

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Bioluminescencia a jej využitie v medicínálnej diagnostike  
Radka Vaculčíaková

Bakalárska práca  
2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radka Vaculčíaková**  
Osobní číslo: **C15290**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Bioluminiscence a její využití v medicíně diagnostice**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši na téma "Bioluminiscence a její využití v medicíně diagnostice".
2. Popište princip bioluminiscence u živých organismů.
3. Uveďte příklady využití organismů schopných bioluminiscence, a to jak ve stavu výzkumu tak již používaných v praxi.
4. Proveďte diskusi možnosti využití bioluminiscence v medicíně diagnostice se zaměřením na diagnostiku nádorových onemocnění.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Helena Drobná, Ph.D.**

Katedra fyzikální chemie

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzavretie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1. autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47 zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení predpisov a smerniciach Univerzity Pardubice č. 9/2012 bude práca zverejnená v Univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

Súhlasím s prezenčným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici.

V Pardubiciach dňa 1.7.2019

Radka Vaculčíaková

Na tomto mieste by som chcela poďakovať všetkým, ktorí sa akýmkoľvek spôsobom podieľali na vytváraní tejto mojej bakalárskej práce.

Veľká vďaka patrí predovšetkým vedúcej mojej bakalárskej práce, Ing. Helene Drobnej, Ph.D., za jej cenné námety, odborné rady a celkovú podporu pri spracovaní tejto práce.

Veľké ďakujem patrí aj mojej rodine a priateľovi za podporu a pochopenie, ktoré mi prejavovali počas celej doby môjho štúdia.

## **ANOTÁCIA**

Bioluminescencia je citlivá zobrazovacia metóda, ktorá je založená na enzymaticky katalyzovanej oxidácii luciferínu. Luciferín je špecifický substrát a luciferáza je katalyzujúci enzým. Výsledkom tejto reakcie je emisia fotónov. V biologickom výskume je najpoužívanejšia luciferáza zo svetlušiek. Zobrazovanie pomocou bioluminescencie je vysoko citlivá technika, ktorá je vhodná na dlhodobé štúdie v kultivovaných bunkách a živých organizmoch. Má obzvlášť silný vplyv v štúdiách progresie nádoru u živých myší. V súhrne, táto práca je zameraná na živočíchy schopné bioluminescencie a následné využitie bioluminescenčného zobrazovania v oblasti nádorovej diagnostiky.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Bioluminescencia, bioluminescenčné zobrazovanie, luciferáza, luciferín, svätojánske mušky, rakovina, nádorová diagnostika, zvieracie modely.

## **TITLE**

Bioluminescence and its use in medical diagnostic

## **ANNOTATION**

Bioluminescence is a sensitive imaging method, which is based on enzymatically catalyzed oxidation of luciferin. Luciferin is a specific substrate and luciferase is a catalyzing enzyme. Result of this reaction is photon emission. In biological research is the most widely used luciferase of firefly. Bioluminescence imaging is a highly sensitive technique, which is suitable for long-term studies in cultured cells and living organisms. It has a particularly strong effect in tumor progression studies in live mice. In summary, this work is focused on animals capable of bioluminescence and subsequent use of bioluminescence imaging in the field of tumor diagnostics.

## **KEYWORDS**

Bioluminescence, bioluminescence imaging, luciferase, luciferin, fireflies, cancer, tumor diagnosis, animal models.

# OBSAH

<b>ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK.....</b>	<b>-9-</b>
<b>ZOZNAM SKRATIEK.....</b>	<b>-10-</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>-11-</b>
<b>1. BIOLUMINESCENČNÉ ORGANIZMY.....</b>	<b>-13-</b>
1.1. Svätajánske mušky (svetlušky).....	-13-
1.2. Dinoflageláty (riasy).....	-14-
1.3. Baktérie.....	-14-
1.4. Imidazolopyrazín na báze koelenterátov.....	-15-
<b>2. BIOLUMINESCENCIA V EXPERIMENTÁLNEJ ROVINE.....</b>	<b>-16-</b>
2.1. Testy reportérových génov.....	-16-
2.1.1. Reportérový test luciferázy.....	-16-
2.2. Zobrazovanie in vivo.....	-17-
2.3. Analýza proliferácie buniek.....	-17-
<b>3. VÝVOJ BIOLUMINESCENČNÝCH SOND NA LEKÁRSKE A BIOLOGICKÉ ÚČELY.....</b>	<b>-18-</b>
3.1. „Staundinger Ligation“.....	-18-
3.2. „Split Luciferin Reaction“.....	-19-
<b>4. PREHĽAD BIOLUMINESCENČNÉHO ZOBRAZOVANIA REPORTÉROVÝCH MYŠÍ.....</b>	<b>-21-</b>
<b>5. MOLEKULÁRNE ZOBRAZOVANIE BIOLUMINESCENCIE IN VIVO.....</b>	<b>-23-</b>
5.1. Budúcnosť zobrazovania bioluminescencie in vivo.....	-24-
<b>6. BIOLUMINESCENCIA PRI RAKOVINE.....</b>	<b>-25-</b>
6.1. Zobrazovanie tumorgenézy a nádorovej terapie.....	-25-
6.2. Zobrazovanie apoptózy (programovanej bunkovej smrti).....	-25-
6.3. Zobrazovanie nádorovej hypoxie (nedostatku kyslíku v tkanivách).....	-26-
6.3.1. Zobrazovanie produkcie H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	-26-

<b>7. BIOLUMINESCENČNÉ ZOBRAZOVANIE NÁDOROV PRSNEJ ŽEAZY NA BÁZE LUMINOLU.....</b>	<b>-28-</b>
<b>8. BIOLUMINESCENČNÉ ZOBRAZOVANIE RAKOVINY VAJEČNÍKOV VO VNÚTRI MODELU.....</b>	<b>-29-</b>
<b>9. BIOLUMINESCENČNÉ ZOBRAZENIE KORELUJÚCE S PROGRESIOU PEÚCNEHO NÁDORU NA MYŠACOM MODELE.....</b>	<b>-30-</b>
<b>10. VYUŽITIE BIOLUMINESCENČNÉHO ZOBRAZOVANIA PRI VÝSKUME GLIÓMU.....</b>	<b>-31-</b>
10.1. Transgénne modely gliómových myší a BLI.....	-31-
<b>11. BIOLUMINESCENČNÉ ZOBRAZOVANIE RASTU RAKOVINY PANKREASU.....</b>	<b>-33-</b>
<b>12. BIOLUMINESCENČNÉ ZOBRAZOVANIE VÝVOJA KOSTNÝCH METASTÁZ Z KARCINÓMU PRSNÍKA.....</b>	<b>-34-</b>
<b>ZÁVER.....</b>	<b>-35-</b>
<b>POUŽITÁ LITERATÚRA.....</b>	<b>-36-</b>

## ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK

Obrázok 1: Všeobecné reakcie bioluminescencie, A) Reakčná schéma pre luciferín-luciferázovú reakciu, B) Reakčná schéma pre fotoproteínovú reakciu spustenú vápnikom. Produktmi reakcie je emitujúce svetlo ( $h\nu$ ), proteín viazaný oxyluciferín a proteín viazaný coelenteramid [1-4].	- 11 -
Obrázok 2: Bioluminescencia vs. Fluorescencia [5].	- 12 -
Obrázok 3: Bioluminescenčná reakcia svätojánskych mušiek [10].	- 14 -
Obrázok 4: Bioluminescenčná reakcia Dinoflagelátov [9].	- 14 -
Obrázok 5: Bioluminescenčná reakcia baktérií [13].	- 15 -
Obrázok 6: Bioluminescenčná reakcia koelenterátov [16].	- 15 -
Obrázok 7: „Staundinger ligation a jej aplikácia pre zobrazovanie extracelulárnych glykánov, A) Schéma reakcie „Staundinger ligation“, B) Použitie trifenylofosfinového klieťkového luciferínu (TPPCL) na bioluminescenčné zobrazovanie azido cukrov na povrchu buniek [19].	- 19 -
Obrázok 8: Reakčná schéma „Split Luciferin Reaction“ [21].	- 20 -
Obrázok 9: Zobrazenie celkovej aktivity kaspázy 3/7 s peptidom DEVDc a NH <sub>2</sub> -CBT u živých zvierat [22].	- 20 -
Obrázok 10: Ilustrácia techniky in vivo bioluminescenčného zobrazovania u malých zvierat [35].	- 23 -
Obrázok 11: Zobrazovanie produkcie peroxidu vodíka [45].	- 27 -
Obrázok 12: In vivo bioluminescenčné luciferázové „knockdown“. Zníženie luciferázy in vivo po injekcii luciferázovej siRNA (Luc) alebo premiešanej siRNA (SCR) obsahujúcej polymérne nanočastice značené genetický materiál [57].	- 29 -
Obrázok 13: Bioluminescenčné zobrazovanie myšieho mozgu nesúceho ľudské nádorové bunky [64].	- 32 -
Obrázok 14: BLI vo výskume rastu nádoru u myši počas troch mesiacov. Farebná čiara udáva fotónový tok vyjadrený ako počet fotónov/s/cm <sup>2</sup> [66].	- 33 -
Obrázok 15: BLI zobrazovanie kostných metastáz z karcinómu prsníka in vivo [67].	- 34 -

## ZOZNAM SKRATIEK

AMP.....	adenozínmonofosfát
ASP.....	kyselina asparágová
ATP.....	adenozíntrifosfát
BLI.....	bioluminescencia
Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> .....	vápenaté a horčíkové katióny
CBT.....	2-kyanobenzotiazol
Ccd.....	“charge-coupled device“ alebo nábojovo viazaná štruktúra
DEVD.....	pentapeptidická sekvencia Asp-Glu-Val-Asp
FITC.....	fluorescenčné farbivo
FMN.....	flavín mononukleotid
FMNH <sub>2</sub> .....	redukovaný FMN
Glu.....	glukóza
GFP.....	zelený fluorescenčný proteín
hv.....	emitované svetlo
HIF1.....	hypoxiindukčný faktor 1
HRE.....	hypoxická odozva
H <sub>2</sub> N-CBT.....	amino analóg CBT
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	peroxid vodíka
MRI.....	magnetická rezonancia
NAC.....	N-acetylcysteín
NIR.....	blízke (near) infračervené žiarenie
PCL1.....	peroxy-klietkový luciferín-1
PET.....	pozitrónová emisná tomografia
PMN.....	polymorfonukleárne neutrofily
Pfu.....	“plaque-forming unit“
siRNA.....	“small interfering RNA“
Val.....	aminokyselina valín

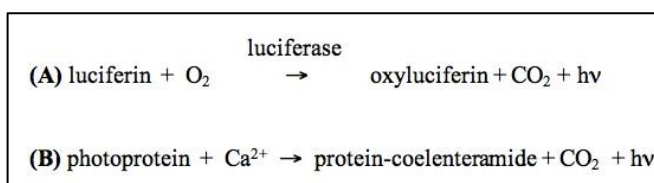
# ÚVOD

Bioluminescencia si v medicínalnej diagnostike našla svoje širokospektrálne uplatnenie. V posledných desaťročiach zobrazovanie pomocou tejto bioluminescenčnej metódy zaznamenalo významný prínos práve v oblasti štúdia metabolických a fyziologických procesov na bunkovej úrovni, často v reálnom čase. Táto technika je založená na detekcii svetla, produkovaná reakciami katalyzovanými enzýmom luciferázou. Je vysoko citlivá a hlavne neinvazívna. Dokáže lokalizovať, detekovať a kvantifikovať rôzne špecifické bunky. S jej pomocou sa osvetľujú aj nádorové bunky a tiež aj iné anatomické znaky ako tepny či kanály, a tiež je možné sledovať priebeh ochorenia a hodnotiť účinnosť terapie.

