



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

**Porovnání fluorescenčních spekter zdravých
a nádorových buněčných kultur**

**Comparison of fluorescence spektra of
healthy and carcinoma cell cultures**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Autor diplomové práce: Bc. Ratanak Sio
Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Marie Pospíšilová, CSc.

Kladno 2018

Katedra přírodovědných oborů

Akademický rok: 2017/2018

Z a d á n í d i p l o m o v é p r á c e

Student: **Ratanak Sio**
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu
Téma: **Porovnání fluorescenčních spekter zdravých a nádorových buněčných kultur**
Téma anglicky: Comparison of fluorescence spectra of healthy and carcinoma cell cultures

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

Na základě výsledků projektu „Analýza emisních spekter bio-fluoroforů“ (Bc. Ratanak Sio) proveďte měření fluorescenčních spekter zdravých a nádorových buněk při excitační vlnové délce NADH 340nm a 365nm.

- 1) Pomocí SW GASPED vytipujte rozdíly v emisních spektrech obou buněčných preparátů získaných při definovaných metabolických podmínkách (oxidační a redukční prostředí, pH a glukóza) a porovnejte velikost maxima při vlnové délce 460nm (maximum emise NADH) pro obě kultury a dané metabolické podmínky.
- 2) Na základě výsledků bodu 1) proveďte diskusi možných diferencí obou spekter a jejich příčiny.
- 3) Výsledky měření aplikujte na analýzu fluorescenčního spektra buněčné kultury nádorové tkáně při fotodynamické terapii využívající Protoporfyrin IX a ozáření 405nm.

Seznam odborné literatury:

- [1] Čepa M., Měření fluorescence NADH na buněčných kulturách při fotodynamické terapii, 2014, Diplomová práce
- [2] LAKOWICZ, Joseph R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, ed. 3rd, Berlin / Heidelberg: Springer, 2006, 954 s., ISBN 978-0387312781
- [3] Avraham Mayevsky, Mitochondrial function In Vivo Evaluated by NADH Fluorescence, ed. 1, Springer International Publishing AG Switzerland, 2015, DOI: 10.1007/978-3-319-16682-7, ISBN 978-3-319-16681-0

Vedoucí: doc. Ing. Marie Pospíšilová, CSc.
Konzultant: prof. MUDr. Pavel Kučera, Ph.D.

Zadání platné do: 20.08.2019

.....
vedoucí katedry / pracoviště

.....
děkan

V Kladně dne 02.10.2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Porovnání fluorescenčních spekter zdravých a nádorových buněčných kultur“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne

.....

Bc. Ratanak Sio

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat všem učitelům za podporu při psaní mé diplomové práce. Hlavní poděkování patří paní docence Pospíšilové za její citlivý a podnětný způsob vedení mé diplomové práce, a Mgr. Janě Turňové za její ochotu a cenný čas při řešení všech problémů souvisejících s kultivací buněčné linie a dalších prací s tím související. Prof. Kučerovi za cenné rady a doporučení během experimentů v diplomové práci.

ABSTRAKT

Biofluorescence je emise světla v UV, VIS a blízké IČ ve které emitují biologické materiály (buňky) při excitaci vhodnou vlnovou délkou. Přítomnost a vzájemné vazby biofluoroforů v živých organismech ovlivňují jejich emisní spektra a jsou tedy možným nástrojem ke studiu biologických materiálů. Mezi biofluorofory, obsaženém v buňce, patří NADH, který je důležitým prvkem v metabolismu buňky při tvorbě ATP. Proto byl vybrán jako indikátor pro porovnání spekter zdravé a nádorové buněčné kultury.

V práci jsou porovnána emisní spektra zdravých 3T3 a nádorových CT26 buněk stejného typu. Excitační vlnové délky 260nm, 340nm a 365nm, shodné s absorpčními maximy NADH, byly použity pro experimenty.

Buněčné kultury byly kultivovány standardně v DMEM (M.I. a M.II.) a pro měření připraveny jako suspenze v PBS s pH7 s definovanými koncentracemi 1,25E4 a 5E4 buněk/ml. Emisní spektra byla měřena na spektrofluorometr Fluoromax-4 v spektrálním rozsahu 380nm až 600nm. Naměřená spektra byla zpracována programem GASpeD, který umožnil rozložit spektrum na jednotlivé příspěvky od biofluoroforů obsažených v buňce v oblasti maximální emise NADH na 460 nm.

Cílem práce bylo porovnat emisní spektra zdravých a nádorových buněk a tyto rozdíly využít k diagnostickým metodám.

Výsledky porovnání spekter ukazují, že rozdíly jsou v intenzitě fluorescence a v některých případech i v posunu maxim u sledovaných vlnových délek. Na metabolické úrovni byl pozorován větší nárůst intenzity fluorescence v oblasti kolem 460nm u nádorových, než u zdravých buněk, což je v souladu s literaturou. Je uvedena závislost intenzity fluorescence na vlnové délce 460 nm naměřené a určené pomocí GASpeD, na době ozařování vzorku CT26 s PpIX excitovaném na 350 nm. Závislost určená na základě GASpeD má odpovídající klesající tendenci, což odpovídá očekávání.

Klíčová slova

Fluorescence NADH, Fluorescence PpIX, Fotodynamická terapie, Nádorové buňky, Zdravé buňky

ABSTRACT

Biofluorescence is the emission of light in UV, VIS, and near IR emitted by biological materials (cells) at a suitable excitation wavelength. The presence and interrelation of biofluorophores in living organisms influences their emission spectra and is therefore a possible tool for the study of biological materials. Among the biofluorophores contained in the cell are NADH, which is an important element in cell metabolism in ATP production. Therefore, it was chosen as an indicator for the comparison of the spectrum of healthy and tumor cell culture.

In this work the emission spectra of healthy 3T3 and tumor CT26 cells of the same type (fibroblasts) are compared. Excitation wavelengths of 260nm, 340nm and 365nm, identical to the NADH absorption maxima, were used for experiments.

Cell lines were cultivated as standard in DMEM (M.I. and M.II.) and prepared as a suspension in PBS with pH7 at defined concentrations of $1.25E4$ and $5E4$ cells/ml. Emission spectra were measured on spectrofluorometer Fluoromax-4 in a spectral range of 380nm to 600nm. The measured spectra were processed by the GASpeD program, which allowed the spectrum to be decomposed to individual contributions from the biofluorophores contained in the cell in the area of NADH emission maximum 460nm.

The aim of this work was to compare the emission spectra of healthy and tumor cells and use these differences for diagnostic methods.

The results of the comparison spectra show that the differences are the fluorescence intensity and in some cases also the shift of emission maxima at the specific wavelengths. At the metabolic level, a greater increase in fluorescence intensity was observed in the area of wavelength around 460nm in the tumor than in healthy cells, which is consistent with the literature. The time dependence of fluorescence intensity at the wavelength of 460 nm of the carcinoma cells CT26, after applying PpIX and irradiated, at the excitation wavelength of 350 nm was shown from the measured data and the decomposition of GASpeD. Time dependence determined by GASpeD has shown the declining tendency, which corresponds to expectations.

Keywords

Fluorescence NADH, Fluorescence PpIX, Photodynamic Therapy, Carcinoma cell, Normal cell

Obsah

SEZNAM A ZKRATEK	9
SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK	13
1 ÚVOD.....	14
2 DÝCHACÍ ŘETĚZEC BUŇKY.....	17
2.1 DEFINICE A VÝZNAM DÝCHACÍHO ŘETĚZCE	17
2.2 PROCESY BUNĚČNÉHO ŘETĚZCE	19
3 FLUORESCENCE	21
3.1 JABLONSKI DIAGRAM	21
3.2 CHARAKTERISTIKA FLUORESCENČNÍHO SPEKTRA	22
3.2.1 Stokesův posun	22
3.2.2 Nezávislost emisního spektra na excitační vlnové délce	22
3.2.3 Doba života a kvantový výtěžek.....	23
3.2.4 Fluorescenční zhášení	24
3.3 FLUOROFORY	24
3.3.1 Fluorescence kofaktorů.....	25
3.3.2 Význam NADH	26
3.3.3 Fluorescence NADH.....	27
4 MATERIÁLY A METODY PRO MĚŘENÍ EMISNÍHO SPEKTRA BUNĚČNÝCH KULTUR	29
4.1 MATERIÁLY A PŘÍPRAVA VZORKŮ	29
4.1.1 Buněčné linie používané při experimentech.....	29
4.1.2 Kultivační procesy	31
4.1.3 Příprava buněčné suspenze	31
4.2 METODY POUŽÍVANÉ PŘI MĚŘENÍ	32
4.2.1 Spektrometr Fluormax -4.....	32
4.2.2 Software GASpeD.....	34
4.2.3 Burkerová komůrka	34
5 VÝSLEDKY.....	36
5.1 MĚŘENÍ FLUORESCENCE ČISTÉHO NADH	36
5.1.1 Vliv excitační vlnové délce na fluorescence NADH.....	36
5.1.2 Vliv vlnových délkách na fluorescence roztoků různých biofluoroforů	37
5.1.3 Vliv pH na fluorescence NADH	38
5.2 MĚŘENÍ FLUORESCENCE BUNĚČNÝCH KULTUR	39
5.2.1 1. měření.....	40
5.2.2 2.měření.....	41
5.2.3 3.měření.....	43
5.2.4 4.měření.....	46
5.2.5 5.měření.....	49
5.3 APLIKACE NA ANALÝZU FLUORESCENČNÍHO SPEKTRA PŘI PDT	53
6 DISKUSE A SHRUTÍ	55
7 ZÁVĚR	57
SEZNAM LITERATURY	58

Seznam a zkratek

PDT	Photodynamic Therapy
PpIX	Protoporphyrin IX
NAD ⁺	Oxidovaný Nikotinamid Adenin Dinukleotid
NADH	Redukovaný Nikotinamid Adenin Dinukleotid
ATP	Adenosin TriPhosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	Phosphate Buffer Saline
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH ₂	Riboflavinadenosindifosfat

Seznam obrázků

Obrázek 1: 1.Riboflavin, FAD, FMD, 2.NADH, 3.Pyridoxine, Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-fosfat, 4.Tryptofan, 5.Tyrosin, 6.Fenylalanin.....	14
Obrázek 2: Procesy probíhající v mitochondrii, které přispívají při patogenezi nádoru [9].....	15
Obrázek 3: Schéma dýchacího řetězce	17
.....	18
Obrázek 4: Nikotin-amidadenin-dinukleotid-fosfát v oxidované (nalevo) a redukované podobě (napravo) [18].....	18
Obrázek 5: Flavinadenindinukleotid v oxidované (nalevo) a redukované podobě (napravo) [18]	18
Obrázek 6: Schéma procesů buněčného dýchání.....	20
Obrázek 7: Jablonského diagram [17]	21
Obrázek 8: Absorpční a emisní spektrum Rhodaminu[10]	22
Obrázek 9: Biofluorofory[17].....	26
Obrázek 11: Mikroskopický snímek buněk linie BAL/3T3. Zvětšeno 400x [30]...	30
Obrázek 12: Mikroskopický snímek buněk linie CT26.WT. Zvětšeno 400x [30] ..	30
Obrázek 13: Fluorescenční spektrometr Horiba Fluoromax-4 [39].....	32
Obrázek 14: Schéma vnitřního uspořádání fluorescenčního spektrometru Horiba Fluormax-4 1. Xenonová lampa 1a. Zdroje energie lampy 2. Excitační monochromátor 3. Komora pro naměřený vzorek 4. Emisní monochromátor 5. Detektor signálu 6. Referenční detektor [39]	33
Obrázek 15: Burkerova komorka [42].....	35
Obrázek 16a: Emisní spektrum NADH při excitační vlnové délce 340 nm, 350 nm a 365 nm	36
Obrázek 16b: Šířka absorpčního pásu NADH.....	37
Obrázek 17: Emisní spektrum roztoku (NADH, Pyridoxin a Tryptofan) při excitační vlnové délce 365 nm	37
Obrázek 18a: Emisní spektrum NADH při excitační vlnové délce 365 nm v roztoku s pH 6, 7 a 8	38
Obrázek 18b: Emisní spektrum Pyridoxinu při excitační vlnové délce 365 nm v roztoku s pH 5, 6, 7 a 8	38

Obrázek 18c: Emisní spektrum Tryptofanu při excitační vlnové délce 365 nm v roztoku s pH 5, 6, 7 a 8	39
Obrázek 19a: Emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3	40
Obrázek 19b: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3	40
Obrázek 19c: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3	41
Obrázek 20a: Naměřená a normalizovaná emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3	42
Obrázek 20b: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3	42
Obrázek 20c: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3	42
Obrázek 20d: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 ve dne 1.3 a 15.3.2018.....	43
Obrázek 21a: Emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3	44
Obrázek 21b: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3	44
Obrázek 21c: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3	44
Obrázek 21d: Emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3	45
Obrázek 21e: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3	45
Obrázek 21f: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3	45
Obrázek 22a: Emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3	46
Obrázek 22b: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3	46
Obrázek 22c: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3	47

Obrázek 22d: Emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3	47
Obrázek 22e: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3	47
Obrázek 22f: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3	48
Obrázek 22g: Rozklad emisních spekter CT26 a T3T pomocí GASpeD	49
Obrázek 23a: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3	49
Obrázek 23b: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3	50
Obrázek 23c: Reprodukovatelnost emisního spektra CT26 při excitační vlnové délce 365 nm	50
Obrázek 23d: Reprodukovatelnost emisního spektra 3T3 při excitační vlnové délce 365 nm	50
Obrázek 23e: Rozklad emisních spekter CT26 a T3T pomocí GASpeD	51
Obrázek 23f: Emisní spektra po podání glukózy	51
Obrázek 23g: Emisní spektra po podání glukózy	52
Obrázek 24: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vlnovou délku 460 nm..	53

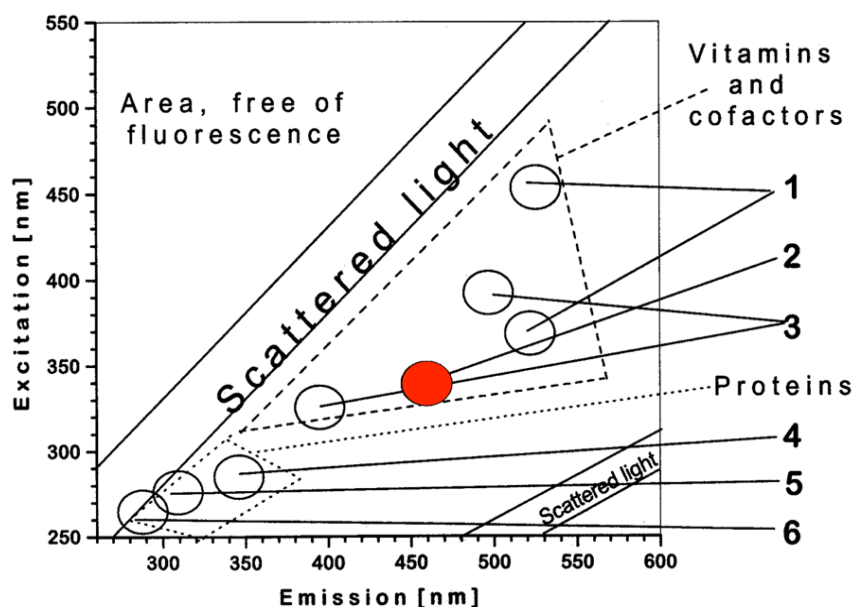
Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled biofluoroforů a jejich excitační a emisní maxima	25
Tabulka 2: Podrobné informace o buněčných kultur [37, 38]	31

1 Úvod

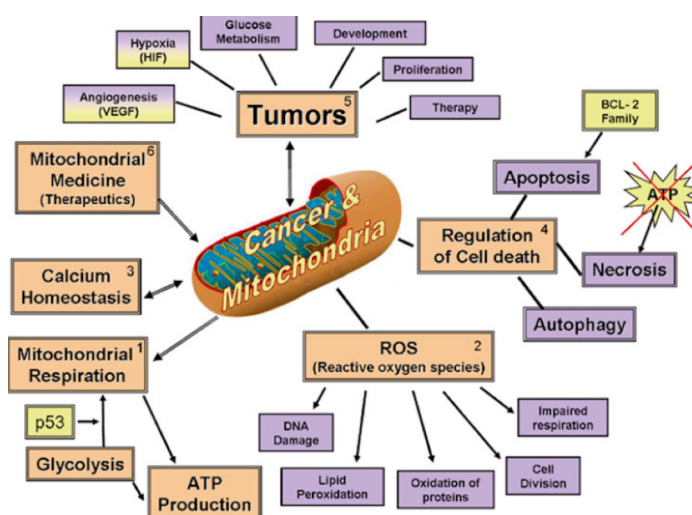
Incidence a mortalita pacientů s nádorovým onemocněním neustále roste jak v České Republice, tak i celosvětově. Včasná diagnostika a zahájení terapie jsou velmi důležité faktory, které ovlivňují tuto statistiku. Při terapii benigního nádorového onemocnění, jsou funkční stav a vitalita buněk klíčové parametry pro zjištění účinnosti konkrétní terapie. Prozatím byly zkoušky buněčné vitality prováděny pouze *in vitro*, což však dovoluje pouze jednorázové měření na daném preparátu. Některé jsou ale samy toxické, a tudíž v medicíně nepoužitelné. Proto je cíl naší diplomové práce zaměřen na hledání způsobu, jak rozlišit nádorové buňky od zdravých *in vivo* s použitím neinvazivní fluorescenční techniky.

