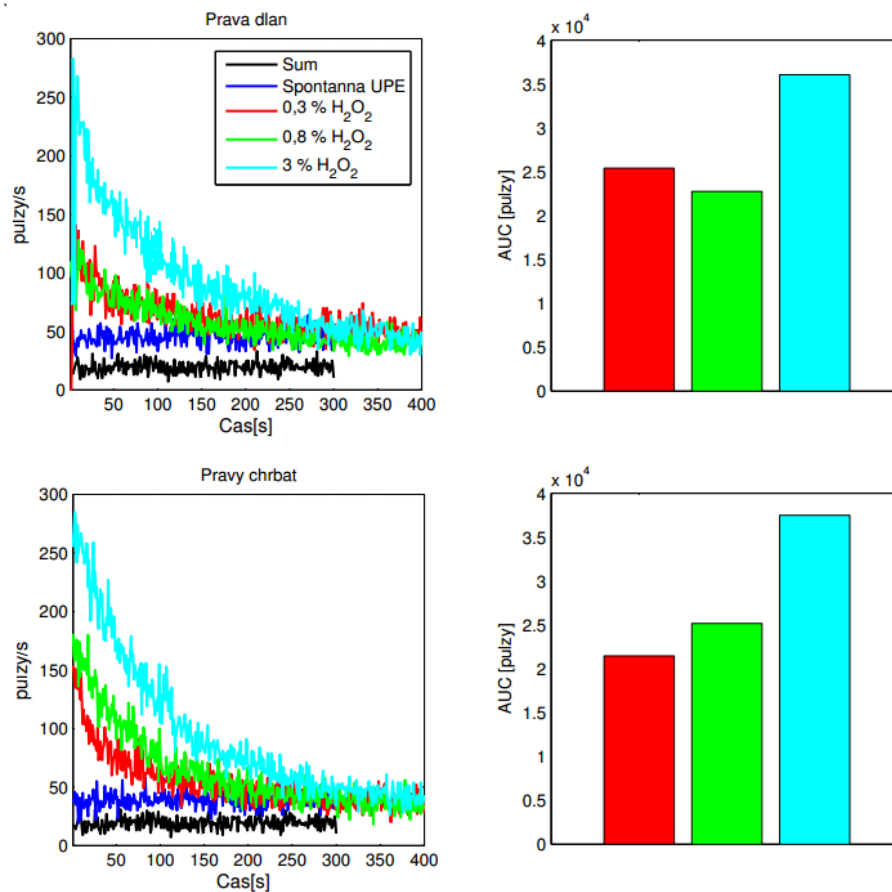
Efekt rôznych koncentrácií na priebeh UPE sa skúmal aplikáciou 0,3%, 0,8% a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ktorý sa nanášal v danom poradí. Výsledné priebehy zaznamenaných signálov UPE z dorzálnej a palmárnej strany sú na Obr.2.26.

Z vypočítaných hodnôt AUC pre pravú dľaň vidieť, že plocha pod krivkou je väčšia v prípade aplikácie 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ako po aplikácii 0,8% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. To môže byť spôsobené tým, že prvá aplikácia na pokožku môže mať výraznejší efekt na signál UPE ako ďalšie aplikácie. Ak sa pozrieme na graf pre dorzálnu stranu ruky, tak vidíme, že hodnota AUC sa zvyšuje s rastúcou koncentráciou aplikovaného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Po ap-



## 2.4. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU OXIDANTU

likácii na dľan ale aj chrbát pravej ruky sme najvyšší efekt na zaznamenaný signál UPE dosiahli po aplikácii 3%  $H_2O_2$ .



Obr. 2.26: Priebeh UPE po aplikácii 20  $\mu$ l 0,3%, 0,8% a 3%  $H_2O_2$

Z výsledkov tak môžeme usudzovať, že s rastúcou koncentráciou aplikovaného  $H_2O_2$  rastie aj efekt na meranú UPE.

### 2.4.5.1 Opakované merania s rôznymi koncentraciami

Meranie s rôznymi koncentraciami sme uskutočnili 3 krát za sebou s cieľom zistiť, ako sa zmení priebeh zaznamenávanej UPE po viacerých aplikáciach rôznych koncentracii  $H_2O_2$ .

V 3 opakovaniach sme postupne za sebou aplikovali 20  $\mu$ l 0,3%, 0,8% a 3%  $H_2O_2$ . Opakovanie experimentov bolo uskutočnené za sebou bez časovej prestávky.

Na Obr.2.27 vidíme výsledné priebehy namerané z pravej dlane. Ak sa zameriame na spočítané hodnoty AUC, tak vidíme, že po druhej aplikácii sú nižšie pre všetky aplikované koncentrácie  $H_2O_2$ . V prípade 3. aplikácie sú hodnoty AUC nižšie pre 0,3% a 0,8%  $H_2O_2$ , ale pre 3%  $H_2O_2$  je hodnota AUC vyššia ako po 2. aplikácii.

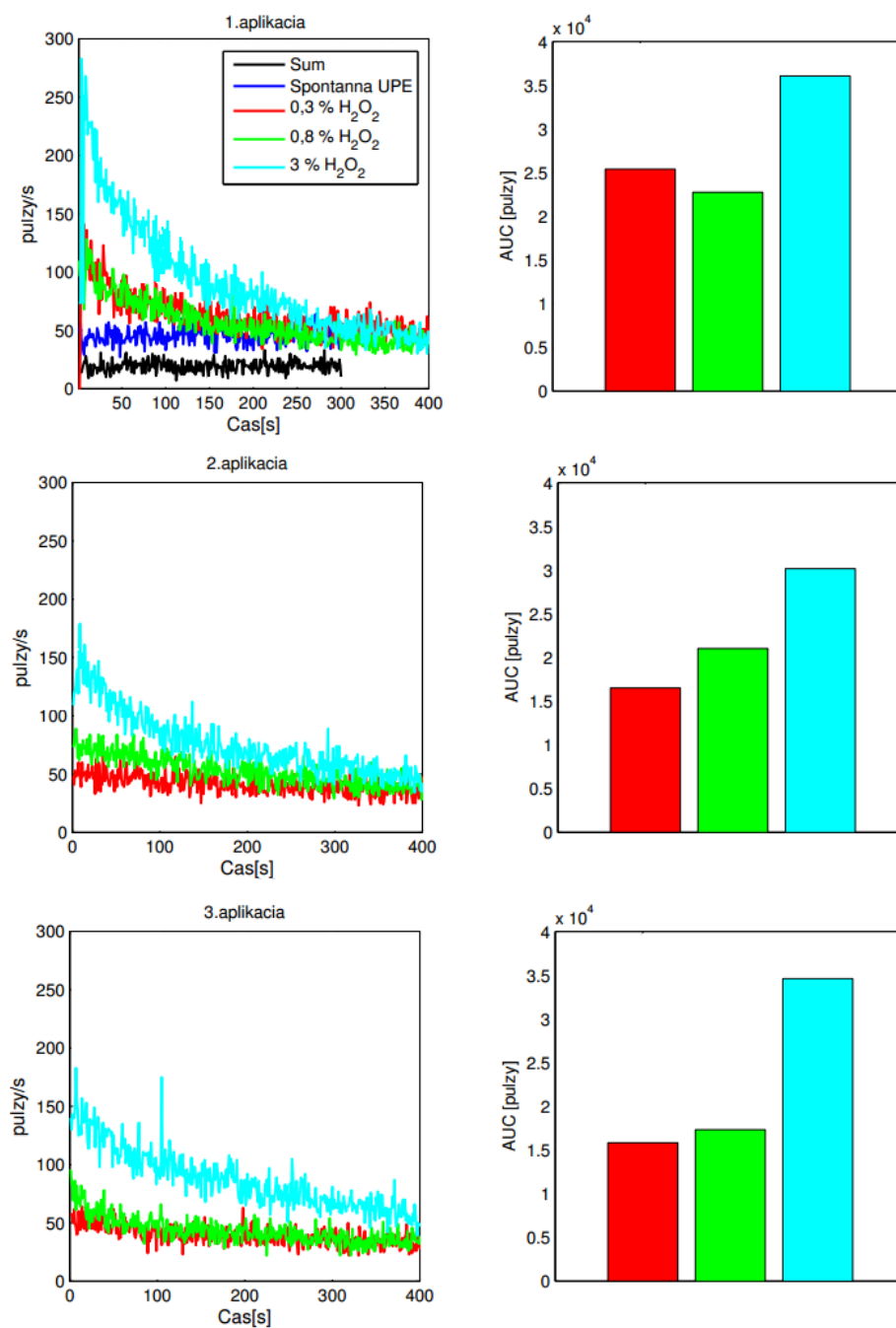
Na Obr.2.28 vidíme priebehy UPE po aplikácií rôznych koncentracii 3 krát za sebou z chrbta pravej ruky. Ak sa opäť zameriame na spočítané hodnoty AUC, tak je vidieť, že sa znižujú s každou ďalšou aplikáciou  $H_2O_2$  pre všetky použité koncentrácie  $H_2O_2$ . V Tab.2.6 sú uvedené vyčíslené rozdiely AUC medzi jednotlivými aplikáciami príslušnej koncentrácie  $H_2O_2$ .