Táto bakalárska práca je spracovaná formou literárnej rešerše a je zameraná na popis bioluminescencie ako pokrokovej techniky v medicínalnom prostredí. Stručne popisuje organizmy schopné bioluminescencie a následne využitie bioluminescenčného zobrazovania v nádorovej diagnostike.

Luminescencia ako taká je emisia svetla, ktorá je výsledkom chemickej reakcie bez produkcie akéhokoľvek tepla alebo tepelných zmien. Takýto typ svetla je jasne odlišný od svetla, ktoré je sprevádzané uvoľňovaním tepla, čo je dôvod, prečo sa žiarovky počas používania zahrievajú [1-4]. Sú známe dva typy luminescencie:

1. Bioluminescencia – svetlo emitované z biologických zdrojov
2. Chemiluminescencia – svetlo emitované z nebiologických zdrojov počas chemickej reakcie

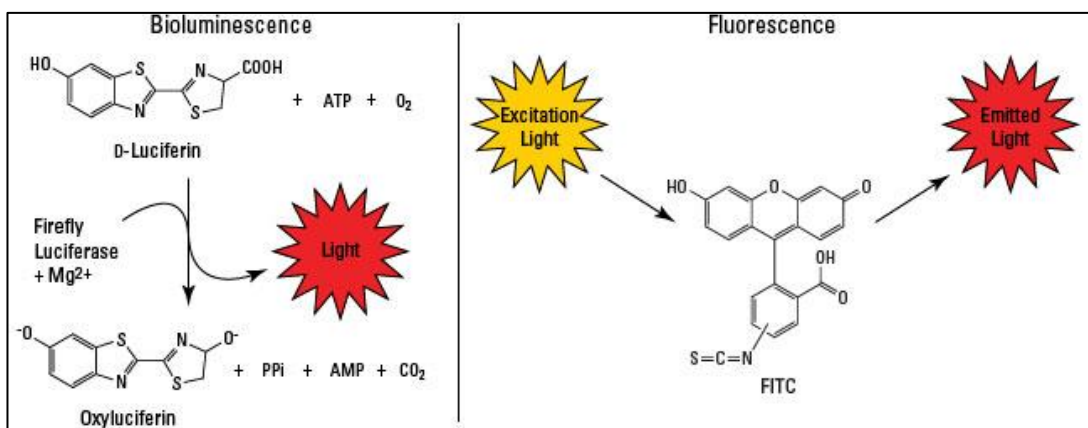


Obrázok 1: Všeobecné reakcie bioluminescencie, A) Reakčná schéma pre luciferín-luciferázovú reakciu, B) Reakčná schéma pre fotoproteínovú reakciu spustenú vápnikom. Produktmi reakcie je emitujúce svetlo (hv), proteín viazaný oxyluciferín a proteín viazaný coelenteramid [1-4].

Vyžarovanie svetla z živých organizmov je možné dvoma cestami. Prvá je nazývaná luciferín-luciferázový systém, kde substrát luciferín je oxidovaný enzýmom luciferázou za prítomnosti kyslíka a určitých kofaktorov (obrázok 1A). V druhej ceste sa luciferín ako enzymatický komplex viaže spolu s kyslíkom do vopred nabitej zlúčeniny nazývanej fotoproteín (obrázok 1B). Luciferáza je enzým, ktorý je potrebný na katalyzáciu, teda urýchlenie celej reakcie [1-4].

Fotogenické bunky, tzv. fotocyty, v ktorých sa generuje bioluminescencia na základe chemickej reakcie, sú často súčasťou orgánov zvaných fotofory. Každá luciferáza je genómovým produktom, čo znamená, že je druhovo špecifická. Luciferíny sú aj napriek tomu rozšírenejšie než luciferázy. Rovnaký luciferín môže byť použitý ako substrát v nesesterských taxónoch, ako sú ryby a kôrovce. Boli objavené desiatky svetelných systémov zahŕňajúce rôzne kombinácie luciferínov, enzýmov a kofaktorov. Je viac než pravdepodobné, že mnoho ďalších ich ešte objavených bude [1-4].

Bioluminescencia je jav často zamieňaný s fluorescenciou a fosforescenciou.



Obrázok 2: Bioluminescencia vs. Fluorescencia [5].

Fluorescencia (vpravo na obrázku 2) je produktom fluoforu, napr. farbiva FITC. Jedná sa o sekundárnu emisiu fotónov pri návrate elektrónov z excitovaného stavu, ktorý bol dosiahnutý absorpciou žiarenia. Excitačné a emisné žiarenie majú obvykle odlišné vlnové dĺžky. Fosforescencia je jav podobný fluorescencii s výnimkou, že excitovaný stav je stabilnejší a čas do uvoľnenia energie automaticky o niečo dlhší. To vedie k určitému žiareniu aj po odstránení svetla. Bioluminescencia (vľavo na obrázku 2) je produktom reakcie enzýmu luciferáza a jeho substrátu, napr. luciferáza svättojánskej mušky a luciferín. Kofaktory ako sú ATP a O<sub>2</sub> sa môžu meniť a to na základe použitej luciferázy. Napríklad pre svetlušky sú typické kofaktory ATP a Mg<sup>2+</sup>, pre fotoproteíny sú to Ca<sup>2+</sup> [5].

Spektrálne rozloženie bioluminescencie je často podobné ako u fluorescencie. Avšak bioluminescenčné farby môžu byť vyladené proteínovým prostredím produktu excitačného stavu. To je vlastnosť vyvinutá na komunikáciu, obranu pred predáciou a podobne [6].

Viditeľné žiarenie korešponduje so svetlom v rozmedzí vlnových dĺžok 400-700 nm. Bioluminescenčné spektrá sú široké pásma o šírke polovičnej výšky v rozsahu 60-100 nm. Maximálna hodnota u morských druhov sa pohybuje v rozpätí 450-510 nm a ich vizuálna citlivosť je najvyššia pre modrozelené svetlo. U suchozemských druhov je vlnová dĺžka vyššia než 500 nm a najvyššiu citlivosť majú prevažne pre zelenožlté až žlté svetlo [6].

# 1. BIOLUMINESCENČNÉ ORGANIZMY

Bioluminescencia je schopnosť živých organizmov emitovať viditeľné svetlo. Luminescenčných zástupcov môžeme nájsť vo vodnom ale aj suchozemskom prostredí. Radia sa medzi nich napríklad morské aj suchozemské baktérie, segmentované červy, chrobáky (svetlušky), riasy (Dinoflageláty), kôrovce (krevety), mäkkýše (chobotnice, mušle), medzipleodiny (medúzy), rôzne kostnaté či chrupavkovité ryby. Luminescenčné stavovce, cicavce, víry či vyššie rastliny neexistujú, okrem tých, ktoré sa podarilo vytvoriť pomocou rekombinantnej techniky. Keďže základným substrátom v bioluminescenčných reakciách produkujúcich svetlo je luciferín, v organizmoch sa buď syntetizuje alebo je im podávaný formou potravy [7].

Vo väčšine bioluminescenčných reakciách nachádzame spoločný reaktant kyslík a taktiež konjugovaný systém ako súčasť jedného zo substrátov. Oba sú potrebné na tvorbu molekúl v excitovanom stave, čo vedie k emisii viditeľného svetla. Avšak v niektorých organizmoch existujú reakcie, ktoré sú odlišné, a tým pádom sú odlišné aj katalyzujúce enzýmy a substráty. Na základe tohto zistenia sa rozlišujú štyri bioluminescenčné systémy, ktoré boli študované do detailov a poukazujú tak na rozdiely medzi sebou ale aj na spoločné znaky [8].

Rozdelenie štyroch bioluminescenčných systémov:

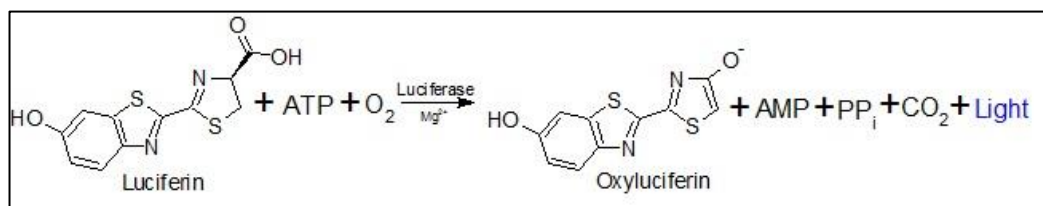
1. Svätajánske mušky (svetlušky)
2. Dinoflageláty (riasy)
3. Baktérie
4. Imidazolopyrazín na báze koelenterátov

## 1.1. Svätajánske mušky (svetlušky)

Z biologického hľadiska väčšina chrobákov je známa tým, že dokáže vytvárať určitý druh hudby. Svätajánske mušky naopak, vytvárajú svetlo. Toto svetlo produkujú pomocou špecializovaných orgánov, ktoré majú umiestnené na brušnej strane, a ktoré im v prvom rade slúžia pri rozpoznávaní druhov počas párenia. Samice aj samce sú druhovo špecifické, preto každý z nich má svoje vlastné svetelné vzory [9].

Z chemického hľadiska luciferázy obsiahnuté vo svetluškách katalyzujú ATP závislú dekarboxyláciu luciferínu (obrázok 3). Vytvorí sa derivát AMP luciferín, ktorý následne reaguje s  $O_2$ . Výsledkom je uvoľnenie  $CO_2$  a vyžiarené svetlo o vlnovej dĺžke v rozmedzí 550-630 nm. Na spodnej hranici sa jedná o pásmo zeleného svetla, na vrchnej o pásmo svetla

červeného. Vo všeobecnosti svetlušky počas procesu dvorenia vydávajú svetlo žltej až zelenej farby [9].

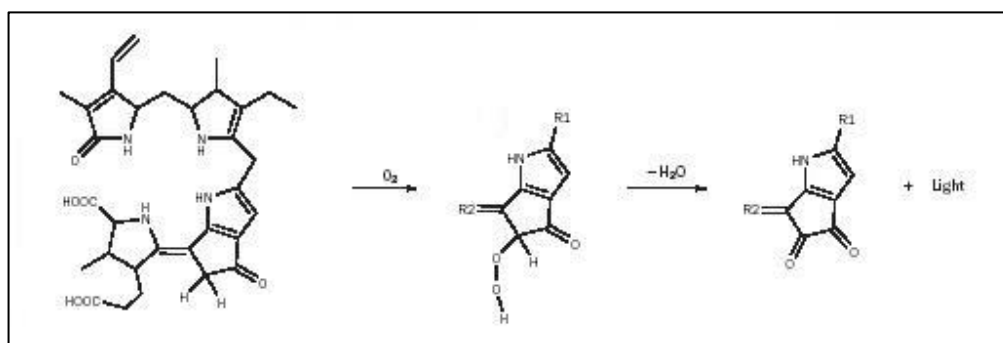


Obrázok 3: Bioluminescenčná reakcia svätojánskych mušiek [10].

## 1.2. Dinoflageláty (riasy)

Niektoré Dinoflageláty majú na produkciu bioluminescencie pozoruhodné bunkové, genetické a biochemické mechanizmy. Druhy schopné bioluminescencie sa objavujú na povrchu vôd po celom svete. Sú náchylné na pohyb lodí a rýchly pohyb rýb, reagujú na ne špecifickými zábleskami, čím spôsobujú určitú nezameniteľnú žiaru.

V tejto bioluminescenčnej reakcii je luciferín redukovaný tetrapyrrol pozostávajúci zo štyroch päťčlenných kruhov zložených z jedného dusíka a štyroch uhlíkov. Oxidácia prebieha za prítomnosti dinoflagelátovej luciferázy, vzniká peroxy medziprodukt a následne za odštiepenia vody modrozelené svetlo s vlnovou dĺžkou 470 nm (obrázok 4) [9].