Motivace této diplomové práce je porovnat emisní spektra nádorových a zdravých buněk, popřípadě nalézt metodu, jak rozpoznat nádorové buňky. To by umožnilo *in vivo* diagnostikovat nádory včas což je velmi důležité při terapii. Diagnostika autofluorescencí biofluoroforů by byla neinvazivní a netoxická (nepotřebujeme přidat žádné fotosenzitivní látky). Rozdíly mezi zdravých a nemocích buněk také hodně přispívají v terapii. Diagram excitačních a emisních vlnových délek biofluorofů ve VIS oblasti spektra je v obrázku 1.



Obrázek 1: 1.Riboflavin, FAD, FMD, 2.NADH, 3.Pyridoxine, Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-fosfat, 4.Tryptofan, 5.Tyrosin, 6.Fenylalanin [1]

Poruchy mitochondriálních funkcí vedou k narušení buněčných aktivit a vyvolávají různé lidské nemoci [2]. Mitochondrie, jako systém produkce energie, se podílí na patogenezi nádorových buněk, popsané Warburgem před 80 lety [3] a později následované dalšími studiemi [2, 3-7]. Úlohu NADH v buněčné funkci popsal Kaplan [8]. Dýchací řetězec, který probíhá v mitochondrii je hlavní zdroj energie pro náš organismus. Nejen nádorové ale i jiné nemoci souvisejí hlavně s metabolismem buňky (výroba ATP). Proto poznatky biofluoroforů, které se účastní dýchacího řetězce, mohou pomoci monitorovat stav buňky a její poruchy (v našem případě jsou to zdravé nebo nádorové buňky). Hlavní role mitochondrie, která souvisí s patogenezi nádoru je zobrazen v obrázku 2.



Obrázek 2: Procesy probíhající v mitochondrii, které přispívají při patogenezi nádoru [9]

Chemické složení a spektrální vlastnosti biofluoroforů jsou popsány v řadě publikací [10-14], v tabulce 1 jsou uvedeny jejich parametry.

Převážná část prací, které využívají biofluorofory ke studiu buněčných funkcí a procesů, je založena na fluorescenční mikroskopii. Analýza emisních spekter byla provedena autory [15-16]. V práci 1 je analyzováno emisní spektrum z jater žijící myši, detekované vláknovou sondou. Analýza byla provedena na základě již prověřených poznatků emisních pásů biofluoroforů při excitaci na vlnové délce 366nm. V práci 2 byly srovnávány emisní spektra buněk krevní plazmy zdravých a nemocných osob, při excitaci vlnovou délkou 400nm. Byla porovnána spektra Stokesova posuvu. U obou metod byly

pozorovány rozdíly ve spektrech zdravých a nemocných osob. Příprava vzorků však byla velmi složitá.

K nejdůležitějším biofluoroforům v buňce náleží NADH a FAD [17]. NADH se oproti FAD účastní na tvorbě ATP mnohem více, jak bude detailně popsáno v kapitole 2. Proto bylo vybráno NADH, jako jeden z nativních biofluoroforů k monitorování metabolismu buněčných kultur a porovnat jejich emisní spektra. Ta byla měřena na spektrofluorometr Fluoromax-4, který je velmi přesný a plně automatizovaný přístroj.

Práce je rozdělena do 7 kapitol. Kapitola 1 popisuje cíl a motivace té diplomové práce. Bylo také vysvětleno, proč budeme věnovat emisní spektru NADH.

Kapitola 2 je věnována dýchacím řetězci buňky. Dýchací řetězec nám vysvětluje, jak naše buňky získává energie ATP a jak souvisí tvorby ATP s NADH. Poznatky o tvorbě NADH a její reakce při různé metabolické změny nám umožňuje vysvětlit příčiny změny v emisních spektrech.

Principy vzniku a jevy související s fluorescencí látky jsou popsány v kapitole 3. Kapitola podává přehled vybraných biofluoroforů a jejich parametrů.

Kapitola 4 je rozdělena na dvě části. První část popisuje kultivaci buněčných kultur a způsob přípravy buněčné suspenze. Druhá část této kapitoly popisuje přístroje a metody, které byly použity k řešení práce.

Popis experimentů a výsledky měření jsou uvedeny v kapitole 5.

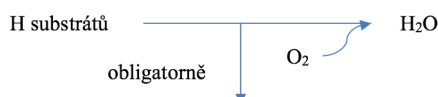
Zhodnocení a diskuse výsledků jsou uvedeny v kapitole 6.

V závěru práce je provedeno zhodnocení dosažených výsledků se zadáním diplomové práce a je navrženo pokračování v dané problematice.

2 Dýchací řetězec buňky

2.1 Definice a význam dýchacího řetězce

Dýchací řetězec představuje sled na sebe navazujících redoxních systémů lokalizovaných ve vnitřní membráně mitochondrií (nebo v jejím bezprostředním okolí), přenášející redukční ekvivalenty (vodík nebo elektrony) z vhodných substrátů až na molekulární kyslík. Ten se do mitochondrií dostane uvolněním z oxyhemoglobinu (viz v obrázku 3).



Obrázek 3: Schéma dýchacího řetězce

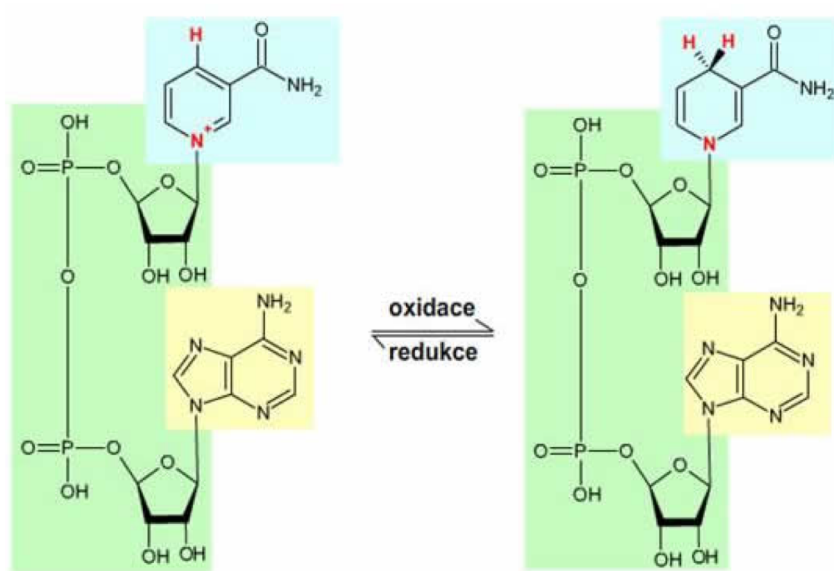
Všechny redoxní přenašeče v dýchacím řetězci jsou zabudovány do fosfolipidové dvojvrstvy vnitřní membrány mitochondrií; výjimkou jsou pyridinové dehydrogenázy s kofaktorem NAD⁺ v matrix a cytochrom C, který je volně vázán na vnější povrch vnitřní membrány. Lokalizace řetězce ve vnitřní membráně je výhodná pro bezproblémové napojení koncového metabolismu živin. V matrix mitochondrie probíhá β -oxidace mastných kyselin a citrátový cyklus. Tím se vodíky původně pocházející z živin snadno přenášejí na začátek dýchacího řetězce prostřednictvím pyridinových či flavinových dehydrogenáz. Během odbourávání dochází ke vzniku redukováných koenzymů – NADH a FADH₂. Chemické struktury NADH a FADH a jejich oxidované formy jsou ukázány na obrázku 4 a 5.

NADH se v dýchacím řetězci zpět oxiduje na NAD⁺ dle reakce:

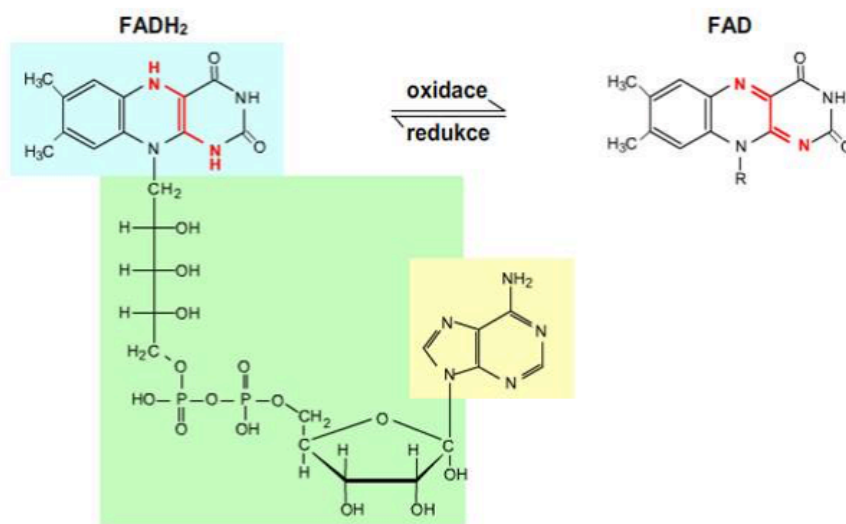


FADH₂ se v dýchacím řetězci zpět oxiduje na FAD dle reakce:





Obrázek 4: Nikotin-amidadenin-dinukleotid-fosfát v oxidované (nalevo) a redukované podobě (napravo) [18]



Obrázek 5: Flavinadenindinukleotid v oxidované (nalevo) a redukované podobě (napravo) [18]

Aktivita buněčného dýchání závisí na nahromadění přenašečů v mitochondrii. Proto mitochondrie s vysokým počtem krist, tedy s velkým povrchem vnitřní membrány, mají vysokou schopnost konzumovat kyslík (dýchat), a tak uvolňovat více volné energie [19].

2.2 Procesy buněčného řetězce

Celý děj probíhá v několika krocích:

- Aerobní glykolýza
- Krebsův cyklus
- Dýchací řetězec
- Oxidativní fosforylace [20]

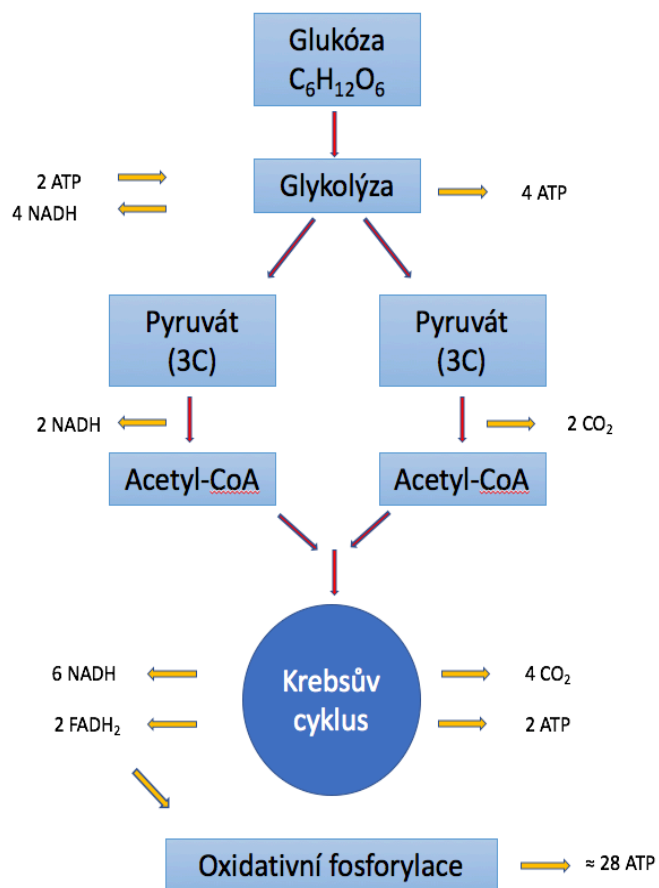
V cytosolu je glukóza rozštěpena procesem glykolýzou. Při rozštěpení 1 molekuly glukózy se uvolní energie, která odpovídá 2 molekulám ATP. Glykolýza může probíhat i bez přítomnosti kyslíku, konečným produktem anaerobní glykolýzy je kyselina mléčná. V červených krvinkách, které nemají mitochondrie, je anaerobní glykolýza veškerým zdrojem energie. V aerobních podmínkách je konečným produktem glykolýzy kyselina pyrohroznová.

Kyselina pyrohroznová je přenesena do mitochondrií a tam je oxidována na acetyl-CoA. Ten vstupuje do Krebsova cyklu. Během cyklu se uvolní další dvě molekuly ATP, hlavně ale dojde k redukci koenzymů, které pak přenášejí vodíkové protony a elektrony na vnitřní membránu mitochondrií. Jako vedlejší produkt se uvolňuje oxid uhličitý.

Vodíkové atomy, které přinesly zredukované koenzymy z Krebsova cyklu, jsou přenášeny enzymy dýchacího řetězce, (flavoproteiny, koenzym Q, cytochromy, které jsou zabudované do vnitřní membrány mitochondrií.

Cytochromy si předávají elektrony a energii, která se uvolní při oxidačně-redukčních procesech, využívají k přečerpávání protonů do prostoru mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou. Na konci dýchacího řetězce je „vyčerpaný“ proton oxidován kyslíkem na vodu.

Vnitřní membrána mitochondrií je pro vodíkové ionty neprostupná. Díky činnosti protonových pump dýchacího řetězce se na membráně tvoří gradient, ionty mají snahu vyrovnat koncentrace na obou stranách membrány. Jediný způsob, jak se mohou vodíkové ionty dostat na druhou stranu membrány, je projít skrze ATP-syntézu. Enzym, který je zakotvený v membráně a tvoří kanál pro průchod iontů. Zároveň využívá jejich energii k syntéze ATP. [20]



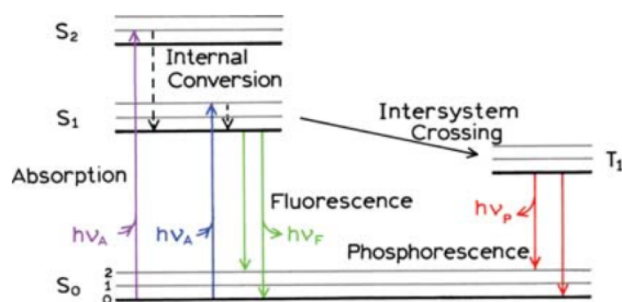
Obrázek 6: Schéma procesů buněčného dýchání.

3 FLUORESCENCE

Luminiscence je emise elektromagnetické vlny, které vzniká jako přebytek záření tělesa nad úroveň jeho tepelného záření v dané spektrální oblasti při dané teplotě. Luminiscence je rozdělena na dva jevy: fluorescence a fosforescence – záleží na typu jejích excitačních stavů. Fluorescenci pozorujeme jako zářivý přechod ze singletního stavu S_1 do základního stavu S_0 . Po vypnutí buzení zmizí prakticky ihned. Doba dohasínání je zhruba 10 ns. Fosforescence je emise elektromagnetické vlny z tripletního excitovaného (metastabilního) stavu T_1 do základního stavu S_0 , k vyzařování pak dochází pomalu i po dobu od několika milisekund až sekund. Fosforescenci často nepozorujeme v tekutém roztoku při pokojové teplotě, protože existují deaktivující procesy, které mohou dominovat nad emisí, tj. například nezářivé přechody nebo zhasnutí [17].