$H_2O_2$	Pravá dľaň		Pravý chrbát	
	1. a 2. aplikácia	2. a 3. aplikácia	1. a 2. aplikácia	2. a 3. aplikácia
<b>0,3%</b>	8890 (35 %)	687 (4 %)	6758 (31 %)	2549 (17 %)
<b>0,8%</b>	1731 (8 %)	3560 (17 %)	7399 (29 %)	3136 (18 %)
<b>3%</b>	5907 (16 %)	-4455 (-14 %)	10 337 (28 %)	6794 (25 %)

Tab. 2.6: Rozdiely AUC medzi opakovanými aplikáciami rozdielných koncentracii  $H_2O_2$  (hodnota v zátvorke vyjadruje percentuálny rozdiel medzi aplikáciami, kladná hodnota vyjadruje pokles a záporná hodnota nárast medzi aplikáciami)

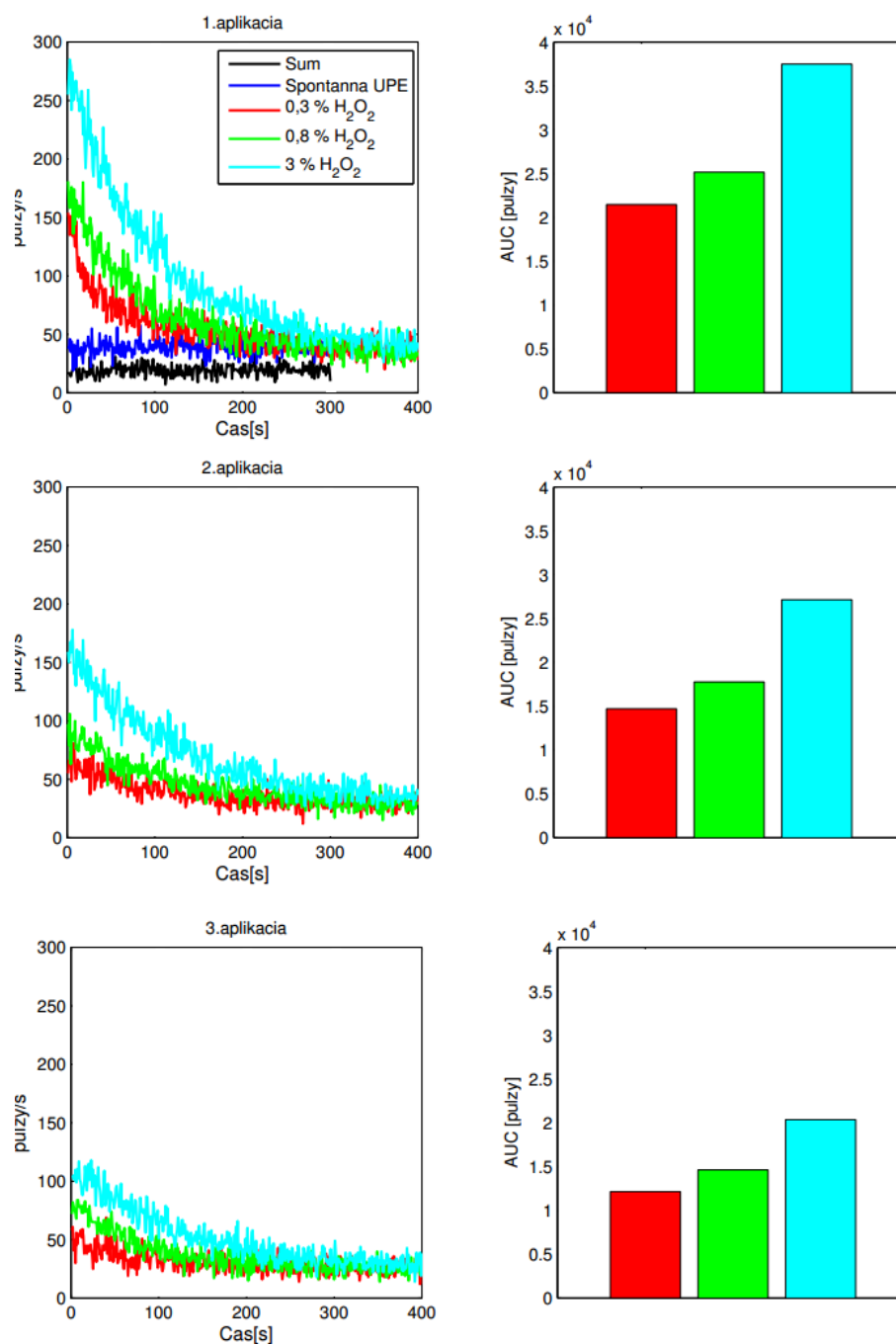
Podobne ako v prípade aplikácie rovnakej koncentrácie  $H_2O_2$  viac krát za sebou, aj tu musíme brať do úvahy, že po viacerých aplikáciach  $H_2O_2$  dochádza k zmene oxidatívneho stavu kože a tým aj k zmene efektu  $H_2O_2$  na meranú UPE.

## 2.4. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU OXIDANTU



Obr. 2.27: Priebeh UPE po aplikácii 20  $\mu$ l 0,3%, 0,8% a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 krát za sebou z palmárnej strany pravej ruky

## 2.4. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU OXIDANTU



Obr. 2.28: Priebeh UPE po aplikácii 20  $\mu$ l 0,3%, 0,8% a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 krát za sebou z dorzálnej strany pravej ruky

## 2.5 Zmeny UPE vyvolané aplikáciou antioxidantu

V poslednej časti diplomovej práce sa zameriame na zmeny UPE po aplikácii antioxidantu a oxidantu na pokožku rúk. Ako antioxidant bola zvolená kyselina askorbová (vitamín C) a ako oxidant bol zvolený  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pri experimentoch sme aplikovali  $20 \mu\text{l}$  5 mM roztoku kyseliny askorbovej a  $20 \mu\text{l}$  3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  pomocou pipety. Nanesené množstvo sme rovnomerne rozotreli po zvolenej časti ruky pomocou ochranných rukavíc.

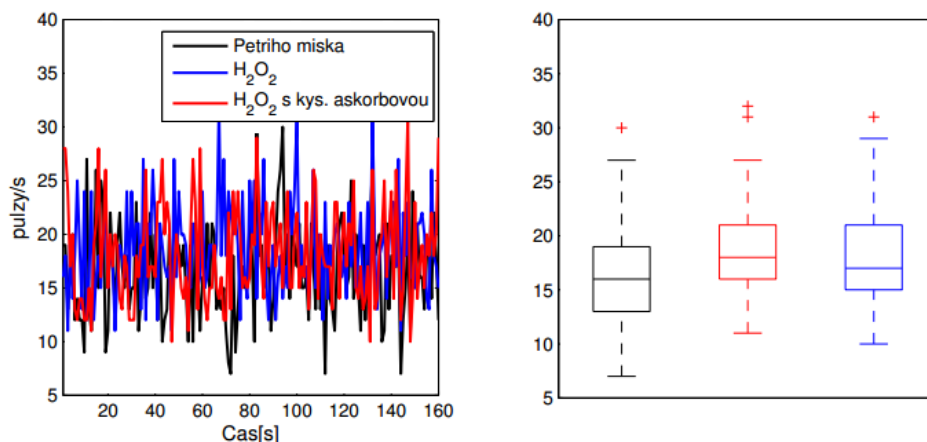
Cieľom týchto experimentov bolo analyzovať vplyv aplikácie antioxidantu na povrch rúk a potvrdiť tak, že po aplikácii antioxidantu dochádza k zníženiu intenzity UPE [12].

### 2.5.1 Interakcia $\text{H}_2\text{O}_2$ a kyseliny askorbovej

Keďže efekt kyseliny askorbovej na intenzitu UPE budeme vyšetrovať pomocou aplikácie kyseliny askorbovej a následnej aplikácie  $\text{H}_2\text{O}_2$  na danú časť ruky, naskytá sa otázka, či samotná interakcia nemôžeme byť zdrojom fotónov. Pre analýzu interakcie kyseliny askorbovej a  $\text{H}_2\text{O}_2$  bol uskutočnený nasledujúci experiment.