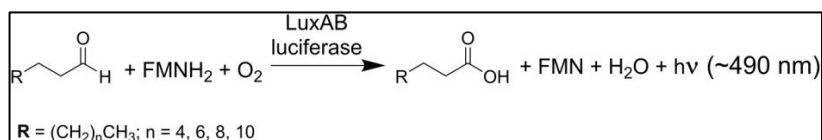


Obrázok 4: Bioluminescenčná reakcia Dinoflagelátov [9].

## 1.3. Baktérie

Luminescenčné baktérie môžeme nájsť v suchozemskom prostredí ako napríklad symbionty háďatiek. Viac rozšírená je ich prítomnosť v morských biotopoch. Žijú tam voľne plávajúce, sediace alebo sú v symbióze s inými morskými organizmami.

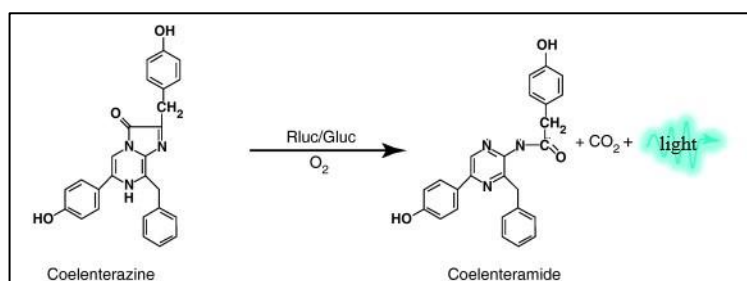
Do chemickej reakcie (obrázok 5) v tomto prípade vstupuje aldehyd s dlhým reťazcom ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CHO}$ ), redukovaný flavín mononukleotid ( $\text{FMNH}_2$ ) a molekulárny kyslík ( $\text{O}_2$ ). Všetky reaktanty sa konvertujú za pomoci enzýmu luciferázy na zodpovedajúcu kyselinu s dlhým reťazcom, oxidovaný flavín mononukleotid ( $\text{FMN}$ ), vodu a vyžiarené svetlo intenzívnej modrej farby o približnom maxime vlnovej dĺžky 490 nm [11, 12].



Obrázok 5: Bioluminescenčná reakcia baktérií [13].

#### 1.4. Imidazolopyrazín na báze koelenterátov

Luciferíny, ktoré majú štruktúry založené na imidazolopyrazíne, sa z veľkého množstva nachádzajú v kmeňoch žijúcich v oceánoch. Reakcia (obrázok 6) spočíva v oxidácii imidazolopyrazínového kruhu (Koelenterazínu) za vzniku Koelenteramidu, uvoľnenia  $\text{CO}_2$  a vyžiarenia modrého svetla o vlnovej dĺžke v rozsahu 460-480 nm [14, 15].



Obrázok 6: Bioluminescenčná reakcia koelenterátov [16].

Luciferázy luminescenčných druhov sa od seba značne odlišujú. Mnohé morské organizmy získavajú luciferíny požívaním iných organizmov schopných luminescencie. To má za následok stúpanie distribúcie luciferínov na báze imidazolopyrazínu. Niektoré luminescenčné druhy majú fluorescenčný proteín, ktorý absorbuje a následne vyžiari svetlo s vyššou vlnovou dĺžkou. Mnoho ďalších druhov má väzbový proteín, ktorý uvoľňuje luciferín po prijíme  $\text{Ca}^{2+}$  [14, 15].

## **2. BIOLUMINESCENCIA V EXPERIMENTÁLNEJ ROVINE**

Luciferáza ako taká disponuje s veľkou popularitou v oblasti štúdií biologických systémov. Je to z hľadiska toho, že bioluminescencia sa radí medzi vysoko citlivé testy a jej reagenty sú ľahko použiteľné. Najbežnejšie oblasti používania bioluminescencie sú:

1. Testy reportérových génov
2. Zobrazovanie in vivo
3. Analýza proliferácie buniek

### **2.1. Testy reportérových génov**

Reportérové gény sú gény umožňujúce detekciu či meranie génovej expresie. Obsahujú gény kódujúce fluorescenčný proteín a enzýmy so schopnosťou konvertovať neviditeľné substráty na farebné až luminescenčné produkty.

Technológia reportérového génu je využívaná na monitorovanie bunkových reakcií spojených s expresiou génu a signálnou transdukciou (prenos úseku génu z jednej bunky do druhej prostredníctvom vírusov). Na základe spájania transkripčných kontrolných prvkov s rôznorodými reportérovými génmi signalizuje účinky reťazových reakcií vo vnútri bunky. Monitoruje aj množstvo exprimovaného reportérového proteínu.

Testy sú vysoko citlivé, spoľahlivé, bez problému merania vo veľkých meradlách. V závislosti s experimentálnym systémom, citlivosťou a dostupnou stratégiou detekcie, či už sa jedná o bioluminescenciu, fluorescenciu alebo absorbanciu je spôsobený výber reportérového systému. Tradične používané proteíny v úlohe reportérov obsahujú najčastejšie p-galaktozidázu,  $\beta$ -glukuronidázu, chloramfenylacetyltransferázu a zelené, žlté alebo červené fluorescenčné proteíny [5, 17].

#### **2.1.1. Reportérový test luciferázy**

Reportérové testy založené na báze luciferázy majú široké využitie vďaka ich ultracitlivej detekčnej kapacite a širokému dynamickému rozsahu. Tieto testy zahŕňajú umiestnenie geneticky regulačného prvku tzv. proti prúdu luciferázového génu a ďalej prenos výslednej reportérovej konštrukcie pomocou transfekcie, transformácie alebo injekcie do živočíšnych, rastlinných a bakteriálnych buniek. Nakoniec je meraná expresia reportérového génu luciferázy na kvantifikovanie aktivity regulačného prvku alebo proteínov na biologickej dráhe [5].

## **2.2. Zobrazenie in vivo**

Zobrazenie in vivo, teda v živom organizme, je neinvazívna metóda, ktorá sa dostáva ľahko a rýchlo do biomedicínskych výskumov. Je to hlavne vďaka schopnosti sledovať udalosti na molekulárnej úrovni u živých zvierat ako sú myši a potkany.

V modeloch zvieracích ochorení sú bunky, patogény, proteíny a množstvo ďalších molekúl označené bioluminescenčnými luciferázami. Po lokalizácii a systémovom pridaní substrátu sú tiež vizualizované.

Bioluminescencia môže byť detegovaná citlivým detekčným systémom bez ohľadu na to, z akého hlbokého vnútra experimentálneho zvierat'a je emitovaná. Je to vďaka svetlu, ktoré má schopnosť prechádzať tkanivom. Úroveň prieniku závisí od emitovaného svetla a jeho vlnovej dĺžky. Pre in vivo zobrazovacie metódy majú najväčšiu citlivosť luciferázy, ktoré emitujú svetlo pri vlnových dĺžkach vyšších než 600 nm [5].

## **2.3. Analýza proliferácie buniek**

Bioluminescenčné testy v dnešnej dobe zasahujú už aj k monitorovaniu životaschopnosti a proliferácie (bujnenie, chorobný rast tkaniva) buniek. Ide o kvantifikáciu voľného ATP, ktorý je prítomný v metabolických bunkách používajúce ATP závislé luciferázy. Množstvo dostupného ATP sa zvyšuje rovnomerne s proliferáciou bunkovej populácie, čo má za následok jej sprievodné zvýšenie bioluminescenčného signálu [5].

### 3. VÝVOJ BIOLUMINESCENČNÝCH SOND NA LEKÁRSKE A BIOLOGICKÉ ÚČELY

Bioluminescencia sa radí medzi optickú zobrazovaciu metódu, ktorá je založená na enzymaticky katalyzovanej oxidácii luciferínu. Jej výsledkom je emisia fotónov. Enzýmami katalyzujúce túto reakciu a jej špecifický substrát sú luciferín a luciferáza. Existuje viacero luciferín-luciferázových párov, ale pre biologický výskum sú najčastejšie využívané tie, čo pochádzajú zo svetlušiek (*Photinus pyralis*) [18].

V priebehu 20 rokov boli vyvinuté bioortogonálne reakcie, ktoré boli úspešne aplikované na vývoj zobrazovacích nástrojov, vrátane bioluminescenčných sond na lekárske a biologické účely. V súčasnosti existujú dve bioortogonálne reakcie, ktoré boli aplikované na vývoj bioluminescenčných sond:

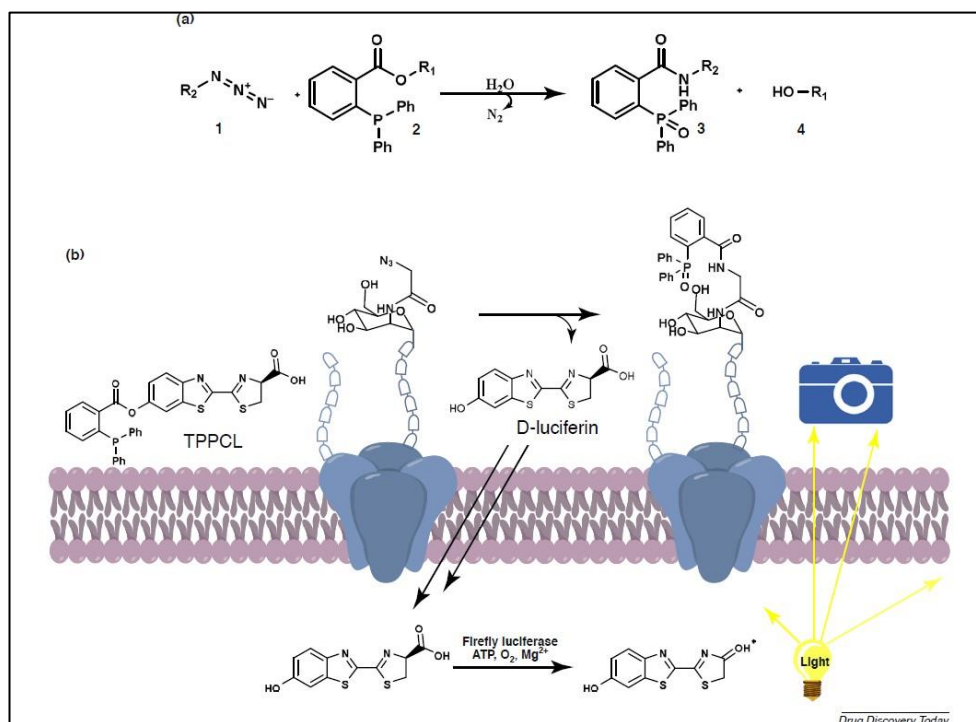
1. „Staundinger Ligation“
2. „Split Luciferin Reaction“ [19]

#### 3.1. „Staundinger Ligation“

Táto reakcia bola po prvý krát opísaná v roku 2000. Je založená na pôsobení medzi organickým azidom a esterom kyseliny 2-(difenylfosfino) benzoovej (obrázok 7A). Výsledkom reakcie je uvoľnenie alkoholu korešpondujúceho s vstupným esterom a ligačný produkt. Na základe tejto reakcie a následnom prístupe kliečkového luciferínu je založená bioluminescenčná sonda na detekciu extracelulárnych glykánov. Glykozylácia fosfolipidov a proteínov je na vonkajšom povrchu bunkovej membrány pevne regulovaná. Zmeny v extracelulárnej glykánovej štruktúre sú zahrnuté v mnohých vývojjoch niekoľkých patologických stavov, vrátane chronických zápalov a rakoviny [19].