3.1 Jablonski diagram

Jablonského diagram (viz. obrázek 7) představuje energetické hladiny molekuly, na které mohou být excitovány valenční elektrony a procesy, které nastávají při absorpci a emisi elektromagnetické vlny (fotonu), které je pojmenované po profesoru Alexanderu Jablonském. [21-22].



Obrázek 7: Jablonského diagram [17]

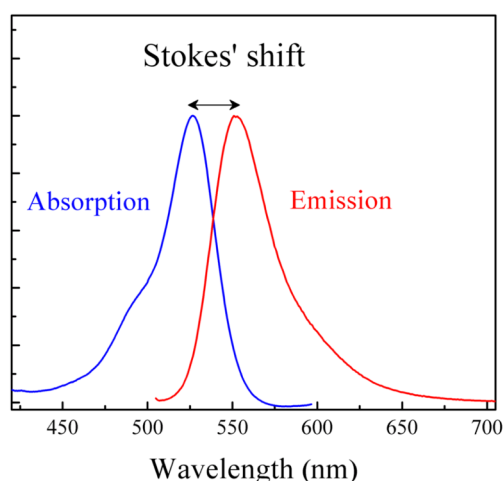
Absorpce a emise u složitých organických molekul probíhají mezi rotačně vibračními energetickými hladinami.

Každá energetická hladina může obsahovat několik vibračních energetických úrovní, označených jako 0, 1, 2 atd. Absorpce a emise nastává převážně u molekuly s nejnižší vibrační energií. Fluorofory se často excitují do vyšších vibračních energetických úrovní S_1 nebo S_2 . Relaxace do nejnižší vibrační úrovně S_1 se říká vnitřní konverze. Konverze z hladiny S_1 na T_1 je tzv. intersystem crossing [17].

3.2 Charakteristika fluorescenčního spektra

3.2.1 Stokesův posun

Energie emise je typicky menší než energie absorpce. Proto fluorescence vykazuje menší energie (Stokesův posun) nebo větší vlnové délky (Anti-Stokesův posun). Tento jev byl poprvé pozorován Sir. G. G. Stoksem v roce 1852 [23] později byl nazván Stokesův posun (viz. obrázek 8).



Obrázek 8: Absorpční a emisní spektrum Rhodaminu[10]

3.2.2 Nezávislost emisního spektra na excitační vlnové délce

Další vlastností fluorescence je nezávislost emisního spektra na excitační vlnové délce, známá jako Kashovo pravidlo [24]. Toto pravidlo znamená, že při excitaci molekuly na vyšší energetickou hladinu, přebytek energie je rychle spotřebován a pokud není dodána další energie, vrací se molekula na nejnižší vibrační energetickou hladinu (relaxace) S_1 . Tato relaxace trvá zhruba 10^{-12} s. Díky této rychlé relaxaci je emisní spektrum většinou nezávislé na vlnové délce. Výjimku tvoří fluorofory, které se mohou vyskytovat ve dvou různých ionizačních stavech, každý stav má odlišné absorpční a emisní spektrum. Existují i molekuly které mohou emitovat od S_2 , ale emise je vzácná a obecně nepozorujeme u biologické molekuly [17].

3.2.3 Doba života a kvantový výtěžek

Doba života τ a kvantový výtěžek Q jsou nejdůležitějšími parametry fluorescence. Kvantový výtěžek je definován jako podíl počtu emisních fotonů k počtu absorbovaných fotonů, vyjádřen vztahem (1). Látky s velkým kvantovým výtěžkem - např. Rhodamin $Q = 0,9$, vykazují hodně emise.

$$Q = \Gamma / (\Gamma + k_{nr}) \quad (1)$$

Kde Γ a k_{nr} jsou rychlostní konstanty [s^{-1}] zářivého a nezářivého přechodu. Kvantový výtěžek se může přiblížit k jedné, pokud je nezářivá rychlostní konstanta k_{nr} mnohem menší než zářivá rychlostní konstanta Γ . Kvantový výtěžek fluoroforů je vždy menší než jedna díky Stokesovu posunu.

Doba života τ excitovaného stavu je dalším důležitým parametrem, který definuje dobu, po které fluorofor interaguje s okolním prostředím. Doba života je definována jako střední hodnota doby, která uplyne mezi excitovaným stavem molekuly a jejím návratem do základního stavu. Doba života je přibližně 10 ns a je vyjádřena vztahem:

$$\tau = 1 / (\Gamma + k_{nr}) \quad (2)$$

Fluorescence je náhodný proces, proto jen pár excitačních fotonů může emitovat fotony v čase $t = \tau$. Doba života může být definována jako střední doba, kdy počet emitovaných fotonů klesne na $1/e$ oproti svému původnímu počtu. Tato definice je principem metody měření doby života excitovaných stavů látek.

Doba života excitovaného stavu fluoroforů s absencí nezářivého přechodu je tzv. přirozená doba života τ_n a je dána vztahem:

$$\tau_n = 1 / \Gamma \quad (3)$$

Přirozená doba života může být také vyjádřena jako podíl doby života τ a kvantového výtěžku Q :

$$\tau_n = \tau / Q \quad (4)$$

Význam kvantového výtěžku Q a doby života τ jsou nejlépe prezentované Jablonským diagramem na obrázku 7.

3.2.4 Fluorescenční zhášení

Intenzita fluorescence je ovlivněna procesy, které mohou vést k jejímu snížení. Všem jevům, které přispívají k tomuto procesu, se říká fluorescenční zhášení. Tyto procesy mohou nastat během excitační doby např. kolizní zhášení, předávání energie, nábojová výměna během reakce nebo fotochemie – nebo díky tvorbě komplexu v základním stavu.

Nejčastějšími typy zhášení jsou kolizní (mechanické) zhášení a statické (tvorba komplexu) zhášení.

Kolizní zhášení můžeme pozorovat, když se excitační fluorofory dostávají do kontaktu s atomy nebo molekulami, které usnadňují nezářivý přechod do základního stavu. Taková zhášedla jsou O₂, I⁻, Cs⁺ a akrylamid.

Kolizní zhášení je popsáno Stern-Volmerovou rovnicí:

$$I_0/I = 1 + K_{sv} [c] \quad (5)$$

Kde I_0 a I jsou fluorescence pozorované bez a s přítomností zhášedla, $[c]$ je koncentrace zhášedla a K_{sv} je Stern-Volmerova konstanta. Stern-Volmerova konstanta ukazuje citlivost fluoroforů ke zhášedlu.

Další případ zhášení je statické zhášení. Fluorofory vytvoří stabilní nefluorescenční komplex s dalšími molekulami v základním stavu. Nejedná se o difuzi ani o kolizi [17].

3.3 Fluorofory

Fluorofory jsou látky, které po absorpci světla vykazují fluorescenci. Existují dvě formy, přirozené a syntetické fluorofory. Přirozené fluorofory (viz. tabulka 1) jsou fluorofory, které se vyskytují v přírodních a biologických látkách, to jsou např. aromatické aminokyseliny, NADH, flaviny, deriváty pyridoxinu a chlorofyl. Syntetické fluorofory jsou látky, které se připravují chemickou cestou, mají velkou kvantovou výtěžnost a používají se jako aditiva k dalším látkám, aby vykazaly fluorescenci. Syntetické fluorofory jsou např. dansyl, fluorescein, rhodamine a další látky [25-27].

Biofluorofory	Excitační maxima (nm)	Emisní maxima (nm)
Tryptofan	280	350
NADH	350	440
Pyridoxin	340	400
Pyridoxal	330	385
Vitamin K	335	480
Vitamin A	327	510
Vitamin D	390	480
Pyridoxal 5'-fosfat	330	400
FAD, flaviny	450	535
Fosfolipidy	436	540
Lipofuscin	340	540

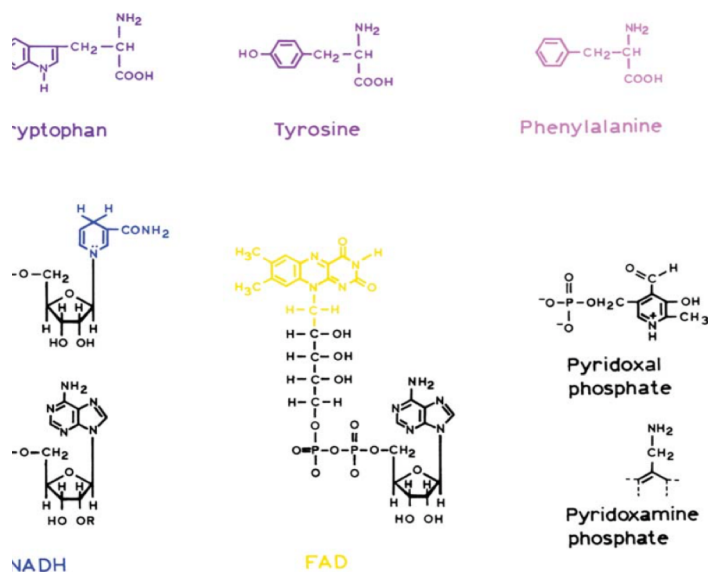
Tabulka 1: Přehled biofluoroforů a jejich excitační a emisní maxima [17]

3.3.1 Fluorescence kofaktorů

Kofaktory jsou často fluorofory. NADH vykazuje vysokou fluorescenci s absorpční a emisní maxima ve 340 nm a 460 nm.

Kofaktor pyridoxyl fosfát vykazuje také fluorescenci. Jeho absorpční a emisní spektrum závisí na chemické struktuře proteinu, se kterým je pyridoxylová skupina vázaná.

Riboflavin, FMN (Flavin mononukleotide), a FAD (Flavin adenine dinucleotide) absorbují světlo o vlnové délce zhruba 450 nm a emitují světlo o vlnové délce okolo 525 nm. Na rozdíl od NADH, oxidovaná forma flavinu fluoreskuje a redukovaná forma ne [35]. Stejně jako NADH, fluorescence flavinu je zhasena adeninem díky formaci flavinu s adenosinem. Důvod zhasení může být i dynamický kvůli kolizi adeninu s nikotinamidovou částí [28, 29]. Na rozdíl od NADH který fluoreskuje více, když je vázán s proteinem, flavoproteiny fluoreskují méně nebo úplně [17].

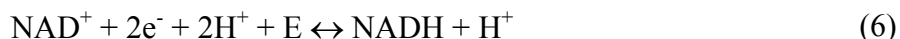


Obrázek 9: Biofluorofory[17]

V současnosti je velký zájem o emisi vnitřních fluoroforů tkáně nebo od vnitřních fluoroforů, které nejsou kofaktory. Hlavní podíl na fluorescenci tkáně je od NADH a flavinů [23]. Ostatní fluorofory obsažené v tkáni jsou kolageny, elastiny a porfyriny. Většina prací, zabývající se fluorescencí tkáně, mají za cíl identifikovat zdravé tkáně od nádorových a ostatních nemocí [17].

3.3.2 Význam NADH

Nikotinamid adenin dinukleotid slouží jako koenzym redoxních reakcí a v organismu se vyskytuje ve dvou formách. Oxidovaná forma (NAD^+) se na redukovanou formu (NADH) mění reakcí, při níž přijímá vodíkový atom (odpovídá jednomu protonu a jednomu elektronu) a elektron. Tím vznikne NADH a do okolí je uvolněn jeden proton z druhého atomu vodíku. Díky poměrně nízké elektronové afinitě může molekula NADH přijatý elektron snadno předávat dalším molekulám – reakce přitom probíhá obráceným směrem a opět vzniká oxidovaný NAD^+ za současného uvolnění energie. Molekula tak může cyklicky přecházet mezi oxidovanou a redukovanou formou a přenášet elektrony, aniž by sama byla konzumována. [31, 32]



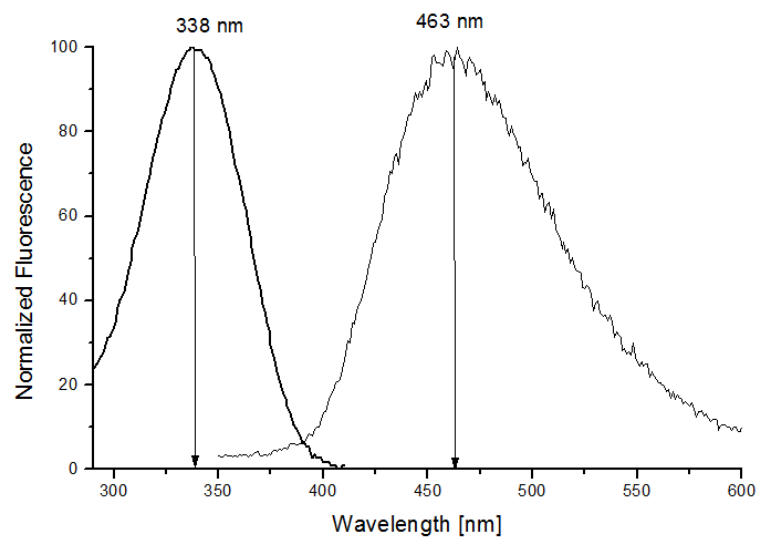
Této schopnosti přenášet elektron je v organismu využíváno zejména během buněčného dýchání, kde hraje NADH jednu z klíčových rolí. Jelikož výsledek redoxní reakce NADH je NAD^+ probíhají cyklicky, znamená to, že v určitých okamžicích buněčného dýchání je NAD^+ redukováno na NADH, v jiných pak reakce probíhá obráceným směrem.

NADH je tedy pro život nezbytná molekula umožňující efektivní chod oxidativní fosforylace, která v buňce stojí za výrobou většiny molekul ATP. Na jednu molekulu glukózy připadá čistý zisk cca 30 molekul ATP, z toho jen dvě pochází z glykolýzy, zbytek je výsledkem oxidativní fosforylace. [31]

V celkovém součtu však NADH vyžívá jako katalyzátoru redoxních reakcí více než 500 enzymů, nacházejících se i mimo mitochondrie, spektrum jeho využití je tak podstatně širší [33]. Jakožto fluorescenční molekula NADH představuje výborný prostředek pro neinvazivní monitorování metabolického stavu buněk.

3.3.3 Fluorescence NADH

Jak bylo zmíněno výše, koenzym NADH se může vyskytnout ve dvou formách: oxidační a redukční forma. Fluorescenci molekuly NADH způsobuje redukováná nikotinamidová část, což znamená, že molekula je fluorescenční pouze v redukované formě, protože NAD^+ má oproti NADH téměř nulovou fluorescenci. Maximum absorpce NADH se nachází na vlnové délce 340 nm, maximum emise na 460 nm (viz obrázek 10) [35-36]. Doba života NADH ve vodním pufru je přibližně 0,4 ns. V roztoku je fluorescence zhasena částečně kolizí nebo přebytkem adeninové části. Po navázání NADH s proteinem se kvantový výtěžek NADH obecně zvýší na čtyřnásobek a doba života se prodlouží na 1,2 ns. Nicméně, zaleží na proteinu, se kterým je NADH vázán, fluorescence se může zvýšit ale i snížit [17].



Obrázek 10: Naměřené absorpčního a emisního spektra NADH

4 Materiály a metody pro měření emisního spektra buněčných kultur

Měření byla provedena na buněčné suspenzi zdravých a nádorových buněk (viz. Tabulka 2) na spektrometru Horiba Fluoromax-4. Byly použity 3 excitační vlnové délky (260, 340 a 365 nm) v suspenzi s pH 7 (bez přítomnosti glukózy, při aerobní glykolýze a anaerobní glykolýze). Postupy a výsledky pokusů budou detailně popsány v další kapitole.