Na čistú Petriho misku sme napipetovali  $40 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  a zaznamenali signál. Potom sme k  $\text{H}_2\text{O}_2$  napipetovali  $40 \mu\text{l}$  5 mM roztoku kyseliny askorbovej a zaznamenali signál. Výsledné priebehy sú na Obr.2.29. Z výsledných priebehov by sme mohli usudzovať, že interakcia  $\text{H}_2\text{O}_2$  s kyselinou askorbovou nie je zdrojom fotónov. Aby sme predpoklad štatisticky overili, uskutočnili sme testovanie pomocou balíka *dunn.test*. Štatisticky významný rozdiel na hladine významnosti  $\alpha = 0,05$  bol zaznamenaný medzi signálom Petriho misky a Petriho misky s  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $p$  - hodnota  $< 0,001$ ). Dôležité je, že sme zaznamenali štatisticky nevýznamný rozdiel medzi signálmi Petriho misky s  $\text{H}_2\text{O}_2$  a Petriho misky s  $\text{H}_2\text{O}_2$  a kyselinou askorbovou ( $p$  - hodnota = 0,387). Z výsledkov tak usudzujeme, že interakcia  $\text{H}_2\text{O}_2$  a kyseliny askorbovej nie je zdrojom fotónov.

## 2.5. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU ANTIOXIDANTU



Obr. 2.29: Interakcia  $40 \mu\text{l}$  3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  s  $40 \mu\text{l}$  5 mM roztoku kyseliny askorbovej

### 2.5.2 Opakovaná aplikácia kyseliny askorbovej

V nasledujúcej časti nás bude zaujímať efekt opakovanej aplikácie  $20 \mu\text{l}$  5 mM roztoku kyseliny askorbovej na meranú UPE. Chceme tak zistiť, či aplikácia kyseliny askorbovej bude viesť k zníženiu intenzity UPE a ako bude na intenzitu meranej UPE vplývať opakovaná aplikácia rovnakého objemu kyseliny askorbovej.

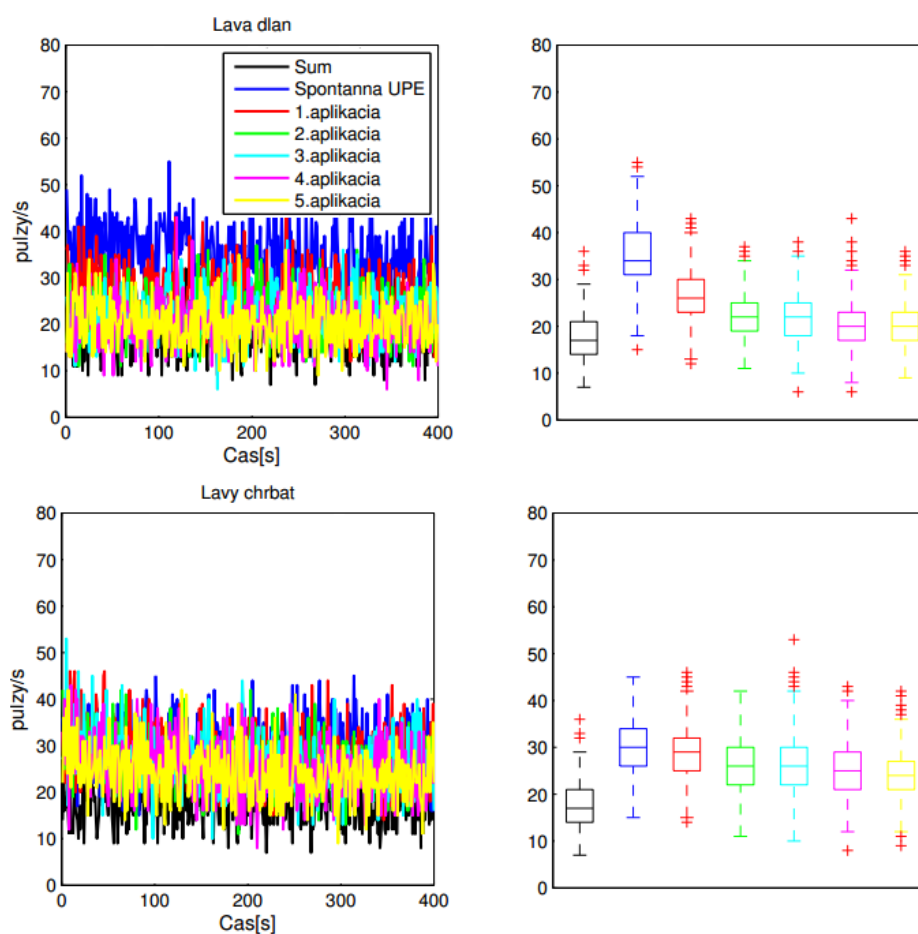
Na Obr.2.30 vidíme priebeh UPE po opakovanej aplikácii  $20 \mu\text{l}$  5 mM roztoku kyseliny askorbovej. Z grafu je vidieť, že po prvej aplikácii kyseliny askorbovej dochádza k poklesu intenzity meranej UPE z priemernej hodnoty 34 pulzov/s na priemernú hodnotu 25,4 pulzov/s pre dľaň ľavej ruky. Po ďalších aplikáciách sú intenzity meranej UPE nižšie a pohybujú sa v priemernej hodnote 20,5 pulzov/s. Štatisticky významný rozdiel na hladine významnosti  $\alpha = 0,05$  bol zaznamenaný medzi signálom spontánnej UPE a UPE po 1. aplikácii kyseliny askorbovej ( $p$  - hodnota  $< 0,001$ ), ďalej medzi signálom UPE po 1. a 2. aplikácii ( $p$  - hodnota  $< 0,001$ ), medzi signálom UPE po 3. a 4. aplikácii ( $p$  - hodnota = 0,002). Štatisticky nevýznamný rozdiel bol zaznamenaný medzi signálmi UPE po 2. a 3. aplikácii kyseliny askorbovej ( $p$  - hodnota = 0,378) a medzi 4. a 5. aplikáciou kyseliny askorbovej ( $p$  - hodnota = 0,111).

Z chrbta ľavej ruky došlo k poklesu z priemerných hodnôt intenzity 30 pulzov/s na 28,3 pulzov/s po prvej aplikácii kyseliny askorbovej. Postupne došlo k poklesu až na priemernú hodnotu 25 pulzov/s. Štatisticky významný rozdiel v signáloch UPE bol zaznamenaný medzi spontánnou UPE a 1. aplikáciou kyseliny askorbovej ( $p$  - hodnota  $< 0,001$ ), medzi signálmi UPE po 1. a 2. aplikácii ( $p$  - hodnota  $< 0,001$ ) a medzi signálmi UPE po 3. a 4. aplikácii ( $p$  - hodnota  $< 0,001$ ). Štatisticky nevýznamný rozdiel sme zaznamenali medzi 2. a 3. ( $p$  - hodnota = 0,311) a medzi 4., a 5. ap-

## 2.5. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU ANTIOXIDANTU

likáciou kyseliny askorbovej ( $p$  - hodnota = 0,082).

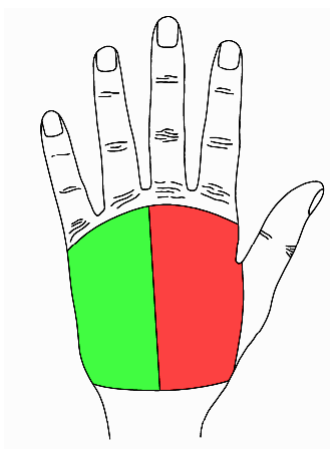
Z grafu je vidieť, že efekt kyseliny askorbovej na meranú UPE bol výraznejší po aplikácii na dľaň meraného subjektu, kde bol pokles intenzít výraznejší. Medzi signálom UPE a signálom UPE po 1. aplikácii kyseliny askorbovej sme zaznamenali štatisticky významný rozdiel pre ľavú aj pravú dľaň a preto usudzujeme, že aplikácia kyseliny askorbovej ovplyvňuje intenzitu UPE a to tak, že vedie k zníženiu intenzity meranej UPE. Ďalšie aplikácie vedú k ďalšiemu zníženiu intenzity meranej UPE, no pre obe merané polohy sme získali štatisticky nevýznamný rozdiel medzi 2. a 3. a medzi 4. a 5. aplikáciou kyseliny askorbovej.