Syntetizovaná kliečková luciferínová sonda zahŕňa konjugovaný ester luciferínu a 2-(difenylfosfino) benzoovú kyselinu. Táto sonda uvoľní luciferín po reakcii s azido-značeným stavebným blokom monosacharidu predtým začleneným v extracelulárnej glykánovej štruktúre pomocou metabolického značenia (obrázok 7B). To znamená, že dlhodobá inkubácia luciferázy exprimujúcej bunky v rastovom médiu, obsahujúcom určitú koncentráciu azido-cukrov, viedla k biosyntéze azido-značeným extracelulárnym glykánom. Následná liečba buniek s kliečkovým luciferínom viedla k uvoľneniu voľného D-luciferínu, čo má za následok emisia svetla z luciferázy exprimujúcej bunky. Meranie tejto bioluminescenčnej svetelnej emisie umožnilo kvantifikovať množstvo a druh začlenených

azido-cukrov, ktoré boli použité bunkami na biosyntézu sialovej kyseliny, ktorá je produkovaná mnohými rakovinotvornými bunkami [19].



Obrázok 7: „Staudinger ligation a jej aplikácia pre zobrazovanie extracelulárnych glykánov, A) Schéma reakcie „Staudinger ligation“, B) Použitie trifenylyfosfínového kliečkového luciferínu (TPPCL) na bioluminesnečné zobrazovanie azido cukrov na povrchu buniek [19].

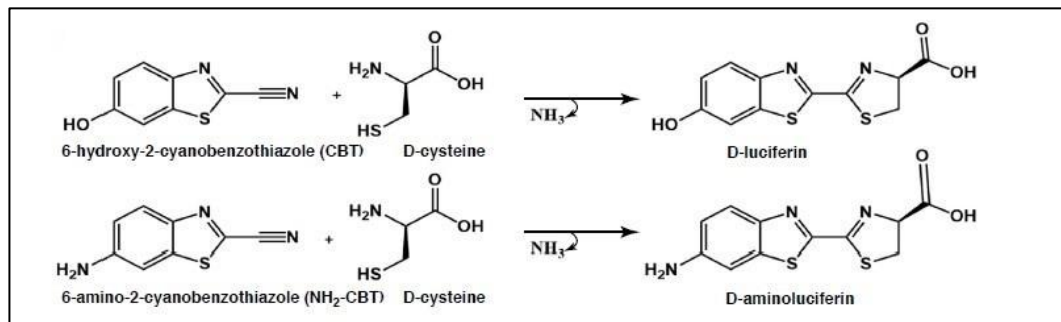
### 3.2. „Split Luciferin Reaction“

„Split Luciferin Reaction“ je kondenzácia medzi 6-hydroxy-2-kyanobenzotiazolom (CBT) a D-cysteínom, ktorej produktom je D-luciferín (obr. 8). Rovnaká reakcia prebieha aj v prípade s amino analógom CBT, 6-amino-2-kyanobenzotiazolom (H<sub>2</sub>N-CBT), produkujúca D-aminoluciferín. Z chemicko-biologického hľadiska sa táto reakcia najprv používala na označovanie proteínov s terminálnym cysteínom [20]. Neskôr bola aplikovaná na kontrolu zhromaždenia nanoštruktúr v bunkách a zobrazovanie kaspáz (kaspázy sú skupiny proteolytických enzýmov, ktoré obsahujú cysteín vo svojom aktívnom centre a účastnia sa apoptózy, čiže programovanej bunkovej smrti).

Reakcia má celkovo tri priebežné kroky:

1. nukleofilný atak merkapto skupiny cysteínu na kvartérnom uhlíku nitrilovej skupiny CBT
2. intramolekulárny nukleofilný atak na rovnakom uhlíku s amino skupinou (z cysteínu), čo vedie k formovaniu tiazolidínového kruhu

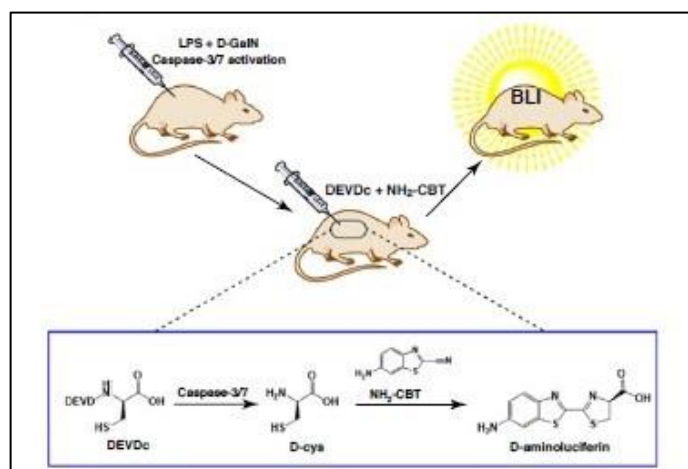
### 3. uvoľnenie amoniaku a tvorba luciferínu [21]



Obrázok 8: Reakčná schéma „Split Luciferin Reaction“ [21].

Prvá aplikácia bioluminescencie do živých organizmov prebehla už pred dvomi desaťročiami. Bolo to pomocou intraperitoneálnej injekcie CBT a D-cysteínu u luciferázo-exprimujúcich myší. Ihneď po aplikácii sa objavil bioluminescenčný signál a zostal na rovnakej úrovni 40-60 minút, pretože bol na mieste vytvorený D-luciferín. Na základe tohto objavu bola vyvinutá bioluminescenčná sonda na zobrazovanie aktivity kaspázy 3/7, čo je enzým podieľajúci sa na apoptóze [22].

Aminoskupina D-cysteínu je chránená pred selektívnym štiepením kaspázou 3/7 pentapeptidickou sekvenciou Asp-Glu-Val-Asp (DEVD). Pre reakciu sú rozhodujúce amino a tiolové skupiny, preto chránený D-cysteín nemôže byť dlho v reakcii s NH<sub>2</sub>-CBT. V prítomnosti aktívnej kaspázy 3/7 sa štiepi sekvencia DEVD, uvoľní sa voľný D-cysteín rýchlosťou závisiacej od aktivity kaspázy. Vzniká D-aminoluciferín vďaka vopred podanému NH<sub>2</sub>-CBT do buniek či živých myší (obrázok 9). Tvorba D-aminoluciferínu môže byť monitorovaná a kvantifikovaná meraním intenzity vyžiareného bioluminescenčného svetla tak ako z luciferázo-exprimujúcich buniek rovnako aj zo živých myší [22].



Obrázok 9: Zobrazenie celkovej aktivity kaspázy 3/7 s peptidom DEVDc a NH<sub>2</sub>-CBT u živých zvierat [22].

## 4. PREHĽAD BIOLUMINESCENČNÉHO ZOBRAZOVANIA REPORTÉROVÝCH MYŠÍ

Zobrazovanie pomocou bioluminescencie deteguje fotóny emitované z luciferázových enzýmov in vivo na lokalizáciu, detekciu a kvantifikáciu špecifických biologických procesov, ako sú napríklad vírusové replikácie, smerovanie imunitných buniek na miesta infekcie či nádorové bujnenie. Táto zobrazovacia technika je vysoko citlivá, čo umožňuje detekciu o hodnote  $1 \cdot 10^2$  pfu z luciferázo obsiahnutých vírusov in vivo [23]. Pfu je jednotka používajúca sa vo virológii, tzv. „plaque-forming unit“. Vyjadruje počet vírusových častíc schopných tvoriť plaky na jednotku objemu [24].

Bioluminescenčné zobrazovanie má niekoľko výhod v zobrazovacích štúdiách malých zvierat. Difúzia a rozptyl svetla v tkanivách limituje priestorové rozlíšenie na 2-3 mm. Svetlo z povrchových miest sa deteguje vo väčšom množstve než svetlo vyžarované z hlbších orgánov. Je to preto, že svetlo je na jeden centimeter tkaniva oslabené približne až desaťnásobne [25]. Zoslabenie svetla v tkanivách je tiež relatívne väčšie pri enzýmoch luciferázy, ktoré emitujú modré svetlo, ako sú napríklad bakteriálne luciferázy. Zatiaľ čo existujú metódy na vytváranie trojrozmerných obrazov, bioluminescenčné zobrazovanie je typicky dvojrozmerné [25,26].

Do dnešnej doby bolo uskutočnených množstvo štúdií bioluminescenčného zobrazovania s niekoľkými odlišnými luciferázovými enzýmami. Luciferáza svätajánskych mušiek je najčastejšie používaná na zobrazovacie štúdie in vivo, a to pre vytrvalú kinetiku svetelnej emisie, priaznivých farmakokinetických luciferínových substrátov a relatívne červený posun v emisnom spektre [27].

*Renilla reniformis* a *Gaussia princeps* sú luciferázy odlišujúce sa od svätajánskych mušiek tým, že používajú ako substrát koelenterazín. Ten má ale určité nevýhody pri zobrazovaní in vivo [28]. Oxidácia v sére produkuje svetlo, ďalej klesá biologická dostupnosť substrátu a to prispieva k zníženej detekcii „*Renilla* a *Gaussia*“ luciferáz in vivo v porovnaní s luciferázou a luciferínom svetlušiek. „*Renilla* a *Gaussia*“ luciferázy majú bleskovú kinetiku s rýchlym nástupom, čo si vyžaduje začať zobrazovanie rýchlo po vstreknutí substrátu. Modrozelené svetlo emitujúce týmito enzýmami tiež znižuje penetráciu skrz tkanivá [29].

Na rozdiel od rádio indikačnej zobrazujúcej techniky, ako je napríklad pozitronová emisná tomografia (PET) alebo jednofotónová emisná tomografia (SPECT), bioluminescenčné zobrazovanie nevyžaduje zobrazovacie sondy s krátkou životnosťou rádioizotopov, čím sa

bioluminescencia stáva prístupnejšou pre výskumníkov. Avšak, bioluminescenčné zobrazovanie môže byť kombinované s ďalšími zobrazovacími technikami, ako napríklad PET a MRI a to použitím fúzných reportérov. Vývoj transgénnych myší s multimodálnymi zobrazovacími reportérovými génmi značne zvyšuje hodnoty týchto myší na štúdium vírovej infekcie a ich následnú liečbu [30].

Reportérové myši používané na experimenty s bioluminescenčným zobrazovaním sú navrhnuté s promótorom vzbudzujúcim záujem o enzým luciferáza. V podstate všetky tieto myši používajú luciferázy svätotrojanských mušiek na zobrazovanie reportérového génu, sumarizovanie vlastností samotného enzýmu a substrátu luciferínu. Pretože tieto reportérové myši regulujú luciferázu v momente transkripcie, existuje tam meškanie medzi aktiváciou promótoru a expresie dostatočného množstva luciferáz na detekciu zobrazovaním. Podobne existuje aj oneskorenie medzi zastavením aktivity promótoru a stratou bioluminescenčného signálu, v závislosti relatívnej stability luciferázového reportéra [31,32].

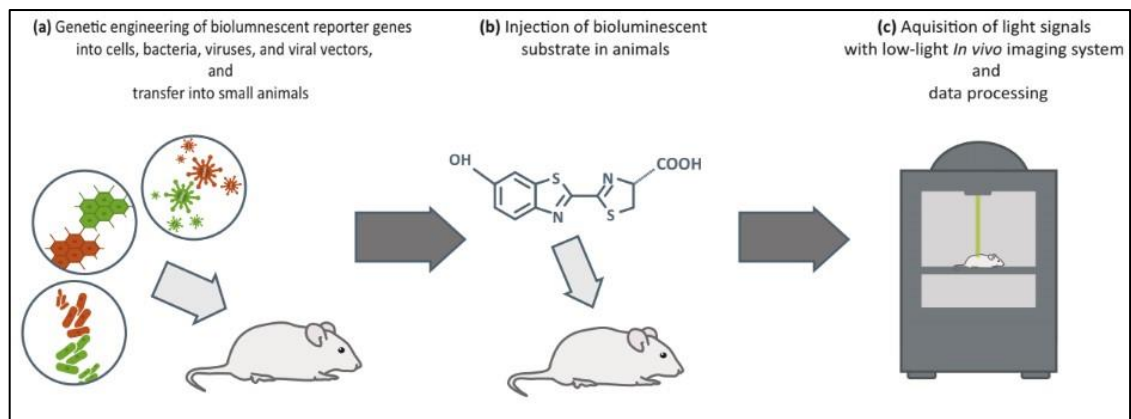
Trvalá expresia luciferázy svetlušiek za období aktivácie promótoru tiež zvyšuje množstvo prístupných enzýmov, ktoré zvyšujú citlivosť pre *in vivo* zobrazovanie. Kým bioluminescenčné zobrazovanie umožňuje citlivú detekciu v celých zvieratách, svetlo z enzýmov luciferázy nemôže byť detegovateľné mikroskopicky či prietokovou cytometriou. Toto obmedzenie je možné prekonať fúziou fluorescenčného proteínu na luciferázu, ako je napríklad GFP [31, 32].