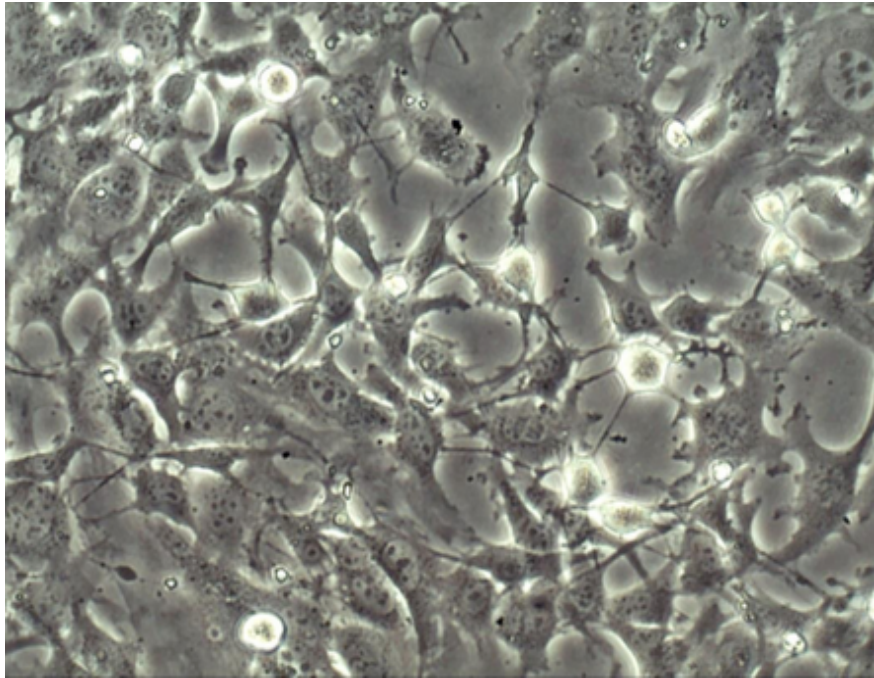
4.1 Materiály a příprava vzorků

4.1.1 Buněčné linie používané při experimentech

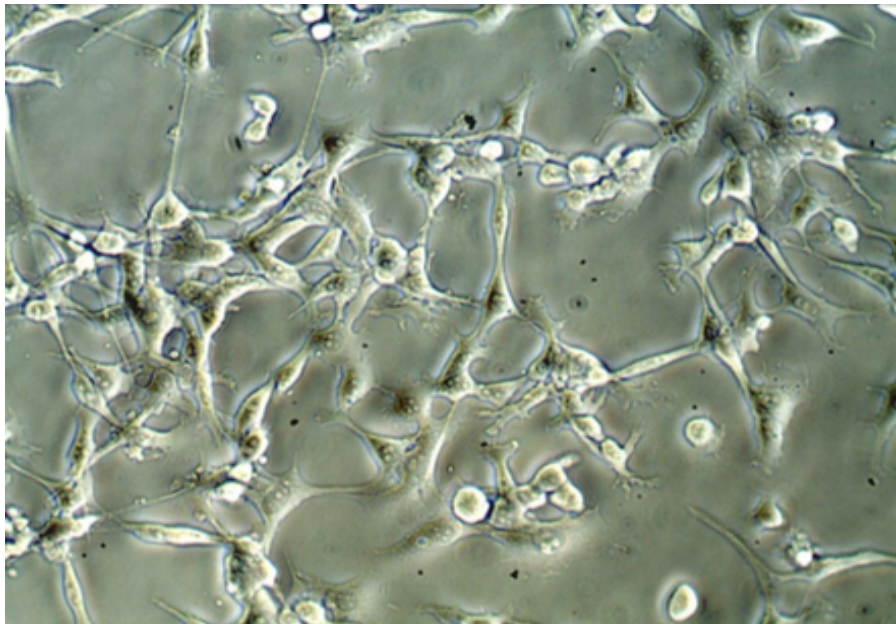
Byly vybrány a používány dva typy buněčné linie: buněčné linie BALB/3T3 a buněčné linie CT26.WT od firmy Sigma Aldrich.

Buněčná linie BALB/3T3 jsou fibroblasty odebrané z myších embryí mezi 14 a 17 dnem gestace. Druhou buněčnou linií (CT26.WT) jsou fibroblasty odebrané z karcinomu tlustého střeva dospělých myší. Podrobné informace k buněčným liniím jsou uvedené v tabulce 2.

Obě dvě linie jsou adherentní buňky, které jsou kultivovány na Petriho misce v kultivačním mediu (blíže popsáném v kapitole 4.1.2) při teplotě 37 °C a atmosféře s 5 % frakcí oxidu uhličitého.



Obrázek 11: Mikroskopický snímek buněk linie BAL/3T3. Zvětšeno 400x [30]



Obrázek 12: Mikroskopický snímek buněk linie CT26.WT. Zvětšeno 400x [30]

Označení	CT26	3T3
Přesný název	CT26.WT (ATCC® CRL-2638™)	NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™)
Organismus	<i>Mus musculus</i> , myš domácí	<i>Mus musculus</i> , myš domácí
Tkáň	tlusté střevo	embryo
Formát	zmražený	zmražený
Morfologie	fibroblast	fibroblast
Choroba	karcinom	zdravý
Věk	N/A	embryo
Kmen	BALB/c	NIH/Swiss

Tabulka 2: Podrobné informace o buněčných kultur [37, 38]

4.1.2 Kultivační procesy

Buňky byly kultivovány ze zmražených buněk s teplotou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve dvou mediích Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM – low glucose with 1000 mg/L glucose and sodium bicarbonate, with and without L-glutamine and phenol red, Sigma Aldrich, USA) s 10 % podílem fetálního bovinního séra (FBS, Gibco, USA) a antibiotiky (Gentamycin, Sandoz, Švýcarsko) v Petriho misce zhruba 2 dny před měřením v inkubátoru při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a atmosféře s 5 % frakcí oxidu uhličitého. Všechny procesy byly prováděny ve sterilních podmínkách v laminárním boxu.

Pro přípravu suspenze byl použit 0,25 % roztoku trypsinu a EDTA (Trypsin-EDTA solution, Sigma Aldrich, USA). Jedná se o proteázu, která štěpí peptidové vazby bílkovin, což pomáhá uvolnit buňky od podkladového skla.

K promývání buněk a tvorbě suspenze byl použit roztok PBS s chloridem hořečnatým a chloridem vápenatým (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich, USA) pH 7.

4.1.3 Příprava buněčné suspenze

Měření byla prováděna na přístroji Horiba Fluoromax-4. Bylo nutné převést buňky z podkladového materiálu do suspenze. Postup byl následující:

Po kontrole nakultivované buňky mikroskopem, bylo odebráno kultivační médium z Petriho misky a poté byla miska 2x omyta roztokem PBS, čímž byly odstraněny odumřelé buňky. Potom byl přidán do misky roztok trypsinu a EDTA, jenž se nechal působit po dobu zhruba 8 minut v inkubátoru. Následně byla miska kontrolována pod mikroskopem, zda jsou buňky uvolněné ze dna misky a volně plavou v roztoku. Hned potom se musí přidat zhruba 8 ml kultivačního média, aby zastavil účinek proteázy. Směs byla přenesena do zkumavky, poté byla centrifugována po dobu 5 minut při přetížení 193 g. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml roztoku PBS. Koncentrace buněk byla určena z roztoku v Burkerově komůrce (viz. níže).

4.2 Metody používané při měření

4.2.1 Spektrometr Fluoromax -4

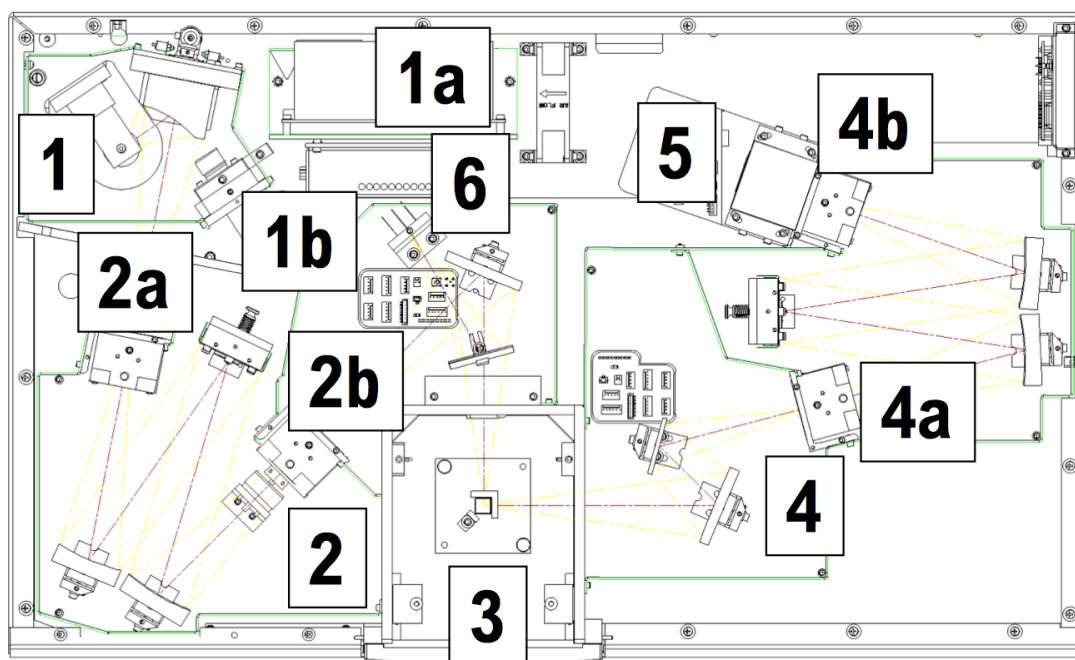
Fluorescenční spektrometr Fluoromax-4 (Horiba, Japonsko viz. Obr. 13) je plně automatický přístroj na měření spektrální závislosti fluorescence. Schéma vnitřního uspořádání je uvedeno na obrázku 14.



Obrázek 13: Fluorescenční spektrometr Horiba Fluoromax-4 [39]

Zdrojem záření je xenonová oblouková lampa s výkonem 150 W v UV oblasti spektra, což je jedním z hlavních požadavků pro vybuzení fluorescence NADH a dalších fluoroforů absorbujících ultrafialové záření. Záření výbojky je sbíráno eliptickým zrcadlem, které zajišťuje fokusaci svazku záření na vstupní štěrbinu excitačního monochromátoru. Samotná lampa je od excitačního monochromátoru

oddělena křemenným sklem, které slouží k odvádění tepla z lampy. Excitační monochromátor zajišťuje průchod záření štěrbinou po difrakci na mřížce. Použitá mřížka zajišťuje maximální intenzitu v UV a ve viditelné oblasti. Svazek záření je veden odrazem soustavou zrcadel. Velikost štěrbin monochromátorů je možno zadávat jako parametr ovládajícího programu Fluorescence v3.5 (v nanometrech), velikost štěrbin excitačního monochromátoru určuje šířku spektrální čáry excitačního záření dopadajícího na vzorek. Velikost štěrbin emisního monochromátoru reguluje intenzitu záření dopadajícího na detektor. Zvětšováním velikosti této štěrbinu dopadá na vzorek větší intenzita fluorescenčního záření, ale snižuje se rozlišení a naopak. Poté následuje komora pro vzorek. Fluorescentní záření ze vzorku je koncentrováno emisním monochromátorem s obdobnou funkcí, kterou plní excitační monochromátor, tedy maximální propustnost záření. Signál je detekován fotonásobičem s rozsahem odezvy 180 nm – 850 nm. Výhodou přístroje Horiba fluoromax-4 je, že fotonásobič zvyšuje jeho citlivost. Fluktuace vyzařování xenonové lampy je korigována pomocí referenčního detektoru – fotodiody, jehož signál je použit při korekci měřené fluorescence fotonásobičem.



Obrázek 14: Schéma vnitřního uspořádání fluorescenčního spektrometru Horiba Fluormax-4 1. Xenonová lampa 1a. Zdroje energie lampy 2. Excitační monochromátor 3. Komora pro naměřený vzorek 4. Emisní monochromátor 5. Detektor signálu 6. Referenční detektor [39]

4.2.2 Software GASpeD

GASpeD je zkratka pro Genetic Algorithm for Spectral Decomposition. Jedná se o program, který používá různé metody rozkladu spektra a poskytuje jednoduché grafické uživatelské rozhraní pro jeho interaktivní analýzu. Program umožňuje nalézt parametry funkcí popisujících pozadí a konkrétní spektrální křivky. Celkový počet spektrálních křivek přítomných ve spektru (a tedy i optimalizovaných parametrů) je v obecném případě neznámý, algoritmus jej ale dokáže odhadnout. Software řeší problém spektrálního rozkladu pomocí genetického algoritmu (GA). Tato metoda již byla úspěšně použita v mnoha vědních disciplínách. Jedná se o heuristický postup, který se snaží aplikací principů evoluční biologie nalézt řešení složitých problémů, pro které neexistuje použitelný exaktní algoritmus [40]. Genetické algoritmy, resp. všechny postupy patřící mezi tzv. evoluční algoritmy, používají techniky napodobující evoluční procesy známé z biologie – dědičnost, mutace, přirozený výběr a křížení – pro „šlechtění“ řešení zadané úlohy. Pro dosažení lepších výsledků kombinuje GASpeD genetický algoritmus s tradiční lokální optimalizační technikou, metodou Levenber-Marquardt, která se zpravidla používá k závěrečné fázi optimalizace. Implementace proměnné pravděpodobnosti mutace a preinicializace populace (spuštěním několika parciálních genetických algoritmů) dále zlepšuje konvergenci programu GASpeD a snižuje pravděpodobnost uvíznutí v lokálním minimu [41]

4.2.3 Burkerová komůrka

Koncentrace buněk ve vzorku byla určena pomocí Burkerovy komůrky (viz. obrázek 15).

10 μl suspenze (viz. příprava vzorku ve kapitole 4.1) bylo pipetováno na stranu krycího skla a pod mikroskopem spočítány buňky v jednotlivých čtvercích.

Počet buněk v 1 mm^3 (μl) suspenze je určen vztahem:

$$b = n * z / (c * v * h) \quad (7)$$

Kde b ... počet buněk v 1 mm^3

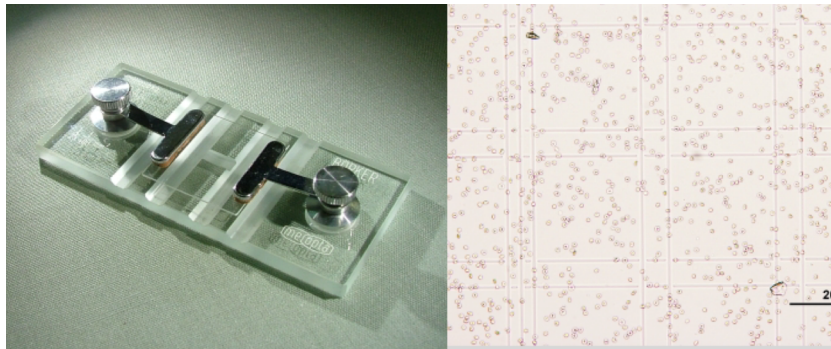
n ... celkový počet napočítaných buněk

c ... počet čtverců ve kterých se počítalo (nejčastěji 25 nebo 50)

v ... plocha použitého čtverce (malý nebo velký)

h ... hloubka komůrky

z ... použité ředění suspenze (uvádí se kolikrát byla suspenze ředěna)



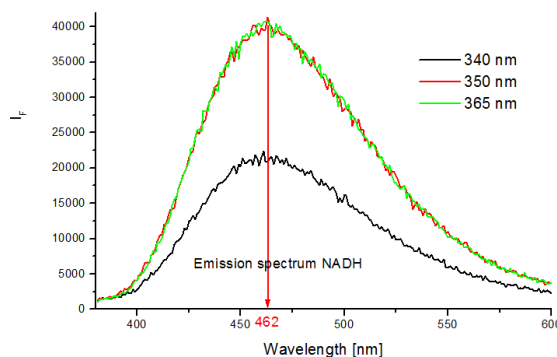
Obrázek 15: Burkerova komorka [42]

5 Výsledky

5.1 Měření fluorescence čistého NADH

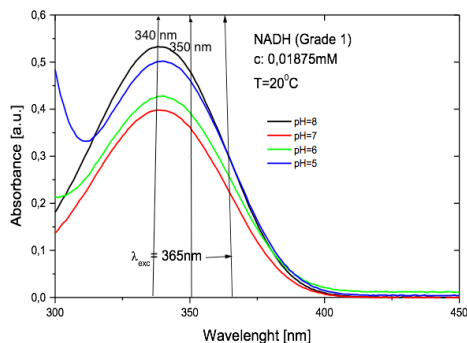
5.1.1 Vliv excitační vlnové délce na fluorescence NADH

Vzorek NADH pro měření spekter byl připraven z práškové formy NADH – β -Nicotinamid adenine dinucleotide hydrate ($M=663,43$ g/mol), (N7004, Sigma-Aldrich) o 97,2% spektrofotometrické čistotě, který byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru 1x PBS (pH=7) pro stabilizaci pH. Množství NADH bylo naváženo pomocí analytických vah a smícháno s PBS tak aby byla výsledná koncentrace NADH v roztoku 0,018 mM, což odpovídá jeho koncentraci v buňce [43]. Aby byl roztok homogenní, byl sonikován v ultrazvukové lázni po dobu 10 min. Emisní spektrum pak bylo ve všech experimentech měřeno bezprostředně.