Obr. 2.30: Priebeh UPE po aplikácii 20  $\mu$ l 5 mM roztoku kyseliny askorbovej 5 krát za sebou

### 2.5.3 Ľavo – pravá symetria jednej ruky

Pre ďalšie experimenty budeme na povrch ruky nanášať kyselinu askorbovú a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aby sme mohli popísať efekt kyseliny askorbovej rozdelíme si ruku na dve časti - ľavú a pravú ako vidieť na Obr.2.31. Na obe časti nanesieme  $20 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ideálne chceme, aby sa priebehy nameranej UPE z ľavej a pravej strany ruky čo najviac zhodovali. Ak sa budú zhodovať, môžeme pre ďalšie merania používať ruku rozdelenú na dve časti, čo nám lepšie umožní popísať efekt kyseliny askorbovej.



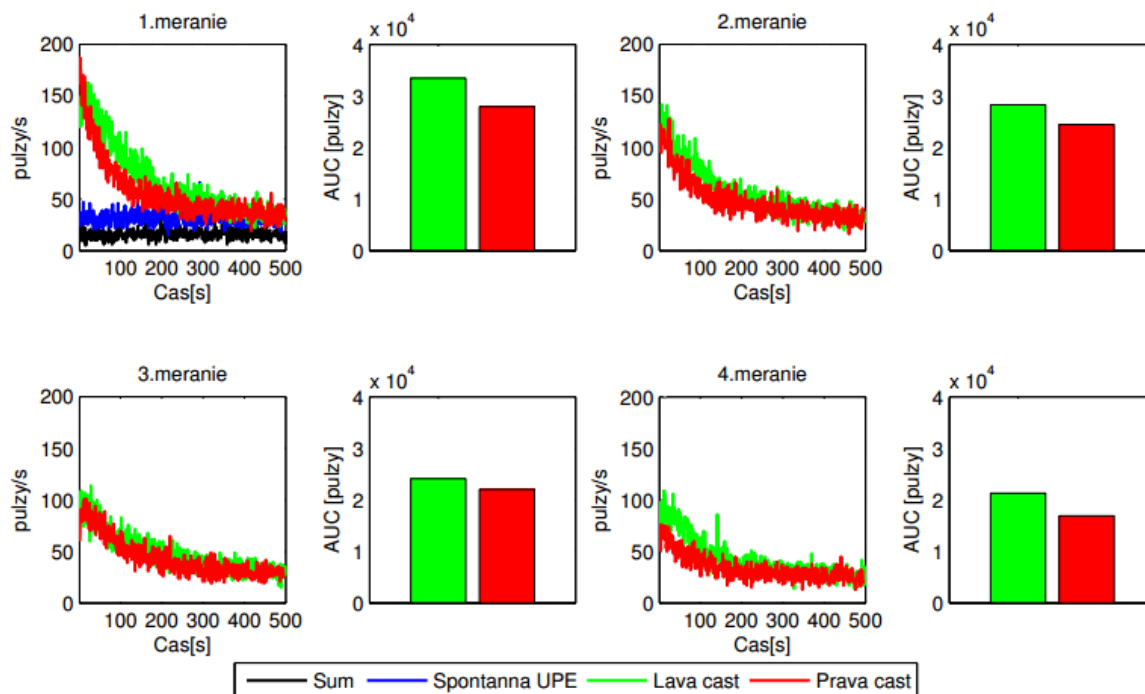
Obr. 2.31: Rozdelenie ruky na pravú a ľavú časť

Výsledné priebehy meranej UPE po aplikácii  $20 \mu\text{l}$  3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ľavú a pravú časť chrbta pravej ruky vidieť na Obr.2.32. Z grafov je vidieť, že priebehy meranej UPE sa v rámci 4 meraní z ľavej a pravej časti ruky približovali, no neboli úplne rovnaké, čo dokazujú spočítané hodnoty AUC v Tab.2.7.

Najväčší percentuálny rozdiel hodnôt AUC sme získali po 4. aplikácii  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ľavú a pravú časť. Najmenší percentuálny rozdiel spočítaných hodnôt AUC sme získali po 3. aplikácii. AUC z ľavej časti chrbta pravej ruky dosahovala vyššie hodnoty ako z pravej časti ruky. Priemerný percentuálny rozdiel AUC bol 15 %. Rozdiel môže byť spôsobený tým, že ruka nemusela byť rozdelená na dve časti úplne symetricky, pretože rozdelenie na časti subjekt uskutočnil okumetricky. Mohlo sa teda stať že plocha ľavej časti ruky bola väčšia ako plocha pravej časti ruky.



## 2.5. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU ANTIOXIDANTU



Obr. 2.32: Priebeh UPE po aplikácii 20  $\mu\text{l}$  3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  na pravú a ľavú stranu ruky

Meranie	Ľavá časť	Pravá časť	Rozdiel ľavej a pravej časti
1.	33 452	27 919	5533 (17 %)
2.	28 296	24 453	3843 (14 %)
3.	24 125	22 027	2098 (9 %)
4.	21 322	16 923	4399 (21 %)

Tab. 2.7: Spočítané hodnoty AUC pre pravú a ľavú časť jednej ruky a vyčíslené rozdiely AUC

Hoci rozdiel medzi hodnotami AUC z ľavej a pravej časti ruky nie je zanedbateľný, budeme rozdelenie jednej ruky na časti používať pre ďalšie experimenty. Pre získanie kvalitnejších výsledkov by bolo potrebné plochu ruky rozdeliť na časti presnejšie, napr. pomocou presne definovaného osovo symetrického geometrického tvaru za pomoci ďalšej osoby.

### 2.5.4 Efekt ošetrenia kože kyselinou askorbovou

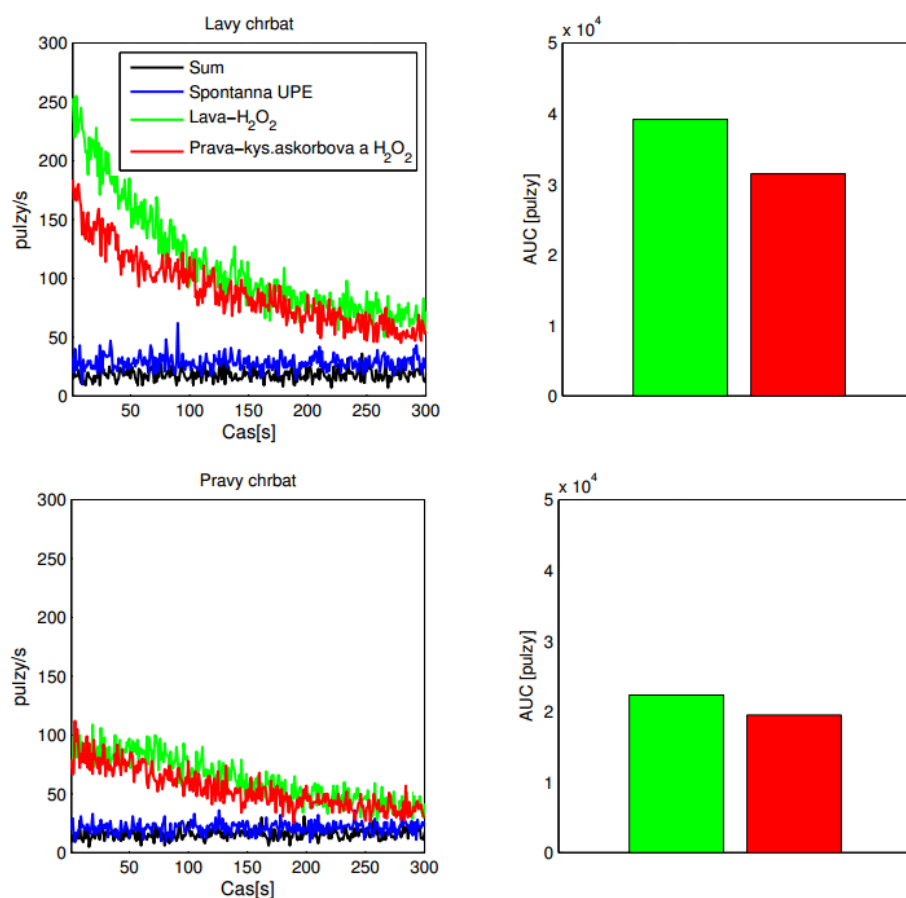
Cieľom nasledujúcich experimentov bolo popísať efekt ošetrenia povrchu kože antioxidantom na meranú UPE po aplikácii oxidantu. Predpokladáme, že po ošetrení kože nebude efekt oxidantu taký výrazný ako v prípade neošetrenej časti ruky.

Pre experimenty s ošetrením kože roztokom kyseliny askorbovej budeme používať rozdelenie ruky na dve časti. Na pravú časť ruky nanesieme 20  $\mu\text{l}$  5 mM roztoku kyseliny askorbovej a po osušení nanesieme na danú časť ruky 20  $\mu\text{l}$  3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  a zaznamenáme UPE. Po zaznamenaní UPE nanesieme na ľavú časť ruky 20  $\mu\text{l}$  3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  bez predchádzajúceho ošetrenia kyselinou askorbovou.