Transgénne reportérové konštrukcie vrátane enzýmu luciferázy a fluorescenčného proteínu integrujú mikroskopické zobrazovanie, bunkovú analýzu a zobrazovacie techniky v celom zvierati. Za ďalšie potencionálne obmedzenia transgénnych myší sa považujú neúmyselné zmeny v expresii reportérových konštrukcií v rôznych orgánoch a tkanivách. Výskumníci stále skúšajú ukazovanie aktivácie reportérového génu na viacerých anatomických miestach. Expresia reportéra je stabilná počas niekoľkých generácií myší. Na dosiahnutie rovnomernejšej, stabilnej expresie transgénov u myší výskumníci používajú tzv. izolačnú sekvenciu (matricovú väzbu) na zníženie účinkov susedných génov alebo ciele transgénu na expresiu prítomnú v každom možnom mieste [33].

## 5. MOLEKULÁRNE ZOBRAZOVANIE BIOLUMINESCENCIE IN VIVO

In vivo zobrazovanie vyžaduje 3 kľúčové prvky:

1. Genetické inžinierstvo reportérového konštrukt založeného na géne pre luciferázu a jeho expresiu v baktériách, vírusoch, rastlinných alebo zvieracích bunkách či v celých zvieratách.
2. Podanie luciferínového substrátu transgénnym zvieratám alebo zvieratám, do ktorých boli subjekty exprimujúce luciferázu podané.
3. Získanie a spracovanie svetelných signálov používajúcich na zobrazovacie systémy s malým svetlom, ako je napr. CCD kamera (obrázok 10).



Obrázok 10: Ilustrácia techniky in vivo bioluminescenčného zobrazovania u malých zvierat [35].

Časť z dôvodov úspešnosti bioluminescencie je to, že jej metódy a protokoly pre in vivo zobrazovanie sú ľahko aplikovateľné a relatívne nízko nákladové. Skutočnou a najväčšou výhodou je však vynikajúca citlivosť a špecifickosť na molekulárnej úrovni a vysoký signál, čím sa myslí práve pozadie bioluminescenčnej reakcie, čo platí najmä pri použití luciferázy svätéhojánskej mušky s D-luciferínom [34-36].

Na rozdiel od fluorescenčného zobrazovania nie je na uskutočňovanie potrebný zdroj excitačného svetla. Svetelné signály generované luciferázo-luciferínovou reakciou sú všeobecne dané, a to je to čo robí mikroskopiu alebo mikroendoskopiu použitím bioluminescencie náročnejšou. Bioluminescencia ponúka priestorové rozlíšenie v milimetrovom rozsahu a hĺbkový limit je niekoľko centimetrov, v dôsledku absorpcie a rozptylu svetla v tkanivách. Hlavnými svetelnými absorbérmi v tkanivách sú hemoglobín a melanín. Fotóny o vlnovej dĺžke 600 nm sú všeobecne absorbované v menšom rozsahu. Optimálny je rozsah je 700-900 nm v blízkej infračervenej oblasti. V dôsledku toho je

vyžarujúca bioluminescencia vedená na červenej alebo blízkej infračervenej vlnovej dĺžke, a to vedie aj k spomínanej zvýšenej citlivosti tejto metódy [34-36].

### **5.1. Budúcnosť zobrazovania bioluminescencie in vivo**

Pre metodický vývoj potrebný na rozšírenie potenciálu bioluminescencie sú dôležité tieto body:

1. Vývoj nových bioluminescenčných reportérov s červeným alebo blízkym infračerveným spektrom a multifarebné mutantné reportéry.
2. Nové a zdokonalené metódy tvorby genómu a expresiu transgénu.
3. Nové bioluminescenčné substrátové analógy.
4. Kľúčové substráty na zobrazovanie enzýmovej aktivity a biologicky malých molekúl.
5. Optimálne in vivo zobrazovacie systémy a algoritmy na rekonštrukciu obrazu a následnú analýzu.

Spojenie týchto bodov značí následné pokroky v bioluminescencii. Medzi ne sa zaraďuje napríklad zvýšená citlivosť detektora v hlbokých tkanivách a v špecifických orgánoch, zobrazovanie multimolekulárnych udalostí, bunkových typov a malých molekúl, zobrazovanie v ďalších zvieracích modeloch alebo živých orgánoch. V neposlednom rade sa jedná o vylepšený detektor signálu pre emisiu blízku infračervenému žiareniu a vylepšené tomografické zobrazovanie [34-36].

## **6. BIOLUMINESCENCIA A RAKOVINA**

Vysoká komplexnosť rakoviny, interakcie medzi rakovintvornými bunkami s ich okolitými tkanivami a ich invázia skrz celým organizmom robí sledovanie nádorov veľmi špecifickým javom. Vďaka bioluminescencii sa posudzujú reakcie na bunkovej aj molekulárnej úrovni. To vedie k posudku malígnych transformácií, tumorového rastu, správania sa k implantovaným bunkám v hostiteľských živých organizmoch a v neposlednom rade k sledovaniu kmeňových alebo transformovaných dospelých buniek. Okrem tohto všetkého, táto pokroková technológia hrá veľmi dôležitú úlohu aj v identifikácii protinádorovej liečby a uľahčuje jej účinnosťou testovanie na pokusných zvieratách. Týmto sa narúša medzera medzi objavom preklinických liekov a klinickými testami [37, 38].

### **6.1. Zobrazovanie tumorgenézy a nádorovej terapie**

Ako reportér pre bunkovú proliferáciu a bunkovú smrť sa používa luciferáza, pretože jej expresia koreluje s počtom tumorov v bunke in vitro aj in vivo. Je kompatibilná s vysokovýkonným skrútingom [37, 38]. Najčastejšie sú nádorové bunky upravované na stabilnejšiu expresiu luciferázy ex vivo, a to pod kontrolou konštitutívne aktívneho, tkanivovo špecifického alebo génovo či procesovo špecifického promotora. Následne sú tieto bunky implantované do pokusného zvieracieho modelu a pomocou nich sa môže sledovať rast nádoru, metastázy či diferenciácia kmeňových buniek. Rast nádoru a odpoveď na liečbu v subkutánných (podkožných), intrakraniálnych (vnútrolebečných) a metastatických nádorových modeloch je možné monitorovať aj pomocou merania glukózovej aktivity v krvi [39, 40].

### **6.2. Zobrazovanie apoptózy, programovanej bunkovej smrti**

Apoptóza hrá hlavnú úlohu v embryogenéze, homeostáze a patogenéze. V rakovinových terapiách sú lieky indukujúce programovanú smrť veľmi žiadané. Apoptóza sa vykonáva za pomoci aktivácie kaspázy – cysteín aspartyl proteázy. Hlavný prístup k jej monitorovaniu má inaktívny luciferázový reportérový gén, ktorý sa zlučuje do sekvencie štiepenia kaspázy. Pri aktivácii kaspázy dochádza k štiepeniu tejto sekvencie a obnovuje sa funkcia luciferázy [41].

Zlúčený zelený fluorescenčný proteín (GFP) s glukózou, vrátane ich signálnej sekvencie, sa oddeľujú štiepiacim peptidom kaspázou 3/7 (DEVD). Pri aktivácii kaspázy sa DEVD štiepi, uvoľňuje sa glukóza, ktorá putuje do sekrečných ciest, kde je správne zložená a môže

byť bioluminescenčne zobrazená. Glukóza je produkovaná nádorovými bunkami do obehu, kde je taktiež detegovateľná v myšacej krvi ex vivo [41].

### **6.3. Zobrazovanie nádorovej hypoxie (nedostatku kyslíku v tkanivách)**

Kyslík je potrebný pre správny bunkový metabolizmus. Hypoxia, kyslíková deprivácia, sa vyskytuje v rakovine medzi patologickými stavmi ako je napr. mŕtvica, diabetes či infarkt myokardu. Počas monitorovania a charakterizácie sú indukované cytokíny a dochádza k transkripcii rôznych rastových faktorov. Jeden z hlavných transkripčných faktorov indukovaný nízkymi hladinami kyslíka je hypoxyindukčný faktor 1 (HIF1). Ten, na podporu transkripčnej aktivácie, je závislý na hypoxickej odozve (HRE). Reportérové vektory založené na prvkoch HRE riadiacich expresiu luciferázy, boli založené na pozdĺžne zobrazovanie hypoxie. Tieto reportéry poskytujú cenné informácie o základných molekulárnych cestách a môžu viesť k rozvoju terapií zameraných na HIF1 [42, 43].

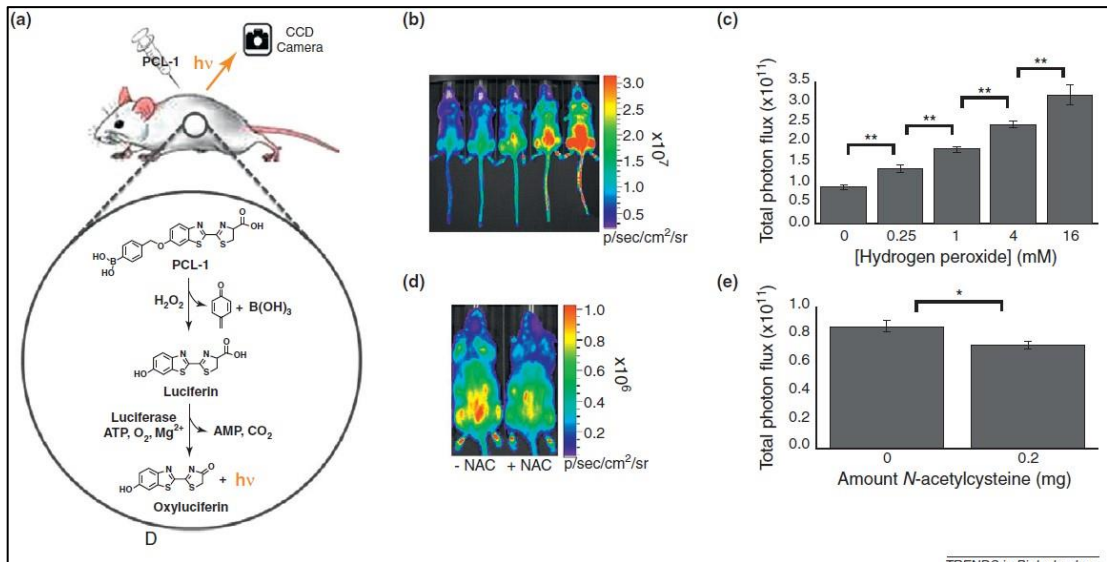
#### **6.3.1. Zobrazovanie produkcie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Vysoké hladiny H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vedúce k oxidačnému stresu a zápalu patria medzi kritické aspekty niekoľkých chronických ochorení vrátane rakoviny, diabetu a neurodegenerácie, kardiovaskulárnych a pľúcnych ochorení [44]. Van de Bittner a kol. vyvinuli bioluminescenčný senzor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nazývaný peroxy-klietkový luciferín-1, v skratke PCL-1 (obrázok 11A) [42].