Obrázek 16a: Emisní spektrum NADH při excitační vlnové délce 340 nm, 350 nm a 365 nm

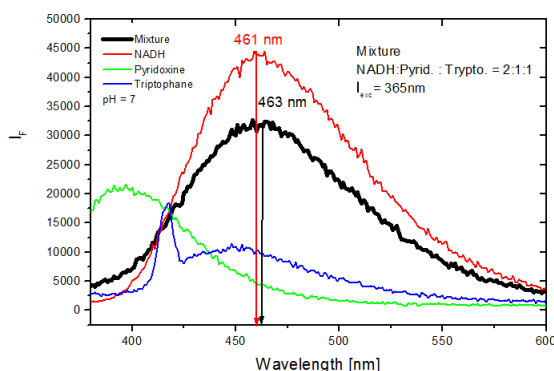
Měření na více excitačních vlnových délkách bylo provedeno za účelem poznat a zjistit, jak se mění fluorescence NADH. Bylo pozorováno že excitační vlnové délky mají vliv na intenzitu fluorescence NADH, ale ne na průběh emisního spektra NADH (viz obrázek 16a což odpovídá Kashovu pravidlu. Výběr více excitačních vlnových délek je umožněn šířkou absorpčního pásu v oblasti 340nm jak ukazuje experimentální výsledek měření na obrázku č. 16b. Emisní maxima pro všechny excitační vlnové délky jsou pro vlnovou délku 460 nm což je ve shodě s literaturou.



Obrázek 16b: Šířka absorpčního pásu NADH

5.1.2 Vliv vlnových délek na fluorescence roztoků různých biofluoroforů

Ke zjištění excitační vlnové délky, která by potlačila vliv ostatních biofluoroforů obsažených v buňce jsme připravily směs NADH, tryptofan a pyridoxin s koncentrací NADH 0,3 mM, pyridoxin o koncentraci 0,6 mM s tryptofanem s koncentrací 0,6 mM v poměru 2:1:1. Vzorek byl opět sonikován po dobu 10 minut a během měření, aby nedošlo k tvorbě agregací, bylo použito magnetické míchátko. Výsledek je ukázán v obrázku 17.



Obrázek 17: Emisní spektrum roztoku (NADH, Pyridoxin a Tryptofan) při excitační vlnové délce 365 nm

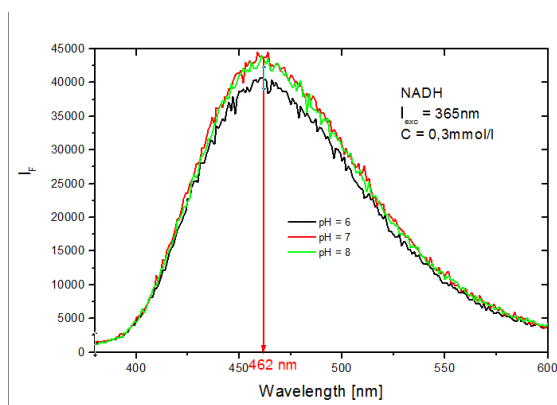
Roztok jsme naměřili také při vlnové délce 340 nm a 350 nm. Bylo pozorováno, že při vlnové délce 365 nm, bylo emisní spektrum roztoku velice podobné s emisním spektrem NADH. Po opakování našeho experimentu několikrát za sebou jsme došli

k závěru, že se budeme věnovat hlavně excitační vlnové délce 365 nm, která vykazuje největší intenzitu fluorescence u NADH.

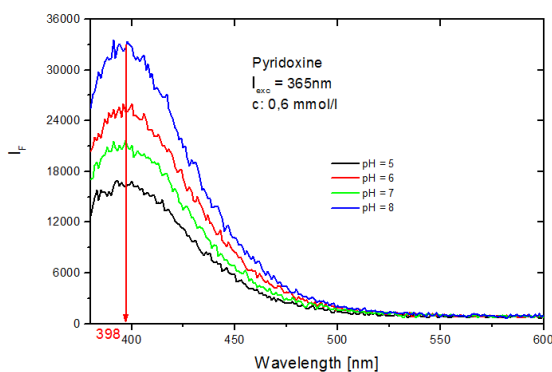
5.1.3 Vliv pH na fluorescence NADH

Vliv pH pufru ve kterém byly připraveny vzorky směsi byl změřen pro stejné poměry NADH, tryptofanu a pyridoxinu pro pH 6, 7 a 8. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 18a, 18b a 18c.

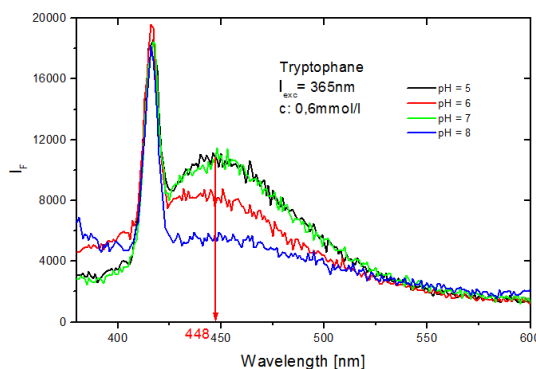
pH pufru byl upraven na potřebnou hodnotu pH přidáním NaOH nebo HCl do roztoku PBS. pH metrem byla kontrolována hodnota nového pH.



Obrázek 18a: Emisní spektrum NADH při excitační vlnové délce 365 nm v roztoku s pH 6, 7 a 8



Obrázek 18b: Emisní spektrum Pyridoxinu při excitační vlnové délce 365 nm v roztoku s pH 5, 6, 7 a 8



Obrázek 18c: Emisní spektrum Tryptofanu při excitační vlnové délce 365 nm v roztoku s pH 5, 6, 7 a 8

Měření bylo prováděno u roztoků NADH o stejné koncentraci při stejné excitační vlnové délce (365 nm), ale s různým pH. Byl pozorován rozdíl v intenzitě fluorescence, ale ne v emisních maximech. Nepatrné rozdíly byly u emisních spekter při excitační vlnové délce 350 nm a 365 nm. Postup měření byl následně aplikován na pyridoxin i tryptofan. Vliv pH na emisní spektrum je větší u tryptofanu a pyridoxinu než u NADH.

Pro porovnání emisních spekter zdravých a nádorových buněk bylo vybráno pH 7. Přestože různí lidé mohou mít různé pH (alkalóza nebo acidóza), ale buňky zdravé a nádorové rostou ve stejném prostředí.

5.2 Měření fluorescence buněčných kultur

Přestože kombinace tří biofluoroforů ukázala, že excitační vlnová délka 365 nm, zkusili jsme i jiné vlnové délky, protože buňky mohou obsahovat i jiné biofluorory, o kterých možná ani nemáme představu, jaké mají fluorescenční charakteristiky. V tomto případě jsme excitovali náš vzorek všemi vlnovými délkami (260 nm, 340 nm a 365 nm). Vlnovou délku 260 nm a 340 nm jsme vybrali, protože jsou excitační maxima pro NADH. Měřili jsme 5 krát, abychom potvrdili přesnost výsledků měření.

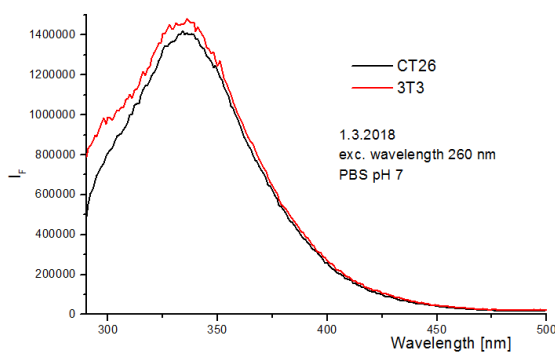
Bylo provedeno pět kultivací buněčných linií identickým postupem pro 3T3 a CT26 popsaným ve kapitole 4.1 k získání dat k porovnání jejich emisních spekter. Všechny měřené vzorky byly ve stejné kyvetě se magnetickým míchátkem, aby nedocházelo k sedimentaci buněk.

Pro všechny měření velikost štěrbinu při excitaci (2 nm) a emisi (2nm) zůstala neměnná.

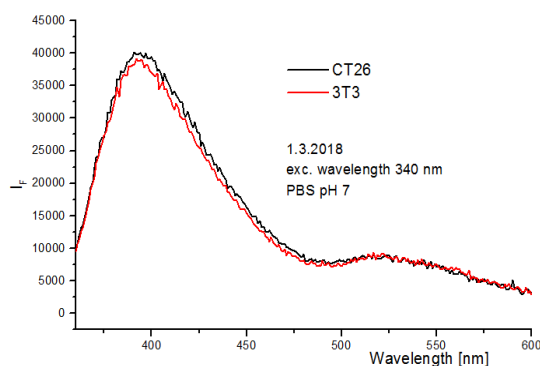
5.2.1 1. Měření

1. měření bylo provedeno 1.3.2018 po 3. dnech kultivace buněčné linie. Získaná koncentrace roztoku byla upravena na $5 \cdot 10^4$ buněk/ml pro oba typy buněk. Měření emisních spekter popsáním způsobem bylo provedeno bezprostředně po získání buněčné suspenze, aby zůstala koncentrace živých buněk nezměněna. Celý pokus by proveden na dvojici vzorků, naměřená data jsou uvedena v grafech na obrázcích 19a, 19b a 19c.

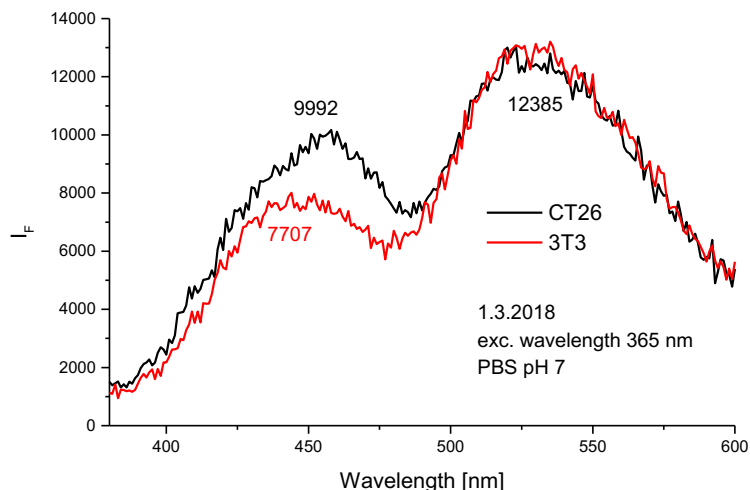
Pro přesnější měření musíme měřené signály korigovat dvěma korekcemi. Prvním je korekce na fluktuaci světelného zdroje, tj. xenonové výbojky, jejíž intenzita je měřena referenčním detektorem. Signál z detektoru je proto tímto referenčním signálem dělen, čímž je spektrum ošetřeno od vlivu časové nestálosti excitačního zdroje. Druhý spočívá v úpravě dat pomocí korekčních souborů dodávaných výrobcem, jež slouží k odstranění artefaktů zanesených do optického signálu v monochromátoru.



Obrázek 19a: Emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3



Obrázek 19b: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3



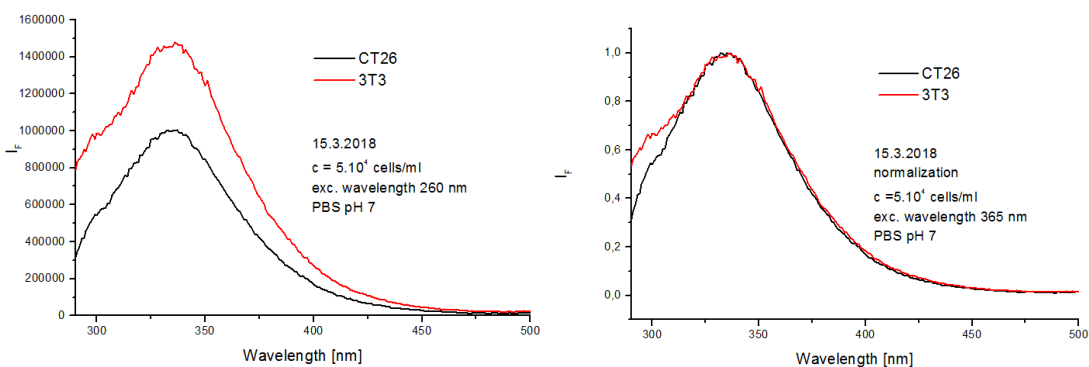
Obrázek 19c: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3

Naměřená emisní spektra 3T3 a CT26 se téměř překrývají při excitační vlnové délce 260 nm a 340 nm. U excitační vlnové délky 365 nm byla naměřená spektra rozdílná v poměru intenzity fluorescence emisních maxim a v pozicích těchto maxim. Poměr intenzity $I_F(450 \text{ nm}) : I_F(520 \text{ nm})$ u CT26 je 0,88 a u 3T3 je 0,60.

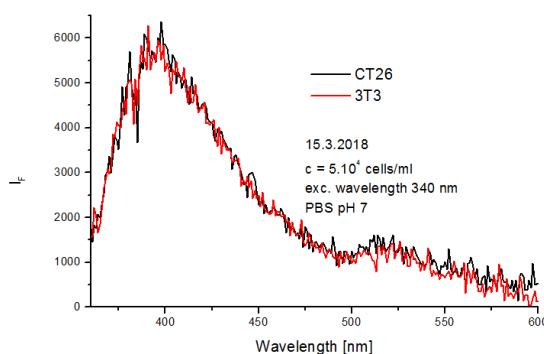
Tyto první výsledky měření potvrdily naši hypotézu o tom, že jsou fluorescenční spektra zdravých a nádorových buněk rozdílná. Abychom potvrdili naši hypotézu zopakovali jsme celý postup přípravy buněčných vzorků a měření jejich spekter naprosto shodným způsobem.

5.2.2 2.měření

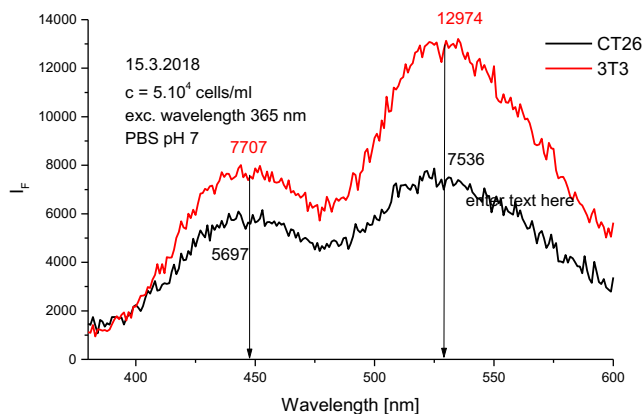
Měření bylo zopakováno 15. 3. 2018. Koncentrace byla upravena na $5 \cdot 10^4$ buněk/ml stejně jako u 1. měření. Naměřená data byla vynesena do grafů na obrázku 20a, 20b a 20c.