Výsledné priebehy meranej UPE sú na Obr.2.33. V Tab.2.8 sú uvedené vyčíslené hodnoty AUC pre obe ruky a ich ľavú a pravú časť. Je vidieť, že rozdiel medzi ošetrovanou a neošetrovanou stranou ruky bol výraznejší z chrbta ľavej ruky. Hodnota percentuálneho rozdielu AUC bola vyššia ako priemerná hodnota percentuálneho rozdielu AUC v prípade aplikácie  $\text{H}_2\text{O}_2$  na obe strany ruky, ktorý je uvedený v predchádzajúcej časti práce. Preto by sme mohli uvažovať, že ošetrenie kyselinou askorbovou mohlo mať v tomto prípade efekt na výslednú intenzitu UPE. V druhom prípade, pri aplikácii na pravý chrbát je rozdiel medzi hodnotami AUC nižší a tak sa nezdá, že ošetrenie kyselinou askorbovou malo v tomto prípade efekt na výslednú intenzitu UPE. Z výsledkov tak vyplýva, že v prípade chrbta ľavej ruky mohlo mať ošetrenie kyselinou askorbovou efekt na výslednú UPE po aplikácii  $\text{H}_2\text{O}_2$  a v prípade chrbta pravej ruky pravdepodobne ošetrenie kože nemalo efekt na výslednú UPE.

Pre zlepšenie výsledkov daného experimentu by bolo potrebné opäť zpresniť rozdelenie ruky na dve časti a použiť roztok s vyššou koncentráciou kyseliny askorbovej. Meraný subjekt v daný deň uskutočnil na oboch rukách iné experimenty, čo mohlo mať tiež vplyv na výsledky experimentu, pretože došlo k zmenám oxidatívneho stavu kože. Preto by bolo vhodné uskutočniť tieto experimenty na koži, ktorá nebola dlhší čas vystavená zámernému pôsobeniu oxidantov a antioxidantov.

## 2.5. ZMENY UPE VYVOLANÉ APLIKÁCIOU ANTIOXIDANTU



Obr. 2.33: Priebeh UPE po aplikácii 20  $\mu$ l kyseliny askorbovej a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na pravú stranu ruky a 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplikovaných na ľavú stranu ruky

Ruka	Ľavá časť	Pravá časť	Rozdiel ľavá a pravá časť
Ľavá	39 180	31 473	7707 (20 %)
Pravá	22 340	19 499	2841 (13 %)

Tab. 2.8: Spočítané hodnoty AUC pre pravú a ľavú časť chrbta pravej a ľavej ruky

# Diskusia

Cieľom diplomovej práce bolo nájsť vhodné nastavenie fotonásobiča HAMAMATSU R2256-02 a toto nastavenie použiť pre analýzu spontánnych zmien UPE a zmien UPE po povrchovej aplikácii oxidantov a antioxidantov.

Meranie spontánnych zmien prebiehalo v rámci 5 dní. Meranie prebiehalo od 09:00 do 17:45 a subjekt väčšinu svojho dňa strávil v zatemnenej manipulačnej miestnosti. Mechanizmus generovania UPE a mechanizmus oplyvňovania intenzity UPE nie je ešte plne objasnený a preto je dôležité brať do úvahy všetky faktory, ktoré môžu mať vplyv na zmenu fyzického či psychického stavu subjektov a tým vplyv na intenzitu UPE. Jedným z takýchto faktorov môže byť pobyt v tme. Meraný subjekt je zvyknutý na pravidelné striedanie svetla a tmy a meranie spontánnej UPE toto striedanie narušilo, pretože subjekt trávil väčšinu svojho dňa v tme. Tým by mohlo dôjsť k zmenám hladiny niektorých hormónov a tieto zmeny by mohli mať vplyv na fyziologické funkcie ako napr. kolísanie telesnej teploty ale aj funkcia antioxidantného systému. Je však otázne, či počas 5 dní meraní v tme by mohlo dôjsť k zmenám hladiny hormónov, ktoré by ovplyvnili fyziologické funkcie. Na potvrdenie zmien by bolo potrebné uskutočniť rôzne biochemické testy. Ďalším možným faktorom, ktorý by mohol ovplyvniť výslednú intenzitu UPE je poloha ruky pri meraní, ktorá je hlavne pri meraní z ľavej ruky značne nepohodlná. Hoci meranie UPE prebiehalo krátko, niekedy sa stalo, že subjekt pociťoval mravenčenie v danej končatine. Pre určenie či daná poloha ruky neovplyvňuje meranú UPE by bolo vhodné analyzovať pletysmografickú krivku z danej ruky počas merania UPE, pretože meranie relatívnej  $S_pO_2$  pred meraním a po meraní neukázalo koreláciu medzi  $S_pO_2$  a intenzitou UPE. Ak by sme zaznamenávali pletysmografickú krivku počas celého merania, mohli by sme vidieť zmeny, ktoré nemôžeme zachytiť použitím pulzného oximetru pred meraním a po meraní UPE, pri ktorom máme ruku umiestnenú v pohodlnej polohe. Ďalej by bolo vhodné zaznamenávať vlhkosť vzduchu v tmavej komore, hoci je komora teplotne regulovateľná, prítomnosť ruky meraného subjektu by mohla ovplyvniť podmienky v komore.

V rámci analýzy zmien intenzity UPE po aplikácii  $H_2O_2$  sme zistili, že aplikácia  $H_2O_2$  vedie k prudkému nárastu intenzity s pomalým návratom do pôvodného stavu, čím sme potvrdili výsledky iných prác, ktoré pozorovali podobný priebeh [14]. Zaujímavá časť diplomovej práce sa však týka zmien intenzity UPE po opakovaných aplikáciách  $H_2O_2$  na povrch kože meraného subjektu. Tu sme pozorovali, že ďalšie aplikácie vedú k zníženiu počiatočného efektu  $H_2O_2$  na intenzitu UPE. Z výsledkov sa zdá, že sa koža postupne adaptuje na opakované vystavenie  $H_2O_2$ . Celý organizmus je veľmi komplexný systém a najšť presné vysvetlenie bude veľmi ťažké aj vzhľadom na to, že mechanizmus vzniku UPE nie je plne objasnený. Aj cez tieto prekážky sa pokúsime predložiť

---

dve možné vysvetlenia. Na ruku sme si aplikovali  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ktorý je potrebný pre Fentonovú reakciu, čo je reakcia  $\text{H}_2\text{O}_2$  s prechodnými kovmi ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) za vzniku  $\text{HO}^\bullet$  [5]. Dostupnosť prechodných kovov pre Fentonovú reakciu je pravdepodobne hlavným faktorom tvorby  $\text{HO}^\bullet$  [33]. Je tak možné, že opakovanou aplikáciou  $\text{H}_2\text{O}_2$  dochádza k znižovaniu dostupnosti prechodných kovov, ktoré sú potrebné pre Fentonovú reakciu a tvorbu  $\text{HO}^\bullet$ , čo môže viesť následne k znižovaniu intenzity UPE. Druhým dôvodom môže byť činnosť enzýmu kataláza, ktorá katalyzuje rozpad  $\text{H}_2\text{O}_2$  na vodu a molekulárny kyslík [6]. Exogénna aplikácia  $\text{H}_2\text{O}_2$  pravdepodobne vedie k zvýšeniu aktivity katalázy a tak sa zvyšuje aj rozklad  $\text{H}_2\text{O}_2$  [32]. To by mohlo viesť k tomu, že po 1. aplikácii  $\text{H}_2\text{O}_2$  na pokožku dôjde k zvýšeniu aktivity enzýmu, čo môže byť dôvodom, že pri ďalších aplikáciach dochádza k zvýšeniu rozkladu  $\text{H}_2\text{O}_2$  a tým následnému znižovaniu efektu  $\text{H}_2\text{O}_2$  na meranú UPE.

Experimentmi s aplikáciou kyseliny askorbovej na pokožku rúk sme potvrdili daný predpoklad, že aplikácia antioxidantu vedie k zníženiu intenzity UPE [12]. Efekt zníženia intenzity UPE po aplikácii kyseliny askorbovej bol viditeľnejší z dlane meraného subjektu, čo by mohlo súvisieť s hrúbkou vrstvy kože na dlani a chrbte rúk.