Tento luciferín klietkový systém je porovnateľný s DEVD-luciferínovým reportérom apoptózy, ktorý je spomenutý vyššie. V tomto prípade je luciferín naviazaný na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> senzitívny aryl kyseliny boritej. Reakcia kyseliny s peroxidom vodíka uvoľňuje zachytený luciferín aby sa mohla spustiť reakcia luciferázy. Základné hladiny, kolísanie a inhibícia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s antioxidantami je kvantitatívne detegovaná v luciferázo vyjadrujúcej experimentálnej myši, do ktorej bol injekčne aplikovaný PCL-1 senzor a následne rôzne dávky H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (obrázok 11 B-E) [45].

Dávkovo závislý vzrast BLI je vyjadrený ako celkový tok fotónov, ktorý bol pozorovaný niekoľko minút po podaní injekcie s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (obrázok 11 D,E).

Injekcia antioxidantu N-acetylcysteínu (NAC) viedla k zníženiu BLI signálu, čo len potvrdilo špecifikáciu PCL-1 ako in vivo reportéra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [45].



Obrázok 11: Zobrazovanie produkcie peroxidu vodíka [45].

## 7. BIOLUMINESCENČNÉ ZOBRAZOVANIE NÁDOROV PRSNEJ ŽĽAZY NA BÁZE LUMINOLU

Luminol (5-amino-2,3-dihydroftalazín-1,4-dión) je známa chemiluminescenčná molekula, ktorá emituje svetlo počas oxidácie pri maximálnej vlnovej dĺžke 425 nm. Má široké využitie v rôznych klinických štúdiách na detekciu reakčných medziproduktov [46].

Pri maximálnej vlnovej dĺžke dochádza k poklesu luminescenčného signálu a prenikanie cez tkanivá sa odhaduje na 0,5 mm, čo odpovedá dĺžke tkanivovej dráhy, kde sa absorbuje 99% svetla približne cez 2,2 mm. Z toho vyplýva, že hĺbka prenikania biluminescencie na báze luminolu nie je vhodná na zobrazovanie hlboko zakorenených nádorov [47,48].

Existujú dve možnosti na zvýšenie bioluminescenčných signálov:

1. Prvá možnosť zahŕňa opatrenia na zvýšenie fotónového toku svetla vyžarovaného pri 425 nm [49]. Ide o použitie chemiluminescenčnej sondy L-012, substrát ktorý má potenciál generovať viac svetla ako luminol [50].
2. Druhá možnosť používa NIR-emitujúce nanočastice, ktoré sorbuje luminol na báze bioluminescencie pri vlnovej dĺžke 425 nm a reemituje ich ako NIR fotóny [49]. Zaujímavosťou je, že svetelná hĺbka v infračervenej oblasti je približne 10 krát väčšia ako v modrej oblasti viditeľného spektra. Nevýhodou tejto možnosti však je, že väčšina nanočastíc tohto typu je cytotoxických [51].

Polymorfonukleárne neutrofilý (PMN) sú cirkulujúce krvné leukocyty vo veľkých množstvách. Sú súčasťou vrodeneho imunitného systému a poskytujú prvú líniu obrany migráciou do napadnutých oblastí, ktoré vyžarujú chemické signály. Niektoré pevné nádory, ako je rakovina prsníkov tiež spôsobujú aktiváciu PMN a uvoľňovanie myeloperoxidázy [52].

Štúdia ukazuje, že myšiam boli transplantované bunky prsného nádoru a následne podaný luminol. To umožňuje detekciu myeloperoxidázovej aktivity a následne lokalizáciu nádoru. Luminol umožňuje detekciu aktivovaných PMN už dva dni po transplantácii rakovinotvorných buniek, aj keď nádory nemusia byť ešte hmatateľné. Luminol-bioluminescenčné žiarenie poskytuje možnosť detekcie pevných nádorov v skorých štádiách v predklinických nádorových modeloch [52].

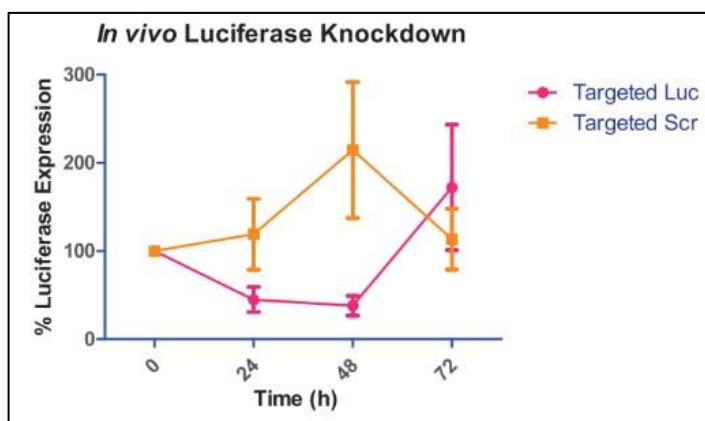
V BLI zobrazení bol na pozitívnu kontrolu ako substrát použitý D-luciferín citlivý na svetlo. Intraperitoneálne sa podala dávka 150mg/kg. Po 3 hod. boli myši intraperitoneálne injikované luminolom (injekčne im bol podaný luminol) v dávke 300 mg/kg. Trvanie detegovateľnej bioluminescencie, ktorá pochádza od luciferázy zo svetlušiek bola 30 min. [52].

## 8. BIOLUMINESCENČNÉ ZOBRAZOVANIE RAKOVINY VAJEČNÍKOV VO VNÚTRI MODELU

Rakovina vaječníkov patrí medzi jedno z najhorších a najnebezpečnejších gynekologických ochorení. Aj pri adekvátnej liečbe v súčasnej dobe podľahne tejto chorobe 65% žien. Hlavnou príčinou tohto vysokého čísla je diagnóza už v pokročilom štádiu ochorenia [53,54].

Po podaní injekcie do živého modelu s rakovinotvornými bunkami, je rast nádoru pozorovaný každé dva týždne. Zvieratá určené na štúdie bioluminescencie sú injikované čerstvo pripraveným roztokom o objeme 100 ml s obsahom 15 mg/ml D-luciferínu. Po desiatich minútach sa myši liečia 3% izofluránom, pokiaľ nie je dostatočne sedatívny. Udržiavací izoflurán sa používa počas zobrazovania, aby sa myši upokojili [55,56].

V nádore sú lokalizované tzv. siRNA. Ich úlohou je korelácia nádorovej depozície a účinnosti „knockdown“ proteínu. Zvierací model je založený na injekcii bunkovej línie exprimujúcu luciferázu, a tým má schopnosť merať expresiu luciferázy svätajánskej mušky in vivo. „Knockdown“ luciferázy sa analyzuje v priebehu 72 hodín po jednej aplikovanej injekcii obsahujúcej 35 mg siRNA (obrázok 12). Po 48 hodinách bunky obsahujúce luciferázu smerujúce siRNA ukazujú v priemere 62%-ný „knockdown“. Naopak premiešaná siRNA nič nevykazuje, meria sa vyše 100%-né zvýšenie luciferázového signálu, čo súvisí s rastom nádoru. Po 72 hodinách sa pozoruje nárast v pôvodne zrazenej génovej expresii a to signalizuje koniec prechodného „knockdownu“. Aktivita luciferázy sa ukazuje predovšetkým v primárnom nádore než v okolitých metastázach [57].



Obrázok 12: In vivo bioluminescenčné luciferázové „knockdown“. Zníženie luciferázy in vivo po injekcii luciferázovej siRNA (Luc) alebo premiešanej siRNA (SCR) obsahujúcej polymérne nanočastice značené genetický materiál [57].

## **9. BIOLUMINESCENČNÉ ZOBRAZOVANIE KORELUJÚCE S PROGRESIOU PLŮCNEHO NÁDORU NA MYŠACOM MODELE**

Určovanie a bioluminescenčné zobrazovanie ľudských pľúcnych rakovínovotvorných buniek v ortotopickom myšacom modeli poskytuje citlivý nástroj na monitorovanie tumorovej progresie u modelov nahých myši [58].

Bunky ľudského karcinómu pľúc sú transfektované génom luciferázy svätéhojanskej mušky a sú inokulované do pravých pľúc nahých myši. Po aplikácii injekcie sa na 6 deň pustí zobrazovanie, aby sa zaznamenal signál emitovaný z transplantovaných nádorov. Monitorovanie prebieha obvykle až dva mesiace. Priemerná intenzita bioluminescencie (fotóny/sekundy/mm) sa v priebehu tohto času logaritmicky zvyšuje. Intraperitoneálna injekcia D-luciferínu sa podáva v dávke 150 mg na 1 kilogram telesnej hmotnosti zvieratám, ktoré sú pod účinkom anestézie. Bioluminescenčný záznam pokračuje až do doby dosiahnutia maximálneho toku fotónov za jednu sekundu [58].

V duplicitných experimentoch sa u zvierat, ktorým bola podaná injekcia, sformovali z 90% ľudské rakovínovotvorné bunky pľúc. Priemerná intenzita bioluminescenčného signálu emitovaná práve z týchto buniek vzrástla. Myši s pozitívnou bioluminescenčnou signalizáciou mali potvrdené nádory mikroskopickou histologickou analýzou. Bioluminescenčná aktivita priamo korelovala s veľkosťou nádoru a to potvrdzuje, že táto metóda je spoľahlivá na detekciu a monitorovanie rastu ľudských buniek rakoviny pľúc v ortotopickom prostredí myších modelov [58].

Mikroskopická analýza nepreukázala žiadny rozdiel v morfológickom raste experimentálnych skupín. Všetky boli konzistentné s adenokarcinómom pľúc. V súčasnosti je rakovina pľúc jednou z troch hlavných príčin úmrtí na celom svete. Napriek veľkým pokrokom dôležitú úlohu zohráva čas, kedy je nádor diagnostikovaný a v akom je klinickom štádiu. Neustále sa vyvíjajú nové skriningové metódy a terapeutické stratégie. V posledných rokoch sa ortotopické modely dostávajú čoraz dopredu, pretože dokážu simulovať prirodzené prostredie rakovínovotvorných buniek nachádzajúcich sa u človeka a poskytujú tak presnejší nástroj na analýzu a vývoj nových technológií, ktoré zlepšujú stav pacienta a zväčšujú mieru prežitia. So zavedením bioluminescenčného zobrazovania rakoviny boli objavené aj nové spôsoby monitorovania rastu a migrácie rakovínovotvorných buniek [58].

## **10. VYUŽITIE BIOLUMINESCENČNÉHO ZOBRAZOVANIA PRI VÝSKUME GLIÓMU**

Glioblastóm je najviac rozšírený malígný nádor na mozgu s najhoršími prognózami. V poslednom desaťročí sa používanie technológie bioluminescenčného zobrazovania rapídne rozšírilo v otázke pochopenia ďalších mechanizmov, ktoré riadia vývoj a progres glioblastómu [59].

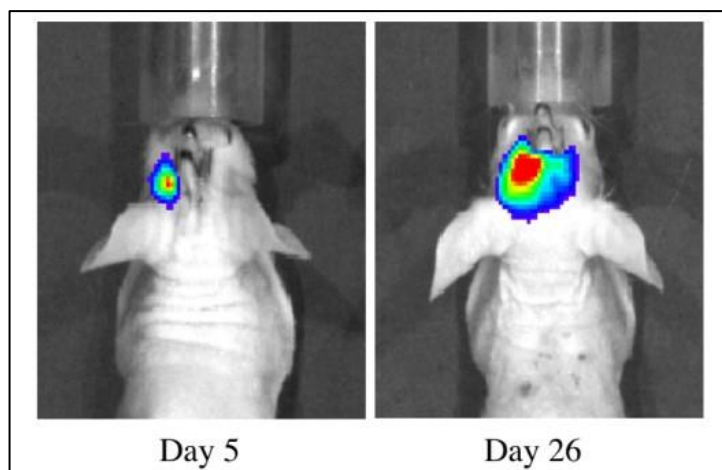
Bioluminescencia v tomto výskume je založená na detekcii a kvantifikácii svetelnej emisie generovanej z konverzie chemickej energie na energiu fotónov. Dochádza k tomu cez oxidáciu substrátu, primárne D-luciferínu, pomocou enzýmu luciferázy v živých bunkách a tkanivách. Bolo použitých niekoľko luciferázových génov klonovaných z rôznych organizmov, vrátane luciferázy svetlušiek. Tá je používaná najčastejšie [60, 61].