Obrázek 20a: Naměřená a normalizovaná emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3

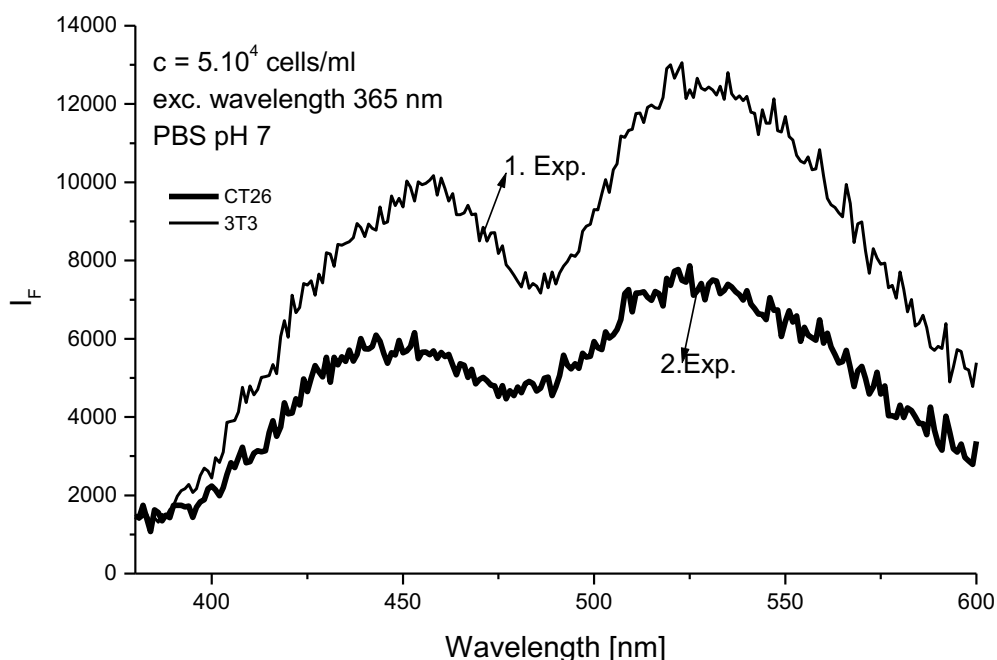


Obrázek 20b: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3



Obrázek 20c: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3

Opakovatelnost v měření spekter bylo dosaženo pouze při excitaci vzorků CT26 a 3T3 na vlnové délce 340 nm. U excitační vlnové délky 260 nm byl pozorován velký rozdíl v intenzitě fluorescence mezi oběma buněčnými liniemi. Po normalizaci spekter se tato spektra překrývají. Rozdíl v intenzitě fluorescence při excitaci na vlnové délce 365 nm je patrné z grafu na obrázku 20c. Liší se i poměr velikosti maxim emise, poměr intenzity $I_F(450 \text{ nm}) : I_F(520 \text{ nm})$ u CT26 je 0,75 a u 3T3 je 0,59. Tyto poměry jsou především pro 3T3 shodné a pro CT26 blízké.

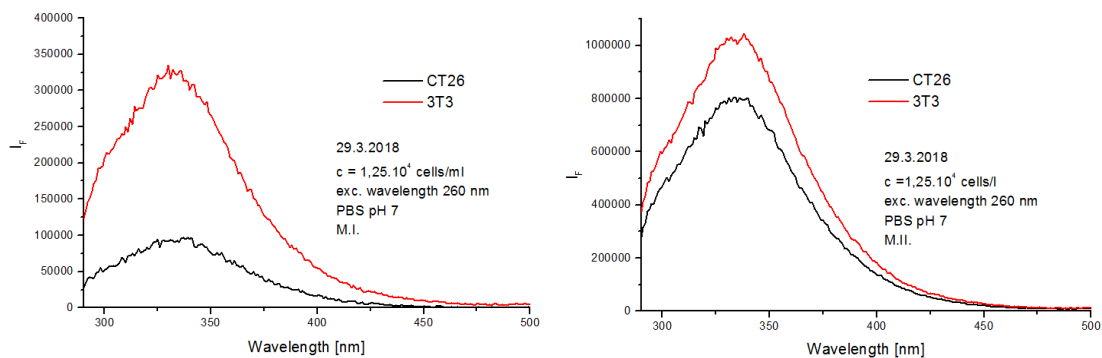


Obrázek 20d: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 ve dne 1.3 a 15.3.2018

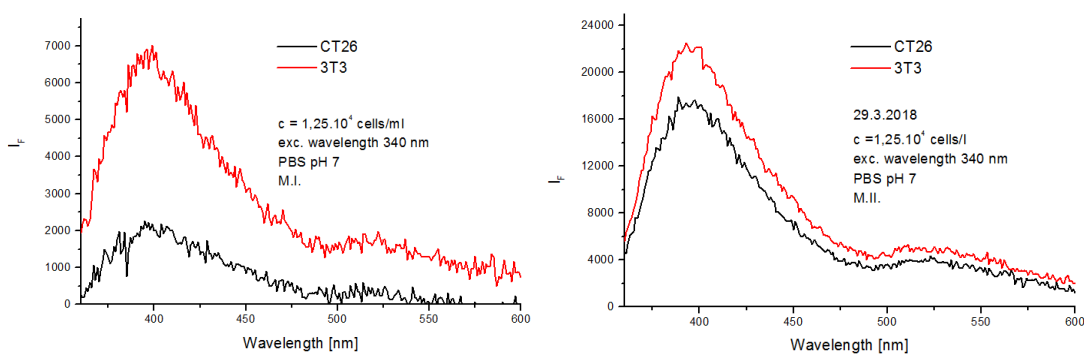
Po diskuzi a hledání vysvětlení, proč nebylo měření reprodukovatelné, bylo zjištěno, že jsou k dispozici dva typy kultivačních medií (viz. kapitola 4.2). To by mohlo být jeden z důvodů vysvětlující rozdíly v naměřené fluorescenci, neboť koncentrace u obou vzorků byla $c = 5 \cdot 10^4$ buněk/ml.

5.2.3 3.měření

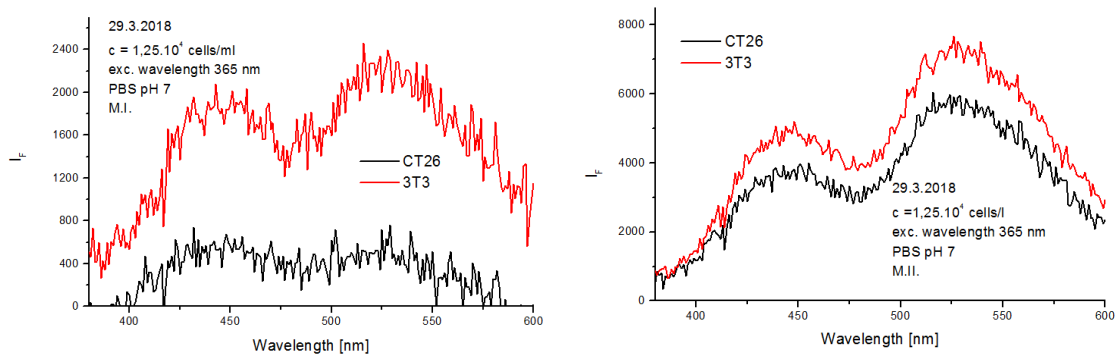
Na základě možného vlivu media byly kultivovány CT26 a 3T3 v M. I. a M. II. Identickými postupy popsány ve kapitole 4.2. Kontrolou kultivované buněčné kultury pod mikroskopem bylo zjištěno, že v mediu M. I. rostly buňky obou typů více než u media II.. Proto byl připraven vzorek obou typů buněk s koncentrací $5 \cdot 10^4$ buněk/ml pouze pro M. I. a koncentrace $1,25 \cdot 10^4$ buněk/ml pro obě media. Postup měření spekter byla pro všechny připravené vzorky identická dle kapitoly 4.2. Výsledky měření jsou zpracovány do grafů uvedených na obrázcích 21a-f.



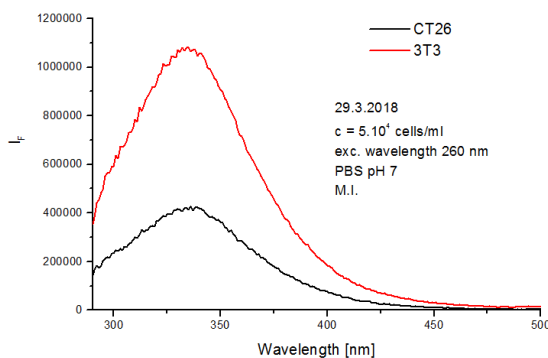
Obrázek 21a: Emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3



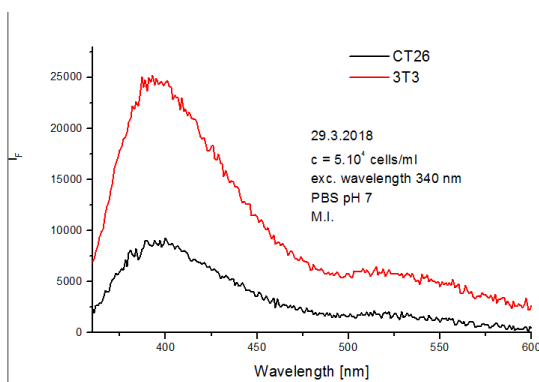
Obrázek 21b: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3



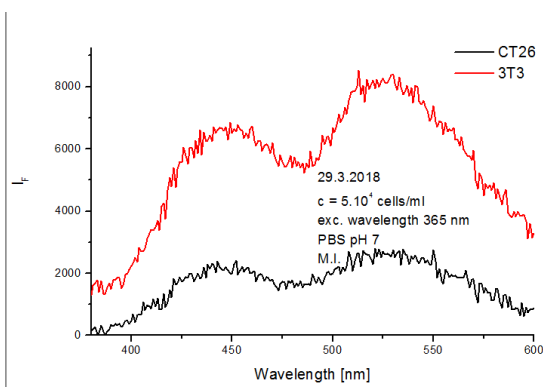
Obrázek 21c: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3



Obrázek 21d: Emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3



Obrázek 21e: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3



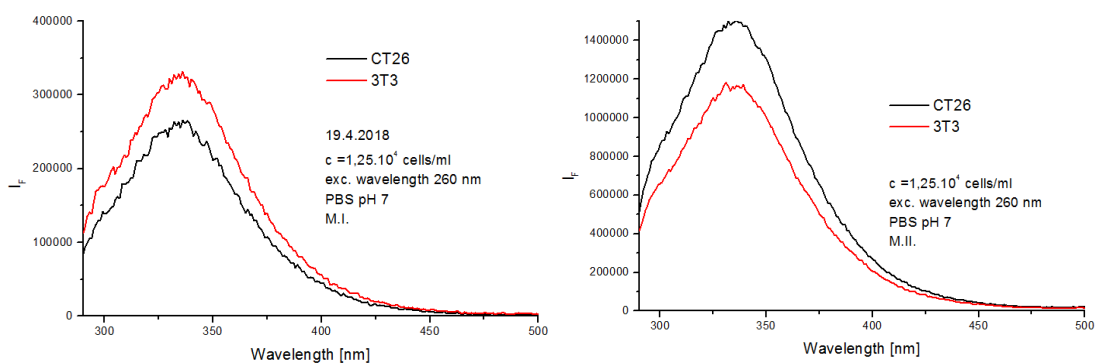
Obrázek 21f: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3

Vliv kultivačního media na růst buněčné linie už bylo pozorován pod mikroskopem. Přestože kultivační medium I. s glutaminem je považováno za lepší prostředí pro obě buněčné linie, při porovnání naměřených emisních spekter CT26 a 3T3 s koncentrací $1,25 \cdot 10^4$ buněk/ml lze konstatovat, že intenzita fluorescence u vzorků kultivovaných v mediu M.II. byla výrazně vyšší než v případě media M.I. Toto zjištění vlivů kultivačních medií na intenzitu fluorescence považujeme za důležitý výsledek který by měl být dále studován.

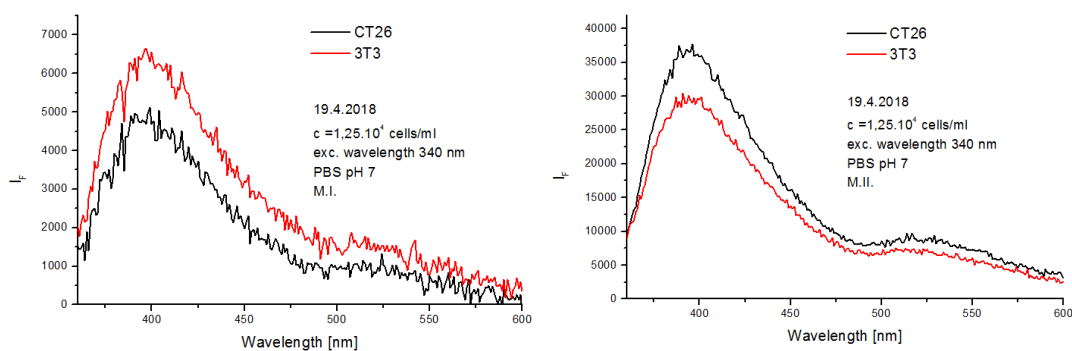
Pro vlnové délky 260 nm a 340 nm se emisní spektra liší v intenzitě fluorescence, ale po normalizaci jsou tato spektra podstatě stejná.

5.2.4 4.měření

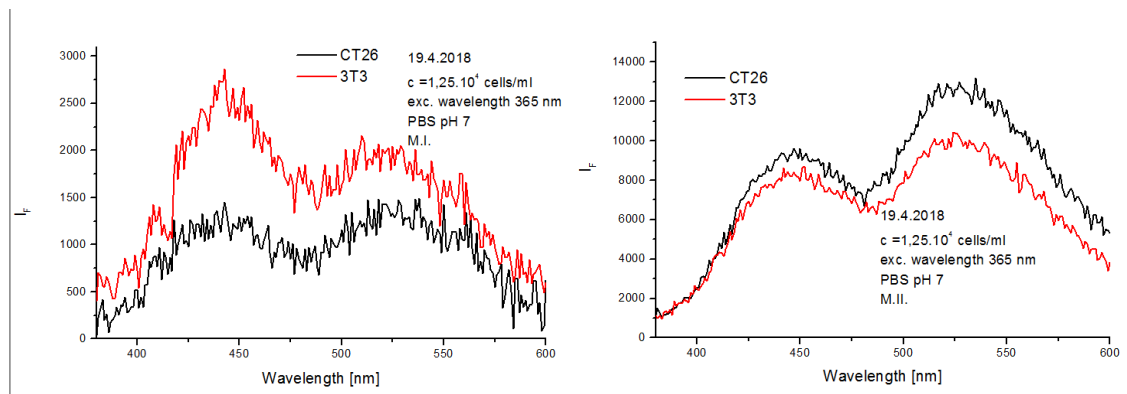
Vzhledem tomu že výsledky měření 1. až 3. nepodávaly reprodukovatelné hodnoty, bylo připraven další experiment 19.4.2018. Pro tento experiment byly připraveny nové vzorky CT26 a 3T3 identickými postupy jako v experimentech 1. až 3. Naměřená data intenzity fluorescence byla zpracovaná do grafů jež jsou uvedeny na obrázcích 22a-f pro stejnou koncentraci $1,25 \cdot 10^4$ buněk/ml.