# Záver

V rámci diplomovej práce sme našli vhodné nastavenie fotonásobiča HAMAMATSU R2256-02 pre detekciu ultra slabej emisie fotónov (UPE) z rúk ľudských subjektov. Nastavenie sme vybrali podľa najvyššieho odstupu signál-šum  $S/N$  z nameraných signálov UPE vzorky rastlinného oleja. Pre olej sme sa rozhodli na základe toho, že intenzita UPE oleja je nižšia ako druhej použitej vzorky - klíčkov mugo a viac sa tak približuje hodnotám intenzity UPE ľudských subjektov. Na základe toho bolo zvolené napájacie napätie fotonásobiča 1550 V a napätie diskriminátora -500 mV.

Zvolené nastavenie fotonásobiča bolo použité pri analýze spontánnych zmien UPE jedného subjektu počas 5 dní. Každý deň bolo zaznamenaných 5 sád signálov UPE dorzálnej a palmárnej strany oboch rúk v dvojhodinových intervaloch. Medzi nameranými signálmi sme určili štatisticky významné rozdiely ( $p$  - hodnota  $< \alpha$ ). Z výsledkov testovania môžeme tvrdiť, že v rámci každej sady dát, ktorá predstavuje 5 nameraných signálov (napr. signály UPE v rámci 1. dňa merania počas všetkých časov merania a napr. signály UPE v rámci všetkých meraných dní a konkrétneho času merania z pravej dlane) sme získali štatisticky významné rozdiely. Následne sme od nameraných signálov odčítali príslušnú hodnotu šumu a vyniesli rozdiely medzi jednotlivými časmi a jednotlivými dňami. V rámci spontánnych zmien počas dňa sa zdá, že intenzita UPE klesá medzi 09:00 a 11:00 a vykazuje nárast medzi 13:00 a 15:00. V rámci všetkých meraných dní a príslušného času merania sme neobjavili žiaden vzor fluktuácií intenzity UPE. Počas meraní sme zaznamenávali povrchovú teplotu subjektu a  $S_pO_2$  pre účely korelačnej analýzy. Na základe spočítaného Kendallovho korelačného koeficientu môžeme usudzovať na slabý pozitívny vzťah medzi povrchovou teplotou a intenzitou UPE ( $\tau = 0,230$ ,  $p$  - hodnota = 0,0008) a na nulovú koreláciu medzi  $S_pO_2$  a intenzitou UPE ( $\tau = 0,038$ ,  $p$  - hodnota = 0,6180).

Zvolené nastavenie fotonásobiča sme ďalej použili pri analýze zmien intenzity UPE po aplikácií exogénnych oxidantov a antioxidantov. Ako prvú sme uskutočnili analýzu zmien UPE po aplikácií oxidantov, pri ktorej bol ako oxidant zvolený  $H_2O_2$ . Uskutočnili sme viacero experimentov s  $H_2O_2$ , ktorých cieľom bolo popísať zmeny intenzity UPE. Z experimentu s použitím  $H_2O$  a  $H_2O_2$  sme zistili, že po aplikácii  $H_2O_2$  dochádza k prudkému nárastu intenzity UPE s pomalým návratom do pôvodného stavu. Po aplikácií rôznych objemov  $H_2O_2$  s rovnakou koncentráciou sme zistili, že s rastúcim objemom  $H_2O_2$  rastie aj počiatočný nárast intenzity UPE. V ďalšom experimente sme 6 krát za sebou aplikovali 20  $\mu$ l 3%  $H_2O_2$ . Z prvej sady meraní sme zistili, že medzi 1., 2. a 3. aplikáciou dochádza k výraznejším poklesom intenzity UPE ako po ďalších aplikáciách. Z 2. sady me-

---

raní, ktorá bola uskutočnená o 3 hodiny neskôr sa zdá, že nedošlo k obnove stavu kože, pretože aplikovaný  $\text{H}_2\text{O}_2$  mal pri všetkých aplikáciách nižší efekt ako počas 1. sady meraní. Následne sme analyzovali vplyv rôznych koncentrácií  $\text{H}_2\text{O}_2$  na intenzitu UPE. Najvýraznejší nárast intenzity UPE sme zaznamenali po aplikácii 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V poslednom experimente zameranom na analýzu zmien intenzity UPE po aplikácii oxidantov na povrch rúk sme v 3 opakovaniach aplikovali v tomto poradí 20  $\mu\text{l}$  0,3%, 0,8%, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Rozdiel hodnôt spočítanej plochy pod krivkou (AUC) medzi 1. a 2., 2. a 3. aplikáciou 0,3%, 0,8%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ukazuje, že s každou ďalšou aplikáciou došlo k poklesu intenzity UPE pre obe merané polohy ruky. Pri aplikácii 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  došlo k poklesu medzi 1. a 2., 2. a 3. aplikáciou z dorzálnej strany pravej ruky. Z palmárnej strany pravej ruky došlo medzi 2. a 3. aplikáciou k nárastu intenzity UPE.

Pri analýze zmien UPE po aplikácii exogénnych antioxidantov na pokožku rúk sme ako antioxidant zvolili kyselinu askorbovú. Pri opakovanej aplikácii kyseliny askorbovej 5 krát za sebou sme zaznamenali štatisticky významný rozdiel medzi signálom UPE a signálom UPE po 1. aplikácii. Po aplikácii kyseliny askorbovej došlo k zníženiu intenzity UPE. Ďalšie aplikácie vedú k ďalšiemu zníženiu intenzity UPE, avšak štatisticky nevýznamný rozdiel sme zaznamenali medzi 2. a 3., 4. a 5. aplikáciou kyseliny askorbovej. V ďalšom experimente sme chceli potvrdiť, že môžeme pre experimenty používať jednu ruku rozdelenú na dve časti (napr. chrbát pravej ruky rozdelený na pravú a ľavú časť), čo by nám lepšie umožnilo popísať efekt ošetrovania kože kyselinou askorbovou. Pre experiment sme použili  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Bohužiaľ sme nezískali rovnaké hodnoty AUC pre pravú a ľavú stranu ruky, no výsledky naznačujú, že rozdelenie ruky na dve strany by bolo použiteľné, ak by sme zvolili presnejší postup pri delení ruky na časti. Pri poslednom experimente sme rozdelenie ruky na dve časti použili, pretože nás zaujímal efekt ošetrovania kože kyselinou askorbovou, no musíme počítať s tým, že rozdelenie ruky na dve časti nebolo pravdepodobne presné. Experiment z chrbta pravej ruky ukázal rozdiel medzi hodnotami AUC ošetrenej a neošetrenej časti ruky, v prípade chrbta ľavej ruky bol rozdiel medzi ošetrovanou a neošetrovanou časťou ruky malý. Počas všetkých experimentov neboli pozorované žiadne viditeľné povrchové zmeny stavu kože meraného subjektu.

V rámci diplomovej práce sme optimalizovali nastavenie fotonásobiča pre meranie UPE z rúk ľudských subjektov, uskutočnili sme analýzu spontánnych zmien UPE, analýzu vplyvu povrchovej teploty subjektu a  $\text{S}_p\text{O}_2$  na intenzitu UPE a analýzu zmien UPE po aplikácii exogénnych oxidantov a antioxidantov.

# Zoznam použitých skratiek a symbolov

UPE	Ultra slabá emisia fotónov
ROS	Reaktívne formy kyslíka
$O_2^{\bullet-}$	Superoxidový aniónový radikál
$H_2O_2$	Peroxid vodíka
$HO^{\bullet}$	Hydroxylový radikál
$^1O_2$	Singletový kyslík
UV	Ultrafialové žiarenie
$ROO^{\bullet}$	Peroxylový radikál
$RO^{\bullet}$	Alkoxylový radikál
$O_2$	Molekulárny kyslík
ROOH	Hydroperoxid
$NO_2^{\bullet}$	Radikál oxidu dusičitého
RNS	Reaktívne formy dusíka
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
SOD	Superoxid dismutáza
CAT	Kataláza
GPx	Gluthation peroxidáza
ROOR	Dioxetan
ROOOR	Tetraoxid
$^3(R=O)^*$	Tripletové excitované karbonyly
$P^*$	Excitovaný pigment
IR	Infračervené žiarenie
CIE	Medzinárodná komisia pre osvetlenie
CIPM	Medzinárodný výbor pre miery a váhy
CCD	Nábojovo viazaná štruktúra
MIS	Štruktúra kov-izolant-polovodič
$SiO_2$	Oxid kremičitý
OPN	Oblasť hlbokého ochudobnenia
SPE	Jednofotónové udalosti
LLD	Najnižšia úroveň diskriminantu
ULD	Najvyššia úroveň diskriminantu
$S_pO_2$	Relatívna kyslíková saturácia
AUC	Plocha pod krivkou