V súčasnosti sa bioluminescencia bežne používa na skúmanie potencionálnych mozgových nádorov rôzneho typu. Najväčší rozmach si našla v monitorovaní myšieho modelu s neurofibromatózou, to je syndróm, pri ktorom predisponovaní jedinci majú vyšší výskyt nádorov nervového systému [62].

### **10.1. Transgénne modely gliómových myší a BLI**

Použitie ľudských bunkových línií, ako model in vivo rekapitulujúci vlastnosti gliómu, je u pacientov kritizované kvôli ich nedostatku histologických a invazívnych fenotypov gliómu podobných. Vďaka tomu dostupnosť, zriadenie a rast primárnych nádorových buniek, ktoré napodobňujú glióm, sú u pacientov často problematické vlastnosti. Jediná metóda na zriadenie modelov gliómu, ktoré sa chovajú v podobných podmienkach ako v pacientovi, je vytvorenie geneticky modifikovaných alebo transgénnych hlodavcov, ktoré dokážu vyvíjať gliómové nádory. Niekoľko skupín navrhlo modely myší na špecifickú produkciu gliómu buď somatickou alebo modifikovanou zárodočnou líniou. Okrem toho, niektoré z týchto modelov boli začlenené do expresie luciferázy na zdokonalenie neinvazívnej detekcie gliómagenézy a hodnotenie účinnosti terapeutických interakcií [63].

Na obrázku 13 vidíme bunky stabilne transfekované luciferázou svätójánskej mušky, ktoré boli intrakraniálne injikované do modelu myší. Pozoroval sa piaty a dvadsiaty šiesty deň pôsobenia za pomoci bioluminescenčnej techniky. Aktivita luciferázy bola dosiahnutá injekčným podaním jej substrátu, D-luciferínu, intraperitoneálne, 150 mg/kg [64].



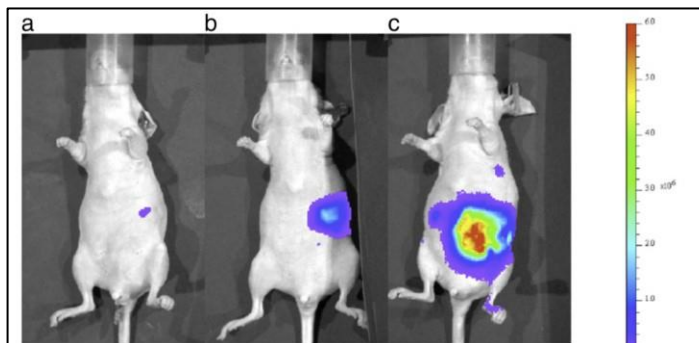
Obrázok 13: Bioluminescenčné zobrazovanie myšieho mozgu nesúceho ľudské nádorové bunky [64].

Pokusy o ďalšie pochopenie gliómov a identifikáciu biomarkerov na prežitie, nádorovú rezistenciu a identifikáciu si vyžaduje nové a účinnejšie terapeutické činidlá. Bioluminescencia predstavila jednoduchú, nákladovo efektívnu a dlhodobo neinvazívnu metodiku na posúdenie gliómagenézy a terapeutickú účinnosť. V súčasnosti sa používa na hodnotenie vývoja a progresie viacerých typov mozgových nádorov na zvieracích modeloch. Je to technológia sľubná do budúcnosti. Očakáva sa kladenie väčšieho dôrazu na túto technológiu, keďže sa stále vyvíja a sú očakávané nové zobrazovania založené na luciferáze. Stručne povedané, bioluminescencia je dôležitým nástrojom nie len pre kvantitatívny rast gliómu, ale aj pre účinnosť protinádorových činidiel [65].

## 11. BIOLUMINESCENČNÉ ZOBRAZOVANIE RASTU RAKOVINY PANKREASU

Rakovina pankreasu je jednou z najsmrteľnejších ľudských chorôb, a preto je aj jedným z najvhodnejších experimentálnych nádorových modelov na rozvoj inovačných terapeutických prístupov. Najúčinnšie neinvazívne zobrazovacie techniky, vhodné na monitorovanie rastu nádoru a tvorby metastáz spojené s rakovinou pankreasu, sú magnetická rezonancia (MRI) a bioluminescencia. BLI sa oproti MRI považuje za omnoho citlivejšiu metódu, a preto je možné, že malé nádorové hmoty nemusia byť detegovateľné pomocou MRI. Na druhej strane je zas BLI metóda viac náchylná k experimentálnej chybe, a to najpravdepodobnejšie v dôsledku zoslabenia fotónov [66].

Ľudské bunky rakoviny pankreasu boli injikované do pankreasu myšich samíc. Po inokulácii sa spustilo bioluminescenčné zobrazovanie u každej jednej myši. Išlo o tri časové body: jeden, dva až tri mesiace (obrázok 14). Boli študované dve skupiny myší. Prvej skupine s počtom trinástich myší bolo injikovaných  $5 \times 10^6$  buniek. Druhej skupine s počtom desať myší bolo podaných  $2 \times 10^6$  buniek. Každá myš podstúpila tri vyšetrenia. U štyroch sa vytvorili falošne negatívne výsledky [66].



Obrázok 14: BLI vo výskume rastu nádoru u myší počas troch mesiacov. Farebná čiara udáva fotónový tok vyjadrený ako počet fotónov/s/cm<sup>2</sup> [66].

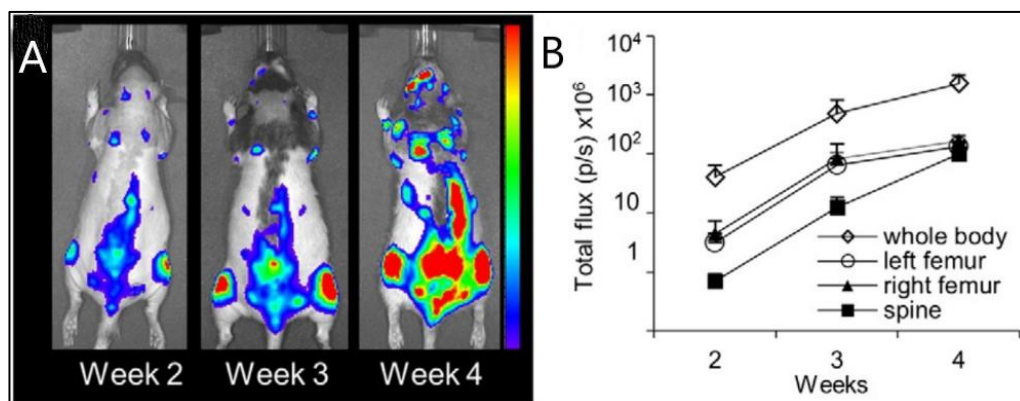
Boli uskutočnené experimenty poskytujúce informácie o perfúzii nádoru, ktoré preukázali, že nádorové tkanivá z prvej experimentálnej skupiny sú menej vaskularizované než u tej druhej. Ďalej sa tiež našli rozdiely medzi externými a internými oblasťami daného nádoru. Vonkajšia oblasť bola viac vaskularizovaná ako vnútorná [66].

BLI zobrazovanie rakoviny pankreasu sa používa súčasne s technikou MRI. Sú to komplementárne techniky na in vivo zobrazovanie a obe sa zameriavajú na kľúčové momenty vývoju nádoru. Ich kombinácia je nevyhnutná pri vývoji a experimentálnom testovaní účinnosti nových terapeutických látok [66].

## 12. BIOLUMINESCENČNÉ ZOBRAZOVANIE VÝVOJA KOSTNÝCH METASTÁZ Z KARCINÓMU PRSNÍKA

Jeden z najčastejších prípadov rakoviny u žien je práve karcinóm prsníka. Taktiež sa radí medzi druhú najčastejšiu príčinu úmrtia na rakovinu. Má vlastnosť metastázovať do kostí, mozgu, pľúc alebo pečene. Komplikácie spojené s kostnými metastázami zahŕňajú bolesť, hyperkalcémiu a patologickú fraktúru vedúcu k zlej prognóze [67].

V tomto BLI zobrazovaní bol použitý model kostnej metastázy u nahých potkanov, ktorý bol vytvorený pomocou intrakardiálnej injekcie obsahujúcej bunky ľudského karcinómu prsníka. Bioluminescenčné snímky boli získané počas 3-minútovej expozičnej doby, ktorá nastala 15 minút po aplikovaní intraperitoneálnej injekcie so substrátom, D-luciferínom. Na obrázku 15B je vidieť, že pri týždennom sledovaní sa bioluminescenčný fotónový tok exponenciálne zvyšoval [67].



Obrázok 15: BLI zobrazovanie kostných metastáz z karcinómu prsníka in vivo [67].

V priebehu piatich týždňov boli u troch potkanov identifikované viacnásobné kostné metastázy do chrbtice, panvy a končatín. Dvaja z troch potkanov s metastázami boli usmrtení po 4 týždňoch skenovania a tretí po 5. týždni v dôsledku akútneho poškodenia. Priemerná telesná hmotnosť potkanov s metastázami vo 4. týždni bola 82% z celkovej hmotnosti potkanov bez metastáz. Aktivita luciferázy z femuru, panvy a chrbtice bola spozorovaná na začiatku 2. týždňa a do 4. týždňa sa intenzívne zvyšovala. Na obrázku 15 vidíme na oboch zadných nohách a chrbtici exponenciálny nárast intenzity fotónového toku z metastáz. Z tohto vyplýva, že u tohto typu rakoviny je možná včasná detekcia metastáz, následné monitorovanie nádorovej nekrózy a tým pádom včasné zahájenie therapeutickej liečby [67].

## ZÁVER

Bioluminescencia označuje proces viditeľného vyžarovania svetla v živých organizmoch. Bioluminescenčné zobrazovanie je výkonná technika, ktorá postupuje neustále vpred. Vyvinula sa v poslednom desaťročí ako nástroj pre molekulárne zobrazovanie prebiehajúcich biologických procesov in vivo, v malých laboratórnych zvieratách. Najčastejšie sa jedná o myši alebo potkany. Táto forma optického zobrazovania je lacná a neinvazívna. Používa sa na analýzu chorobných procesov v reálnom čase a na molekulárnej úrovni v živých organizmoch. Umožňuje monitorovanie počas celého priebehu ochorenia, čo umožňuje kvantifikovať a detegovať biologické procesy bez zabitia pokusného zvierat'a.

V tejto práci som sa zamerala na využitie bioluminescencie v nádorovej diagnostike. Jednotlivé štúdie ukázali, že táto oblasť si vo výskume rakoviny našla svoje široké uplatnenie. Určenie polohy, kvantity nádorov a sledovanie nádorových buniek exprimujúcich luciferázu je silnou metodikou na sledovanie a pochopenie patogenézy metastáz in vivo.

V prvej časti práce som zhrnula všeobecné informácie o bioluminescencii, o organizmoch schopných bioluminescencie, vývoj bioluminescenčných sond a následný princíp bioluminescenčného zobrazovania. V druhej časti sú opísané najčastejšie typy nádorových ochorení vyskytujúcich sa u ľudí, ako je rakovina vaječníkov, prsných žliaz či celková rakovina prsníka u žien metastázujúca do kostí, rakovina pľúc, glióm a rakovina pankreasu.