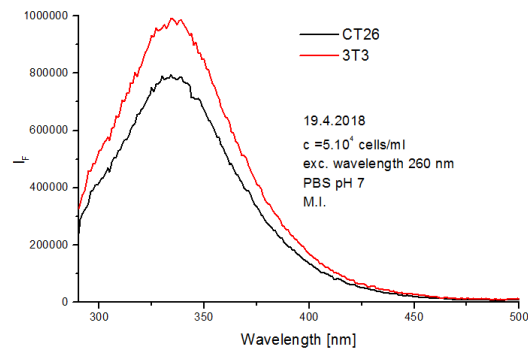
Obrázek 22a: Emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3



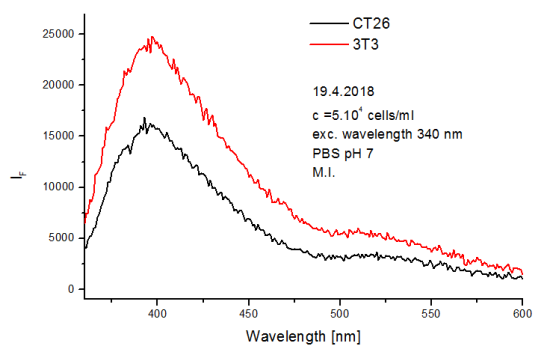
Obrázek 22b: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3



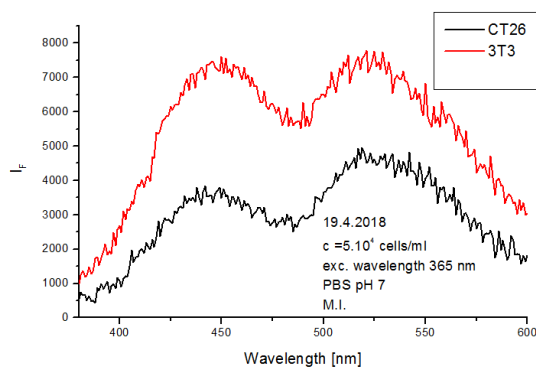
Obrázek 22c: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3



Obrázek 22d: Emisní spektra při excitační vlnové délce 260 nm buněk CT26 a 3T3



Obrázek 22e: Emisní spektra při excitační vlnové délce 340 nm buněk CT26 a 3T3

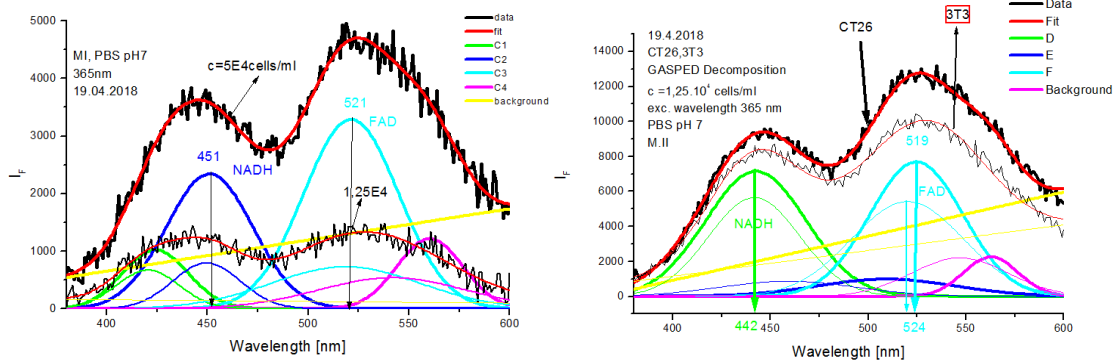


Obrázek 22f: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3

Z výsledků 3. měření a 4. měření jsme mohli vidět, že normalizovaná emisní spektra pro excitační vlnové délky 260 nm a 340 nm se neliší pro CT26 a 3T3 pro M.I a M.II. U M.I. ve 4. měření byla naměřena vyšší intenzita fluorescence u 3T3 než CT26, což je v souladu s výsledkem 3. měření. U M.II. je intenzita fluorescence naopak větší u CT26 což je v souladu s literaturou [34], kde byla měřená koncentrace NADH ve zdravé buňce nižší než v nádorové ale každá byla kultivována v jiném mediu. takové případy měření. Emisní spektra CT26 a 3T3 v M.II jsou kvalitativně shodná s měřením 29.3.2018. Toto se nepotvrdilo u porovnání spekter v M.I. ale nestalo u media I. U 3T3 je intenzita fluorescence prvního píku (kolem 450 nm) vyšší než intenzita fluorescence u druhého píku (kolem 530 nm), což je opačný výsledek oproti tomu z 29.3.2018.

U excitačních vlnových délek 260 nm a 340 nm, jsou rozdíly v normovaných emisních spektrech zanedbatelné, proto byly další experimenty provedené pouze pro excitační vlnovou délku 365 nm.

Výsledky čtyř experimentů neposkytnou relevantní výsledky které by jednoznačně charakterizovali zdravé a nádorové buňky. Proto byl použit program pro dekonvoluci spekter GASpeD (viz. kapitola 4.1) který byl vyvinut pro analýzu emisních spekter plazmy. Z využitím toho programu jsme rozložili naměřená spektra abychom porovnali možné posunu emisních píků odpovídající vlnové délce 460 nm, což je emisní maximum NADH. Příklad rozkladu je na obrázku 22g.

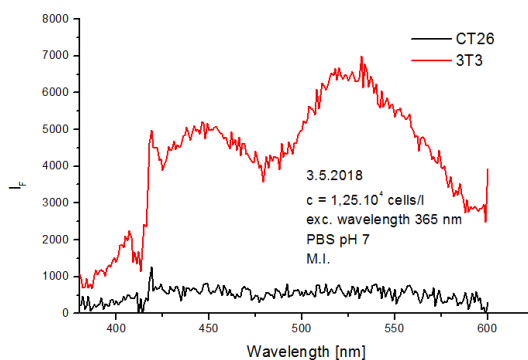


Obrázek 22g: Rozklad emisních spekter CT26 a 3T3 pomocí GASpeD

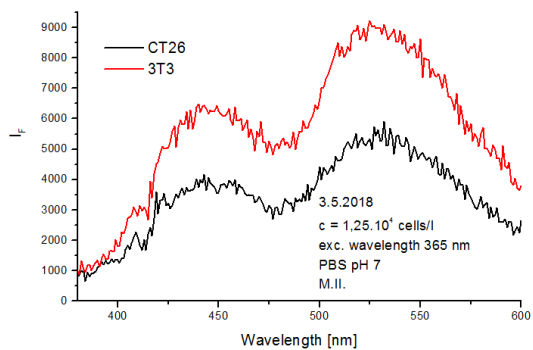
Rozkládaná spektra pomocí GASpeD umožnila identifikovat dva hlavní emisní píky v oblasti 460 nm a 525 nm, které odpovídají emisním maximům NADH a FAD což je v souladu s literaturou [17]. Rozdíly u CT26 a 3T3 byly jen v intenzitě. U píků v oblasti 460 nm nebyly posuny patrné jak u M.I tak M.II, posun cca 5 nm byl u píků v oblasti 525 nm u M.II.

5.2.5 5.měření

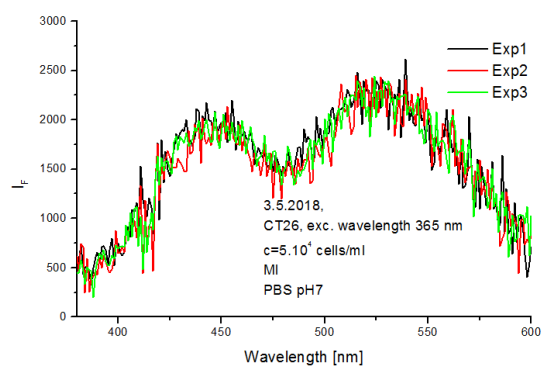
Vzhledem k tomu, že výsledky měření spekter CT26 a 3T3 neprokázali výrazné odlišnosti, které by charakterizovali jednoznačně nádorovou nebo zdravou buňku, bylo přikročeno k měření emisních spekter při změnách metabolických podmínek pouze při excitační vlnové délce 365 nm. Vzorky CT26 a 3T3 byly připraveny identickým postupem jak bylo uvedeno výše. Emisní spektra byla měřena pro připravené vzorky a při změně metabolických podmínek: a) přidáním stejného množství glukózy, b) při odebrání kyslíku - vzorek byl probubláván po dobu jedné minuty čistým dusíkem. Jedno měření emisního spektra v rozsahu 380 až 600 nm trvalo 40 sekund. Měření bylo provedeno u každého vzorků tři krát pro potvrzení reprodukovatelnosti měření. Výsledky jsou na obrázku 23a a 23b.



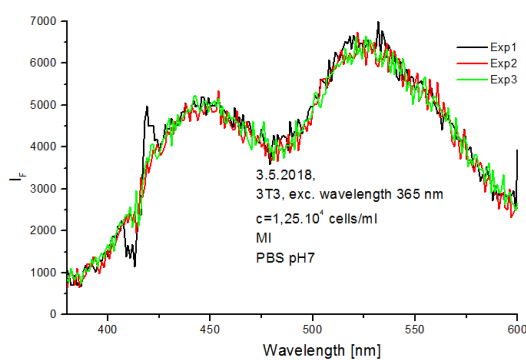
Obrázek 23a: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3



Obrázek 23b: Emisní spektra při excitační vlnové délce 365 nm buněk CT26 a 3T3



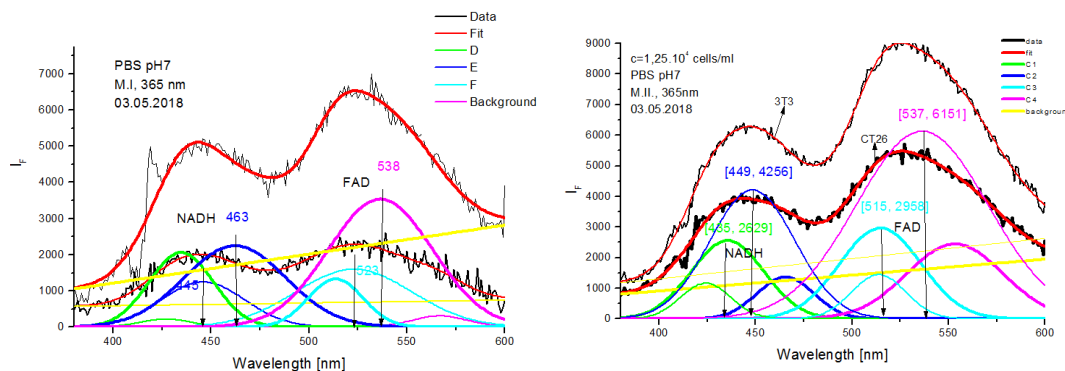
Obrázek 23c: Reprodukovatelnost emisního spektra CT26 při excitační vlnové délce 365 nm



Obrázek 23d: Reprodukovatelnost emisního spektra 3T3 při excitační vlnové délce 365 nm

Výsledky měření uvedených na obrázcích 23c a 23d dokumentují, že během měření k tvorbě agregace a dalším jevům způsobujících zhášení fluorescence.

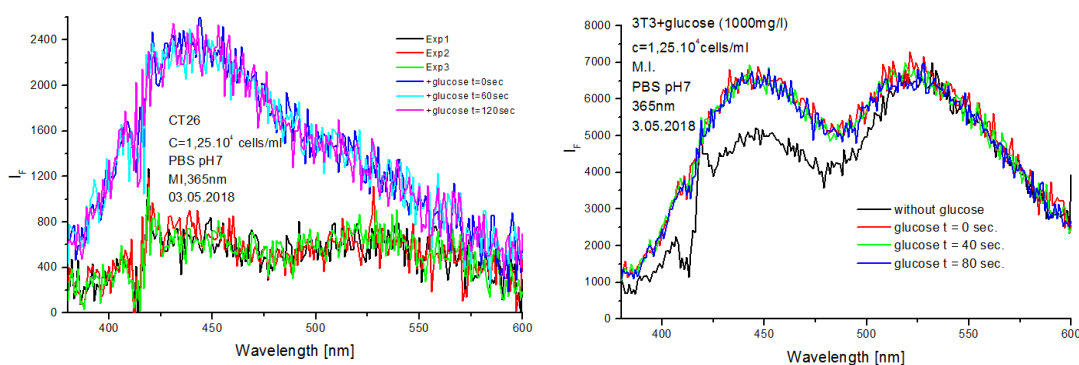
Jako u předchozího měření emisní spektra byla rozložena pomocí softwaru GASpeD.



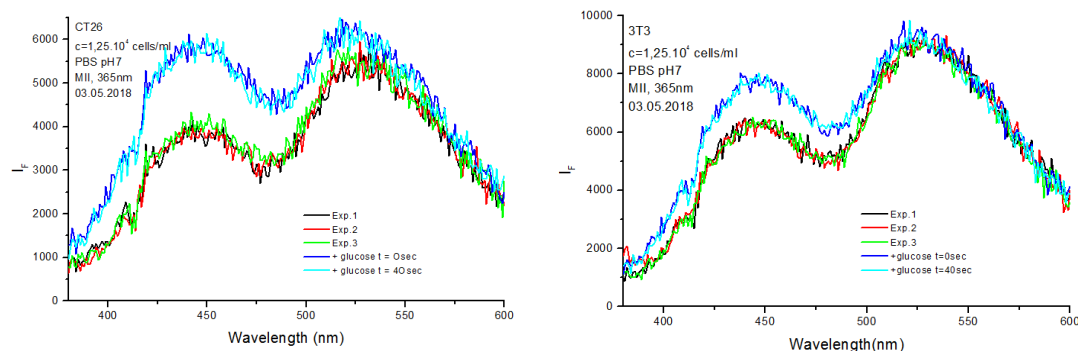
Obrázek 23e: Rozklad emisních spekter CT26 a T3T pomocí GASpeD

Na rozdíl od předchozího měření, rozložení na jednotlivé píky je možné určit posuv těchto hlavních píků na vlnové délce 460 nm a 525 nm o 15 až 20 nm.

Nyní bylo přikročeno ke změně metabolismus buněk přidáním 100 μ l roztoku glukózy glykolýza o koncentrace 100 mg/l do květy ke vzorku. Spektra byla naměřena identickým postupem v daným časových intervalech uvedených v grafech.



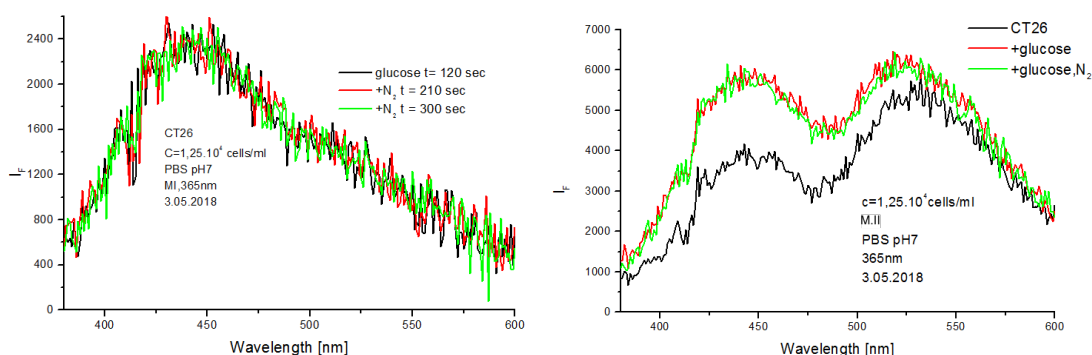
Obrázek 23f: Emisní spektra po podání glukózy



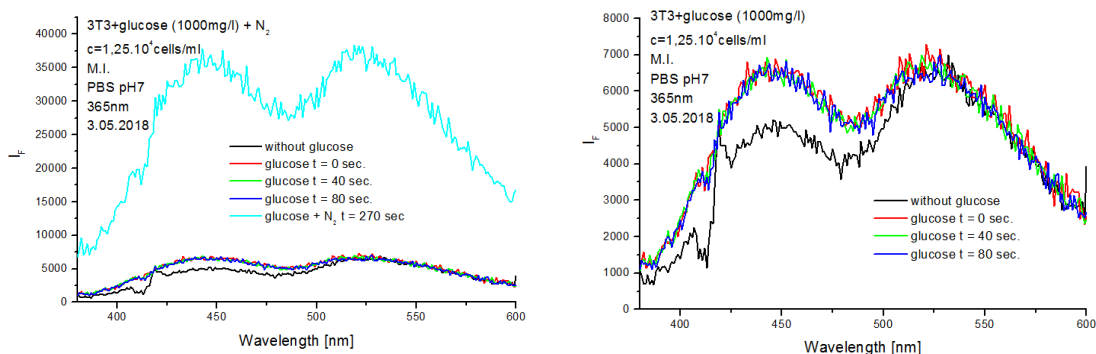
Obrázek 23g: Emisní spektra po podání glukózy

Výsledky jsou uvedeny na obrázku 23f. V průběhu spektrálních závislosti u vzorků bez a s glukózou je patrné výrazné zvýšení intenzity fluorescence v oblasti 460 nm u CT26 i 3T3 a v oblasti 520 nm pouze CT26. U CT26 je toto zvýšení je vyšší než u 3T3, což je v souladu s předpokladem, že při glykolýze dochází k zvýšené tvorbě NADH. Vyšší rozdíl v intenzitě fluorescence u CT 26 než u 3T3, může souviset v rozdílu metabolismu nádorových a zdravých buněk (nádorové buňky mají rychlejší metabolismus a dělí se mnohem rychleji).