# Zoznam tabuliek

2.1	Základné vlastnosti fotonásobiča R2256-02 [24] . . . . .	22
2.2	Hodnoty pomeru $S/N$ a $\mu/\sigma$ a príslušných napájacích napätí fotonásobiča pre diskriminátor -500 mV až -1200 mV . . . . .	30
2.3	Hodnoty pomeru $S/N$ a $\mu/\sigma$ a príslušných napájacích napätí fotonásobiča pre diskriminátor -500 mV až -600 mV . . . . .	32
2.4	Priemerné hodnoty rozdielov meranej UPE medzi časmi meraní (hodnoty sú uvedené v pulzoch/s) . . . . .	40
2.5	Priemerné hodnoty rozdielov meranej UPE medzi dňami meraní (hodnoty sú uvedené v pulzoch/s) . . . . .	41
2.6	Rozdiely AUC medzi opakovanými aplikáciami rozdielných koncentrácií $H_2O_2$ (hodnota v zátvorke vyjadruje percentuálny rozdiel medzi aplikáciami, kladná hodnota vyjadruje pokles a záporná hodnota nárast medzi aplikáciami) . . .	51
2.7	Spočítané hodnoty AUC pre pravú a ľavú časť jednej ruky a vyčíslené rozdiely AUC . . . . .	58
2.8	Spočítané hodnoty AUC pre pravú a ľavú časť chrbta pravej a ľavej ruky . . . . .	60

# Zoznam obrázkov

1.1	Vrstvy kože . . . . .	10
1.2	Snímok UPE z dorzálnej strany ruky [15] . . . . .	11
1.3	Indukovaná UPE z dorzálnej strany ruky (hore – indukovaná UPE po aplikácii $O_2^{\bullet-}$ (25 mM xantín + 0,05 U ml <sup>-1</sup> xantín oxidáza), v strede – indukovaná UPE po aplikácii $H_2O_2$ (50 mM $H_2O_2$ ), dole – indukovaná UPE po aplikácii $HO^{\bullet}$ (50 mM $H_2O_2$ + 10 mM $FeSO_4$ )) [14] . . . . .	13
1.4	Možnosti detekcie UPE (Vľavo – spontánna UPE meraná z palmárnej strany ruky pomocou fotonásobiča, vpravo – snímka spontánnej UPE z palmárnej strany ruky získaná pomocou CCD) [14] . . . . .	15
1.5	Konštrukcia fotonásobiča . . . . .	16
1.6	Vľavo – reflexný mód, vpravo – transmisný mód fotokatódy . . . . .	17
1.7	CCD element . . . . .	20
2.1	Experimentálne zariadenie pre meranie UPE z pokožky ruky . . . . .	21
2.2	Schéma meracieho zariadenia . . . . .	22
2.3	Kvantová účinnosť fotonásobiča R2256-02 . . . . .	22
2.4	Typická konfigurácia obvodu pre počítanie fotónov . . . . .	24
2.5	Separované fotóny SPE (Single Photon Event) . . . . .	25
2.6	Výstupné pulzy a diskriminačný level . . . . .	25
2.7	Závislosť počtu detekcií na napájacom napätí fotonásobiča . . . . .	26
2.8	Usporiadanie pri meraní v temnej komore . . . . .	27
2.9	Použitá vzorka klíčkov mungo . . . . .	28
2.10	Použitá vzorka rastlinného oleja . . . . .	28
2.11	Vľavo – nestabilný priebeh signálu pri napájacom napätí 1500 V z klíčkov mungo, vpravo – stabilný priebeh signálu pri napájacom napätí 1500 V z klíčkov mungo . . . . .	29
2.12	Artefakt v signále z oleja pri napätí diskriminátora -600 mV a napájacom napätí fotonásobiča 1600 V . . . . .	29
2.13	Spočítaný pomer $S/N$ a $\mu/\sigma$ pre zvolené nastavenie napätia diskriminátora . . . . .	31
2.14	UPE z dorzálnej strany ruky bez adaptácie subjektu na tmu (vľavo – bez zámerného vystavenia rúk svetlu, vpravo – po zámernom vystavení rúk svetlu) . . . . .	33
2.15	Boxplot nameraných signálov spontánnej UPE počas dňa . . . . .	35
2.16	Boxplot nameraných signálov spontánnej UPE v rámci meraných dní . . . . .	37
2.17	Rozdiel spontánnej UPE medzi jednotlivými časmi merania . . . . .	39
2.18	Rozdiel spontánnej UPE medzi dňami meraní . . . . .	41
2.19	Závislosť priemernej spontánnej UPE na priemernej povrchovej teplote subjektu . . . . .	42

2.20	Histogramy povrchovej teploty subjektu zaznamenej počas jedného dňa z palmárnej a dorzálnej strany oboch rúk . . . . .	43
2.21	Závislosť priemernej spontánnej UPE na priemernej $S_pO_2$ . . . . .	44
2.22	Šum fotonásobiša, luminiscencia Petriho misky a luminiscencia Petriho misky s $240 \mu l H_2O_2$ . . . . .	46
2.23	Priebeh spontánnej UPE a UPE po aplikácii $20 \mu l H_2O$ a $20 \mu l 0,3\% H_2O_2$ . . . . .	47
2.24	Priebeh UPE po aplikácii rôznych objemov $0,3\% H_2O_2$ . . . . .	48
2.25	Hore – priebeh UPE po aplikácii $20 \mu l 3\% H_2O_2$ 6 krát za sebou, dole – priebeh UPE po aplikácii $20 \mu l 3\% H_2O_2$ 6 krát za sebou po uplynutí 3 hodín . . . . .	49
2.26	Priebeh UPE po aplikácii $20 \mu l 0,3\%$ , $0,8\%$ a $3\% H_2O_2$ . . . . .	50
2.27	Priebeh UPE po aplikácii $20 \mu l 0,3\%$ , $0,8\%$ a $3\% H_2O_2$ 3 krát za sebou z palmárnej strany pravej ruky . . . . .	52
2.28	Priebeh UPE po aplikácii $20 \mu l 0,3\%$ , $0,8\%$ a $3\% H_2O_2$ 3 krát za sebou z dorzálnej strany pravej ruky . . . . .	53
2.29	Interakcia $40 \mu l 3\% H_2O_2$ s $40 \mu l 5 mM$ roztoku kyseliny askorbovej . . . . .	55
2.30	Priebeh UPE po aplikácii $20 \mu l 5 mM$ roztoku kyseliny askorbovej 5 krát za sebou . . . . .	56
2.31	Rozdelenie ruky na pravú a ľavú časť . . . . .	57
2.32	Priebeh UPE po aplikácii $20 \mu l 3\% H_2O_2$ na pravú a ľavú stranu ruky . . . . .	58
2.33	Priebeh UPE po aplikácii $20 \mu l$ kyseliny askorbovej a $3\% H_2O_2$ na pravú stranu ruky a $20 \mu l H_2O_2$ aplikovaných na ľavú stranu ruky . . . . .	60

# Literatúra

- [1] CIFRA Michal, POSPÍŠIL Pavel. Ultra-weak photon emission from biological samples: Definition, mechanisms, properties, detection and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2014, 139: 2-10. ISSN 1011-1344. [vid. 2016-01-10]. Dostupné z doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.009. Dostupné tiež z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134414000463>.
- [2] POSPÍŠIL Pavel, PRASAD Ankush, RÁC Marek. Role of reactive oxygen species in ultra-weak photon emission in biological systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2014, 139: 11-23. ISSN 1011-1344. [vid. 2016-01-10]. Dostupné z doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.008. Dostupné tiež z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134414000451>.
- [3] RADOMASKA - LEŚNIEWSKA Dorota M., HEVELKE Agata, SKOPIŃSKI Piotr, BALAN Barbara, JÓŹWIAK Jarosław, ROKICKI Dariusz, SKOPIŃSKA RÓZEWSKA Ewa, BIALOSZEWSKA Agata. Reactive oxygen species and synthetic antioxidants as angiogenesis modulators: Clinical implications. *Pharmacological Reports* [online]. 2016, 68(2): 462-471. ISSN 1734-1140. [vid. 2016-03-15]. Dostupné z doi: 10.1016/j.pharep.2015.10.002. Dostupné tiež z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1734114015003394>.
- [4] GRUNE Tilman, CATALGOL Betul, JUNG Tobias. *Protein Oxidation and Aging* [online]. Somerset, US: Wiley, 2012. ProQuest ebrary. ISBN 9781118492994. [vid. 2016-03-15]. s. 1-22.
- [5] PANTOPOULOS Kostas. *Principles of Free Radical Biomedicine* [online]. New York, US: Nova Biomedical, 2011. ProQuest ebrary. ISBN 9781620817780. [vid. 2016-03-15]. s. 29-36.
- [6] VILLAMENA, Frederick A. *Molecular Basis of Oxidative Stress* [online]. Somerset, US: Wiley, 2013. ProQuest ebrary. ISBN 9781118355862. [vid. 2016-03-15]. s. 113-115.
- [7] FAO/WHO. *Human vitamin and mineral requirements: report of a Joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand* [online]. FAO: Rome. 2001. [vid. 2016-03-15]. s. 73-74, 121-122. Dostupné z: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y2809e/y2809e00.pdf>.
- [8] IVES John A., VAN WIJK Eduard P. A., BAT Namuun, CRAWFORD Cindy, WALTER Avi, B. JONAS Wayne, VAN WIJK Roeland, VAN DER GREEF Jan, et al. Ultraweak Photon Emission as a Non-Invasive Health Assessment: A Systematic Review. *PLoS ONE* [online]. 2014, 9(2): 1-16. [vid. 2016-01-10]. Dostupné z doi: 10.1371/journal.pone.0087401. Dostupné tiež z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087401>.
- [9] TAKEDA Motohiro, TANNO Yukina, KOBAYASHI Masaki, USA Masashi a kolektív. A novel method of assessing carcinoma cell proliferation by biophoton emission. *Cancer Letters*