Molekulárne zobrazovacie techniky predstavujú v dnešnej dobe revolučný pokrok. Ide o spojenie molekulárnej a bunkovej biológie a zobrazovacej technológie, so schopnosťou sledovať svetlo emitujúce bunky v malých laboratórnych zvieratách. Týmto sa otvorili široké možnosti aplikácie bioluminescencie v medicínalnej diagnostike. Vývoj však ide neustále dopredu, keďže v dnešnej dobe sa stále rieši otázka ako a či vôbec bude niekedy možné aplikovať túto zobrazovaciu metódu priamo u chorého človeka.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] Haddock, S.H.D., Moline, M.A., and Case, J.F. 2010. Bioluminescence in the Sea. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 2, 443–493.
- [2] Harvey, E. Newton 1952. *Bioluminescence*. New York: Academic Press.
- [3] Campbell, A. K. 1988. *Chemiluminescence: principles and applications in biology and medicine*.
- [4] Harvey, E.N. 1957. *History of Luminescence*. (American Philosophical Society, Philadelphia).
- [5] <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/luciferase-reporters.html> (dňa 30.5.2019)
- [6] Herring, P.J. 1983. The spectral characteristics of luminous marine organisms. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 220, 183-217.
- [7] Cormier, Milton J.; Lee, John; and Wampler, John E. 1975. "Bioluminescence: Recent Advances." *Annual Review of Biochemistry* 44, 255–272.
- [8] Wilson, Thérèse, and Hastings, J. Woodland 1998. "Bioluminescence." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14, 197–230.
- [9] <http://www.chemistryexplained.com/Ar-Bo/Bioluminescence.html> (dňa 1.6.2019)
- [10] <https://blogs.unbc.ca/biol202/2015/05/01/fireflies-bioluminescence/> (dňa 1.6.2019)
- [11] McElroy, William D., and Seliger, Howard H. 1962. "Biological Luminescence: A Remarkable Variety of Organisms from Bacteria to Fishes Shine by Their Own Light." *Scientific American* 207(6), 76–91.
- [12] Meighen, Edward A. 1991. "Molecular Biology of Bacterial Bioluminescence." *Microbiological Reviews* 55, 123–142.

- [13] Eveline Brodl, Andreas Winkler, Peter Macheroux 2018. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16, 551-564.
- [14] Haddock, Steven H. D.; Rivers, Trevor J.; and Robinson, Bruce H. 2001. "Can Coelenterates Make Coelenterazine? Dietary Requirement for Luciferin in Cnidarian Bioluminescence." *Proceedings National Academy Science* 98, 11,148–151.
- [15] Thomson, Catherine M.; Herring, P. J.; and Campbell, A. K. 1997. "The Widespread Occurrence and Tissue Distribution of the Imidazolopyrazine Luciferins." *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 12, 87–91.
- [16] Christian E. Badr, Bakhos A. Tannous 2011. Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends in Biotechnology*, Vol. 29, No. 12.
- [17] <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/reporter-gene-assays.html> (dňa 4.6.2019)
- [18] Mezzanotte, L. et al. 2017. In vivo molecular bioluminescence imaging: new tools and applications. *Trends Biotechnol.* 35, 640–652.
- [19] Saxon, E. and Bertozzi, C.R. 2000. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* 287, 2007–2010.
- [20] Ren, H.J. et al. 2009. A biocompatible condensation reaction for the labeling of terminal cysteine residues on proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 9658–9662.
- [21] Godinat, A. et al. 2013. A biocompatible in vivo ligation reaction and its application for noninvasive bioluminescent imaging of protease activity in living mice. *ACS Chem. Biol.* 8, 987–999.
- [22] Van De Bittner, G.C. et al. 2013. Strategy for dualanalyte luciferin imaging: in vivo bioluminescence detection of hydrogen peroxide and caspase activity in a murine model of acute inflammation. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 1783–1795.
- [23] Luker, G., Bardill, J., Prior, J., Pica, C., Piwnicka-Worms, D., Leib, D., 2002. Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice. *J. Virol.* 76, 12149–12161.

- [24] <http://encyclopedia.thefreedictionary.com/Plaque+Forming+Unit> (dňa 21.6.2019)
- [25] Contag, C., Bachmann, M., 2002. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 4, 235–260.
- [26] Hutchens, M., Luker, G.D., 2007. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell. Microbiol.* 9, 2315–2322.
- [27] Berger, F., Paulmurugan, R., Bhaumik, S., Gambhir, S., 2008. Uptake kinetics and biodistribution of <sup>14</sup>C-D-luciferin—a radiolabeled substrate for the firefly luciferase catalyzed bioluminescence reaction: impact on bioluminescence based reporter gene imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35, 2275–2285.
- [28] Pichler, A., Prior, J., Piwnica-Worms, D., 2004. Imaging reversal of multidrug resistance in living mice with bioluminescence: MDR1 P-glycoprotein transports coelenterazine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 1702–1707.
- [29] Loening, A., Wu, A., Gambhir, S., 2007. Red-shifted *Renilla reniformis* luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat. Methods* 4, 641–643.
- [30] Maggi, A., Ciana, P., 2005. Reporter mice and drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 249–255.
- [31] Wang, Y., Yu, Y., Shabahang, S., Wang, G., Szalay, A., 2002. *Renilla* luciferase-*Aequorea* GFP (Ruc-GFP) fusion protein, a novel dual reporter for real-time imaging of gene expression in cell cultures and in live animals. *Mol. Genet. Genomics* 268, 160–168.
- [32] Wilson, K., Yu, J., Lee, A., Wu, J., 2008. In vitro and in vivo bioluminescence reporter gene imaging of human embryonic stem cells. 740.
- [33] McKnight, R., Shamay, A., Sankaran, L., Wall, R., Hennighausen, L., 1992. Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6943–6947.
- [34] Ozawa, T. et al. 2013. Advances in fluorescence and bioluminescence imaging. *Anal. Chem.* 85, 590–609.

- [35] Dothager, R.S. et al. 2009. Advances in bioluminescence imaging of live animal models. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 45–53.
- [36] Contag, C.H. and Bachmann, M.H. 2002. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4, 235–260.
- [37] Badr, C.E. et al. 2011. Functional drug screening assay reveals potential glioma therapeutics. *Assay Drug Dev. Technol.* 9, 281–289.
- [38] Feng, Y. et al. 2009. Multi-parameter phenotypic profiling: using cellular effects to characterize small-molecule compounds. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 567–578.
- [39] Prasad, G. et al. 2011. Inhibition of PI3K/mTOR pathways in glioblastoma and implications for combination therapy with temozolomide. *Neuro Oncol.* 13, 384–392.
- [40] Sloan, E.K. et al. 2010. The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Res.* 70, 7042–7052.
- [41] Niers, J.M. et al. 2011. Multimodal in vivo imaging and blood monitoring of intrinsic and extrinsic apoptosis. *Mol. Ther.* 19, 1090–1096.
- [42] Semenza, G.L. et al. 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 30 to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5680–5684.
- [43] Lehmann, S. et al. 2009. Longitudinal and multimodal in vivo imaging of tumor hypoxia and its downstream molecular events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14004–14009.
- [44] Reuter, S. et al. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603–1616.
- [45] Van de Bittner, G.C. et al. 2010. In vivo imaging of hydrogen peroxide production in a murine tumor model with a chemoselective bioluminescent reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 21316–21321.

- [46] S. Gross, S.T. Gammon, B.L. Moss, D. Rauch, J. Harding, J.W. Heinecke, L. Ratner, D. Piwnica-Worms 2009. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo, *Nat. Med.* 15, 455–461.
- [47] T.B. Shrestha, G.M. Seo, M.T. Basel, M. Kalita, H. Wang, D. Villanueva, M. Pyle, S. Balivada, R.S. Rachakatla, H. Shinogle, P.S. Thapa, D. Moore, D.L. Troyer, S.H. Bossmann 2012. Stem cell-based photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 1251–1258.
- [48] N. Zhang, K.P. Francis, A. Prakash, D. Ansaldi 2013. Enhanced detection of myeloperoxidase activity in deep tissues through luminescent excitation of near-infrared nanoparticles, *Nat. Med.* 19, 500–505.
- [49] R. Maeztu, G. Tardajos, G. Gonzalez-Gaitano 2010. Natural cyclodextrins as efficient boosters of the chemiluminescence of luminol and isoluminol: exploration of potential applications, *J. Phys. Chem. B* 114, 2798–2806.
- [50] S. Yamaguchi, N. Kishikawa, K. Ohyama, Y. Ohba, M. Kohno, T. Masuda, A. Takadate, K. Nakashima, N. Kuroda 2010. Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species, *Anal. Chim. Acta* 665, 74–78.
- [51] M. Mahmoudi, K. Azadmanesh, M.A. Shokrgozar, W.S. Journey, S. Laurent 2011. Effect of nanoparticles on the cell life cycle, *Chem. Rev.* 111, 3407–3432.
- [52] H.S. Alshetaiwi et al. 2013. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 127, 223–228.
- [53] C. Landen, M. Birrer, A. Sood 2008. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26.
- [54] R.E. Scully 1995. Pathology of ovarian cancer precursors, *J. Cell. Biochem.* 23.
- [55] B.C. Vanderhyden, T.J. Shaw, J. Ethier 2003. Animal models of ovarian cancer, *Reproductive biology and endocrinology, RB&E* 1, 67.
- [56] M.Y. Fong, S.S. Kakar 2009. Ovarian cancer mouse models: a summary of current models and their limitations, *J. Ovarian Res.* 2 (1), 12.

- [57] S.K. Jones, V. Lizzio, O.M. Merkel 2016. Folate receptor targeted delivery of siRNA and paclitaxel to ovarian cancer cells via folate conjugated triblock copolymer to overcome TLR4 driven chemotherapy resistance, *Biomacromolecules* 17, 76-87.
- [58] R. A. Madero. Visbal et al. 2012. Bioluminescence imaging correlates with tumor progression in an orthotopic mouse model of lung cancer. *Surgical Oncology* 21, 23-29.
- [59] Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, et al. 2012. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev* 26, 756–84.
- [60] Dinca EB, Voicu RV, Ciurea AV. 2010. Bioluminescence imaging of invasive intracranial xenografts: implications for translational research and targeted therapeutics of brain tumors. *Neurosurg Rev* 33, 385–94.
- [61] Edinger M, Cao YA, Horning YS, et al. 2002. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer* 38, 2128–36.
- [62] Hawes JJ, Reilly KM. 2010. Bioluminescent approaches for measuring tumor growth in a mouse model of neurofibromatosis. *Toxicol Pathol* 38, 123–30.
- [63] de Vries NA, Beijnen JH, van Tellingen O. 2009. High-grade glioma mouse models and their applicability for preclinical testing. *Cancer Treat Rev* 35, 714–23.
- [64] Maguire CA, Bovenberg MS, Crommentujin MH, et al. 2013. Triple bioluminescence imaging for in vivo monitoring of cellular processes. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, 99.
- [65] Rodney B. Luwor, Stanley S. Stylli, Andrew H. Kaye 2015. Using bioluminescence imaging in glioma research. *Journal of Clinical Neuroscience* 22, 779-784.
- [66] Rossana Ritelli, Raphael Ngalani Ngaleu, Pietro Bontempi, et al. 2015. Pancreatic cancer growth using magnetic resonance and bioluminescence imaging. *Magnetic Resonance Imaging* 33, 592-599.
- [67] Won Jun Kang, Eun Hye Song, Jun Young Park, et al. 2015. <sup>18</sup>F-fluoride PET imaging in a nude rat model of bone metastasis from breast cancer: Comparison with <sup>18</sup>F-FDG and bioluminescence imaging. *Nuclear Medicine and Biology* 42, 728-733.