- [online]. 1998, 127: 155-160. ISSN 0304-3835. [vid. 2016-04-03]. Dostupné z doi: 10.1016/S0304-3835(98)00064-0. Dostupné tiež z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383598000640>.
- [10] TROJAN Stanislav a kolektív. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 2003. ISBN 8024705125. s. 417.
- [11] JABLONSKI, Nina G. *Skin* [online]. Berkeley, US: University of California Press, 2013. ProQuest ebrary. ISBN 9780520954816. [vid. 2016-04-01]. s. 9-17.
- [12] HAGENS Ralf, KHABIRI Faryar, SCHREINER Volker, WENCK Horst, WITTERN Klaus-Peter, DUCHSTEIN Hans-Jürgen, MEI Weiping. Non-invasive monitoring of oxidative skin stress by ultraweak photon emission measurement. II: biological validation on ultraviolet A-stressed skin. *Skin Research and Technology* [online]. 2008, 14: 112-120. ISSN 1600-0846. [vid. 2016-01-11]. Dostupné z doi: 10.1111/j.1600-0846.2007.00207.x.
- [13] VAN WIJK Roeland, VAN WIJK Eduard P.A., VAN WIETMARSCHEN Herman A., VAN DER GREEF Jan. Towards whole-body ultra-weak photon counting and imaging with a focus on human beings: A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2014, 139: 39-46. ISSN 1011-1344. [vid. 2016-01-11]. Dostupné z doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.11.014. Dostupné tiež z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134413002583>.
- [14] PRASAD Ankush, POSPÍŠIL PAVEL. Two-dimensional imaging of spontaneous ultra-weak photon emission from the human skin: role of reactive oxygen species. *Journal of biophotonics* [online]. 2011, 4: 840-849. ISSN 1864-063X. [vid. 2016-01-11]. Dostupné z doi: 10.1002/jbio.201100073.
- [15] VAN WIJK Roeland, VAN WIJK Eduard P.A., SCHROEN Yan, VAN DER GREEF Jan. Imaging human spontaneous photon emission: Historic development, recent data and perspectives. *Trends in Photochemistry & Photobiology* [online]. 2013, 15: 27-40. [vid. 2016-01-13]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/259575110\\_Imaging\\_human\\_spontaneous\\_photon\\_emission\\_historic\\_development\\_recent\\_data\\_and\\_perspectives](https://www.researchgate.net/publication/259575110_Imaging_human_spontaneous_photon_emission_historic_development_recent_data_and_perspectives).
- [16] NAKAMURA Kimitsugu, HIRAMATSU Mitsuo. Ultra-weak photon emission from human hand: Influence of temperature and oxygen concentration on emission. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2005, 80: 156-160. ISSN 1011-1344. [vid. 2016-04-16]. Dostupné z doi: 10.1016/j.jphotobiol.2005.02.005. Dostupné tiež z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134405000667>.
- [17] LAAGER Frédéric, PARK Sang-Hyun, YANG Joon-Mo, SONG Wook, SOH Kwang-Sup. Effects of exercises on biophoton emission of the wrist. *European Journal of Applied Physiology* [online]. 2008, 102: 463-469. ISSN 1439-6327. [vid. 2016-01-17]. Dostupné z doi: 10.1007/s00421-007-0607-4.

- [18] OU-YANG Hao. The application of ultra-weak photon emission in dermatology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2014, 139: 63-70. ISSN 1011-1344. Dostupné z doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.10.003. [vid. 2016-03-15]. Dostupné tiež z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134413002224>.
- [19] *Understanding Photomultipliers*. Uxbridge: ET Enterprises, 2011.
- [20] ČERNOCH Antonín, HADERKA Ondřej. *Detekce světla na úrovni jednotlivých fotonů*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci [online]. 2012, 1.vyd.. ISBN 978-80-244-3113-0. [vid. 2016-03-28]. Dostupné z: [https://fyzika.upol.cz/system/files/slo/rcptm/texty/Cernoch,Haderka-Detekce\\_svetla.pdf](https://fyzika.upol.cz/system/files/slo/rcptm/texty/Cernoch,Haderka-Detekce_svetla.pdf). s. 6-7.
- [21] Světelná účinnost. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-. [vid. 2016-03-28]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Sv%C4%9Bteln%C3%A1\\_%C3%BA%C4%8Dinnost](https://cs.wikipedia.org/wiki/Sv%C4%9Bteln%C3%A1_%C3%BA%C4%8Dinnost).
- [22] *Photomultiplier Tubes: Photomultiplier Tubes and Related Products*. Japan: Hamamatsu Photonics, 2010.
- [23] BELAS E., MORAVEC P. *Polovodičové detektory záření*. Matematicko-fyzikální fakulta, Fyzikální ústav UK, 2013. [vid. 2016-03-29]. Dostupné z: [http://fu.mff.cuni.cz/semicond/media/files/courses/Detekce6\\_3.pdf](http://fu.mff.cuni.cz/semicond/media/files/courses/Detekce6_3.pdf). s. 25-27.
- [24] *Photomultiplier tube R2256-02* [online]. Hamamatsu Photonics K.K.. [vid. 2015-08-01]. Dostupné z: <http://www.hamamatsu.com/us/en/R2256-02.htm>
- [25] *Stanford PS350 High Voltage DC Power Supplies, ±5 kV* [online]. Rohde & Schwarz. [vid. 2015-08-01]. Dostupné z: [http://www.rohde-schwarz.us/en/product/stanford-ps350-productstartpage\\_63493-21633.html](http://www.rohde-schwarz.us/en/product/stanford-ps350-productstartpage_63493-21633.html).
- [26] *Thermoelectric cooler C10372* [online]. Hamamatsu Photonics K.K.. [vid. 2015-08-01]. Dostupné z: <http://www.hamamatsu.com/eu/en/product/alpha/C/3059/C10372/index.html>
- [27] *Photon Counting Unit C9744: Instruction manual*. Japan: Hamamatsu Photonics, 2011. Rev. 1.1.
- [28] *Counting unit C8855-01* [online]. Hamamatsu Photonics K.K.. [vid. 2015-08-01]. Dostupné z: <http://www.hamamatsu.com/us/en/product/alpha/C/3051/C8855-01/index.html>.
- [29] *boxplot* [online]. The MathWorks, Inc.. [vid. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://www.mathworks.com/help/stats/boxplot.html>.

- [30] DINNO Alexis. Package ‘dunn.test’. *The Comprehensive R Archive Network* [online]. The R Foundation, 2016. [vid. 2016-05-18]. Dostupné z: <https://cran.r-project.org/web/packages/dunn.test/dunn.test.pdf>.
- [31] *Test for Association/Correlation Between Paired Samples* [online]. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich. [vid. 2016-05-18]. Dostupné z: <https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/cor.test.html>.
- [32] ANAND Pria, KWAK Yoon, SIMHA Rahul, DONALDSON P. Robert. Hydrogen peroxide induced oxidation of peroxisomal malate synthase and catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online], 2009, 491: 25-31. ISSN 0003-9861. [vid. 2016-05-21]. Dostupné z doi: 0.1016/j.abb.2009.09.019. Dostupné tiež z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000398610900318X>.
- [33] PITERKOVÁ Jana, TOMÁNKOVÁ Kateřina, LUHOVÁ Lenka, PETŘIVALSKÝ Marek, PEČ Pavel. Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organizmu. *Chemické listy* [online]. 2005, 99: 455-466. ISSN 0009-2770. [vid. 2016-05-21]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_07\\_455-466.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_455-466.pdf).