Dalším zásahem do metabolismu buněk bylo odebrání kyslíku stávajícím vzorkům probublání dusíkem. Měření spekter byly provedené v časových intervalech uvedených v grafech na obrázku 23h a 23i.



Obrázek 22h: Emisní spektra po probublání roztoku s glukózou dusíkem pro CT26



Obrázek 22i: Emisní spektra po probublání roztoku s glukózou dusíkem pro 3T3

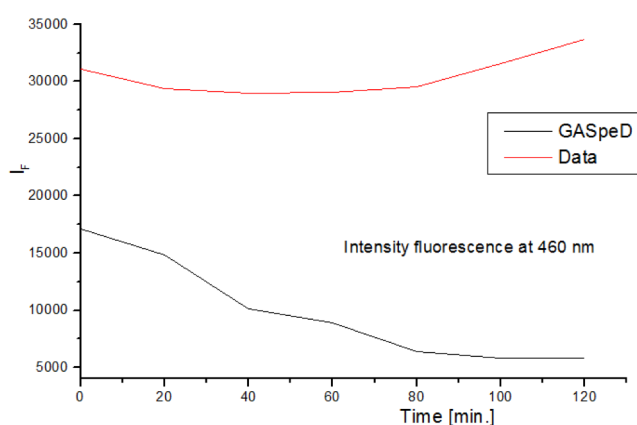
Výrazný vliv odebráním kyslíku byl zaznamenán pouze u vzorku 3T3 v M.I. V ostatních případech se vliv odebrání kyslíku neprojevil. V anaerobním prostředí dochází podle dýchacího řetězce buňky k saturaci NADH, neboť se nemůže oxidovat na NAD^+ , který nevykazuje fluorescenci. Jedno z možného vysvětlení u ostatních vzorků je, doba probublávání dusíkem nebyla dostačující.

5.3 Aplikace na analýzu fluorescenčního spektra při PDT

Výsledky analýzy emisních spekter nádorových buněk byly využity k analýze dat při PDT. Z časových důvodů byly tyto výsledky aplikovány na data, která byla získaná při diplomové práci Bc. Martina Čepy [30].

Naměřená emisní spektra byla provedena na vzorcích buněk CT26 při excitační vlnové délce 350 nm. Současně byly vzorky ozařovány po definovanou dobu zářením o vlnové délce 405 nm.

Naměřená spektra jsme zpracovali a rozložili s programem GASpeD a určili hodnoty fluorescence pro vlnovou délku 460nm. Výsledky jsou uvedeny v grafu na obrázku 23.



Obrázek 24: Závislost intenzity fluorescence na čase pro vlnovou délku 460 nm

Námi zjištěná závislost intenzity fluorescence na vlnové délce 460 nm v závislosti na době ozařování má klesající tendenci podle očekávání. Tato závislost lze vysvětlit poklesem koncentrace NADH. To odpovídá poklesu vitality buněk, a tedy účinnosti PDT.

V grafu jsou zaneseny i přímo měřené hodnoty pro vlnovou délku 460nm, které ale nevykazují pokles, ale naopak došlo k zvýšení intenzity fluorescence. Což by znamenalo, že k emisi přispívají i další biofluorofory, ale přesný důvod se nepodařilo objasnit během experimentu.

6 Diskuse a shrnutí

Měření fluorescence čistých biofluoroforů v kapitole 5.1 je oproti měření s reálnými buňkami opakovatelné kvalitativně i kvantitativně. Získané výsledky měření odpovídaly hodnotám uvedeným v literatuře i našemu očekávání. Dokázali jsme, že vlastnosti emisního spektra nezáleží na excitační vlnové délce (Kashovo pravidlo), protože šířka absorpčního pásu fluoroforů je poměrně široká. Velikost vlnové délky změnila spektrální tvar fluorescenčního spektra pouze kvantitativně ale ne kvalitativně. pH měřeného roztoku má výrazný vliv na fluorescenci. Pro měřené vzorky fluoroforů byla nejnižší dosažená intenzita fluorescence pro pH7 a vliv pH se projevil u všech měřených biofluoroforů, nejméně ale u NADH. Díky těmto dílčím poznatkům o šířce absorpčního pásu, můžeme vybrat vhodnou excitační vlnovou délku, tak že je omezen vliv ostatních biofluoroforů, které by ovlivnily emisní spektrum více při jiné excitační vlnové délce. V našem případě při excitační vlnové délce 365 nm, byl potlačen vliv tryptofanu a pyridoxinu. Emisní spektrum roztoku sledovalo spektrum NADH.

Pro porovnání fluorescenčních spekter, což bylo hlavním cílem práce, byly zvoleny dvě buněčné linie (CT26 a 3T3), které jsou fibroblasty myši. Příprava vzorků byla časově náročná. Kultivace buněk trvala dvou až tří dny a bylo nezbytné měřit okamžitě, byla zachována koncentrace živých buněk. Procesy kultivace a přípravy suspenze byly časově náročné a obtížné, protože všechno se muselo dělat v laminárním boxu, aby se zabránilo kontaminaci buněk. Při prvním opakovaném experimentu byly získány nereprodukovatelné výsledky emisních spekter s prvním měřením. Tím byl zjištěn vliv kultivačního média na emisní spektra buněk. Ne vždy se podařilo úspěšně kultivovat buňky, někdy rostly málo někdy více, proto bylo měření provedeno pouze u media I. U media II, které neobsahuje glutamin, buňky rostly mnohem méně. Všechny postupy při kultivaci a přípravě vzorků buněk byly provedeny naprosto shodně, postup měření byl dodržován stejně, výsledky měření byly kvantitativně odlišné pro stejnou koncentraci, médium a excitační vlnovou délku. U některých měření byly rozdíly mezi CT26 a 3T3 patrné v poloze emisních maxim (první měření), ale u některých měření tyto rozdíly nebyly, pouze ve velikosti intenzity. Byl pozorován velký vliv kultivačního media na buněčné linie. Buňky vyrostly v mediu II. (bez glutaminu) méně, ale vykazovaly zvýšenou intenzitu fluorescence. Při excitační vlnové délce 260 nm a 340 nm byla normovaná spektra u obou buněk téměř shoná, proto vlnová délka 365 nm. Po rozkladu spekter pomocí GASpeD nebyly nalezeny spolehlivé rozdíly (jen malé posuny ve emisním maximu v jednotkách nm).

Jelikož nebyly nalezeny spolehlivé rozdíly v emisních spektrech i po jejich rozložení byly použity v souladu se zadáním DP, další faktory, které mohou ovlivnit emisní spektra buněčných linií a tím je metabolismus buněk. Ten byl ovlivněn přidáním 100 μ l roztoku glukózy o koncentraci 1000 mg/l k vzorku buněk. Po dobrém promíchání byla měřena

emisní spektra stejným postupem jako u všech předchozích experimentů. Výsledky měření ukázaly výrazný nárůst intenzity fluorescence kolem prvního píku (cca 450nm) v obou mediích výraznější u nádorových buněk CT26 než zdravých 3T3. Dá se očekávat, že při přidání glukózy bude intenzita fluorescence růst, jelikož probíhá v buňkách glykolýza, což má za následek zvýšení hladiny NADH (emisní maxima kolem 460 nm).

Dalším způsobem zkoumání metabolismu buněk je odebrání kyslíku buňkám (anaerobní prostředí) probubláním dusíkem. Výsledky měření bohužel odpovídaly očekávání jen u jednoho případu, tj. u 3T3, který byl kultivovaný v kultivačním mediu I. U ostatních případů při odebrání kyslíku nevykazovaly téměř žádný rozdíl od emisních spekter po podání glukózy. V anaerobním prostředí podle dýchacího řetězce byl očekáván velký skok, protože se hromadí NADH (saturace). Bez kyslíku NADH nemůže oxidovat na NAD^+ , který nevykazuje fluorescenci. Domníváme se, že doba při odebrání kyslíku buňkám nebyla dostatečně dlouhá.

Na konec byl aplikován software GASpeD na naměřená data emisních spekter CT26 s přidáním PpIX po dlouhé době osvitů diodou o vlnové délce 405 nm. Z takto získaného rozkladu byly vybrány intenzity fluorescence na vybraných vlnových délkách. Vybrali jsme hodnotu fluorescence na vlnové délce 460 nm. Zjištěná závislost intenzity fluorescence na době osvitů měla očekávaný pokles, který lze interpretovat poklesem koncentrace NADH a tedy i poklesem CT26.

7 Závěr

Práce byla zaměřena na porovnání fluorescenčních spekter zdravých a nádorových buněčných kultur při excitačních vlnových délkách 260 nm, 340 nm a 365 nm. Měření byla postupně prováděna na pěti vždy znovu kultivovaných buněčných kulturách zdravých a nádorových buněk. Rozdíly v emisních spektrech byly v některých případech (1. a 5. měření), u ale ne vždy. I při stejných postupech kultivace, přípravě vzorků a měření, byly rozdíly ve spektrech 3T3 a vždy pouze v intenzitě fluorescence a poměru velikosti maxim emise pro vlnové délky okolo 460nm a 520nm. S využitím programu GASpeD na rozklad spekter se podařilo najít některé posuny píku ve vlnových délkách až deset nanometrů v případě (5. měření) nikoliv ale u každého spektra. Ukázali jsme, jak velký vliv má typ kultivačního media na růst buněk a na velikost intenzitu fluorescence. Znamená to, že i když jsou buňky stejného typu (genotypově), pokud ale vyrostly v jiném prostředí, fenotypově nemusí být úplně totožné, mohou se lišit v svém metabolismu. To bylo prokázáno porovnáním emisních spekter vzorků s glukózou v aerobní a anaerobní prostředí. Nádorové buňky mají rychlejší metabolismus, proto po podání stejného množství glukózy se vytvořilo více NADH a intenzita fluorescence v okolí vlnové délky 460 nm, se výrazněji zvýšila než v případě zdravé buňky. Bohužel v anaerobní prostředí se výsledky experimentu nepodařilo potvrdit se 100% platností. Jednou z možných důvodů je doba při procesu zbavení se kyslíku z buněčné suspenze. Doba 1 minuty probublávání vzorku dusíkem byla krátká.

V této práci jsou uvedené výsledky měření získané do 3.5.2018. Pokračování v řešené problematice je perspektivní v porovnávání emisních spekter na metabolické úrovni, jak ukázaly první experimenty, neboť přestože zdravé a nádorové buňky pocházející ze stejného typu, fenotypově se mohou lišit (rychlosti metabolismus, schopnosti reagovat při změně prostředí...).

V závěru mohu konstatovat, že bylo zadání diplomové práce splněno

Seznam literatury

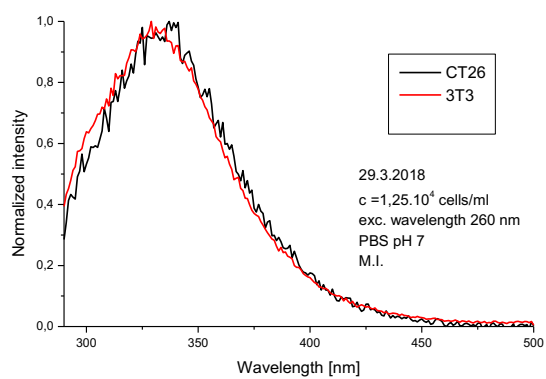
- [1] O. Podrazky: Monitoring environmental influences on model cultures of microorganisms using optical methods. Praha, 2002. Dissertation. University of Chemical Technology
- [2] Wadhvani KC, Rapoport SI, Shepherd AP, Oberg PA (1990) Blood flow in the central and peripheral nervous systems. In: Shepherd AP, Oberg PA (eds) *Laser Doppler blood flowmetry*, vol 107. Kluwer, Boston, pp 265-304
- [3] Meilin S, Rogatsky GG, Zarchin N, Guggenheimer-Furman E, Mayevsky A (1996) Effects of carbon monoxide exposure on the brain may be mediated by nitric oxide. *J Appl Physiol* 81:1078-1083
- [4] Meilin S, Rogatsky GG, Zarchin N, Guggenheimer-Furman E, Mayevsky A (1996) Effects of carbon monoxide exposure on the brain may be mediated by nitric oxide. *J Appl Physiol* 81:1078-1083
- [5] Mayevsky A, Nioka S, Wang DJ, Chance B (1997) The functioning gerbil brain in vivo. Correlation between P-NMR spectroscopy and the multiparametric monitoring approach. *Adv Exp Med Biol* 411:41-53
- [6] Chance B, Cohen P, Jobsis F, Schoener B (1962) Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* 137:499-508
- [7] Yoles E, Zarchin N, Mayevsky A (1991) Effects of age on brain metabolic ionic and electrical response to anoxia in the newborn dog in vivo. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2:297-313
- [8] Meilin S, Rogatsky GG, Zarchin N, Mayevsky A (1999) Inter-relation between hemodynamic, metabolic, ionic and electrical activities during ischemia and reperfusion in the gerbil brain. *Neurol Res* 21(7):699-704.
- [9] MAYEVSKY, Avraham. *Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH Fluorescence*. New York, NY: Springer Science+Business Media, 2015. ISBN 978-3-319-16681-0.
- [10] YANG P, WUABO W, VUANLONG Y, ALFANO R. Cancer detection using Stokes shift spectroscopy. *Laser Focus World* [serial online]. September 2013;49(9):59-62. Available from: Academic Search Complete, Ipswich, MA. Accessed May 17, 2018.
- [11] Dzyubachyk O, van Cappellen W, Essers J, Niessen W, Meijering E. Advanced Level-Set-Based Cell Tracking in Time-Lapse Fluorescence

- Microscopy. *IEEE Transactions On Medical Imaging* [serial online]. March 2010;29(3):852-867. Available from: Business Source Complete, Ipswich, MA. Accessed May 17, 2018.
- [12] Fluorescence Microscopy Imaging System. (cover story). *Laboratory Equipment* [serial online]. March 15, 2000;36(13):1. Available from: Business Source Complete, Ipswich, MA. Accessed May 17, 2018.
- [13] Gou X, Han H, Hu S, Leung A, Sun D. Applying Combined Optical Tweezers and Fluorescence Microscopy Technologies to Manipulate Cell Adhesions for Cell-to-Cell Interaction Study. *IEEE Transactions On Biomedical Engineering* [serial online]. August 2013;60(8):2308-2315. Available from: Business Source Complete, Ipswich, MA. Accessed May 17, 2018.
- [14] Ross S. Acquiring Cell Image Data Using Automated Microscopy. *Scientific Computing & Instrumentation* [serial online]. March 2005;22(4):16-17. Available from: Business Source Complete, Ipswich, MA. Accessed May 17, 2018.
- [15] Croce, A.C., and G. Bottiroli. "Autofluorescence Spectroscopy and Imaging: A Tool for Biomedical Research and Diagnosis." *European Journal of Histochemistry : EJH* 58.4 (2014): 2461. PMC. Web. 17 May 2018.
- [16] M. AlSalhi, Ph.D. a V. Masilamani, Ph.D. Detection of Cancer by Optical Analysis of Body Fluids – A Single Blind Study. *Technology in Cancer Research and Treatment*. 2011, **2011**(10), 8. ISSN ISSN 1533-0346.
- [17] LAKOWICZ, Joseph R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, ed. 3rd, Berlin/Heidelberg: Springer, 2006, 954 s., ISBN 978-0387312781
- [18] Voet, D. J.; J. G. Biochemistry, 4th ed.; John Wiley & Son, Inc.: United States of America, 2011; pp 823-870
- [19] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1416-8.
- [20] *Buněčné dýchání* [online]. [cit. 2018-05-17]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Buněčné_dýchání%C3%AD
- [21] Szudy J, ed. 1998. Born 100 years ago: Alexander Jablonski (1898-1980), Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Torun, Poland.
- [22] Acta Physica Polonica. 1978 Polska Akademia Nauk Instytut Fizyki. Europhys J, Vol. A 65(6).

- [23] Stokes GG. 1852. On the change of refrangibility of light. *Phil Trans R Soc (London)* 142:463-562.
- [24] Kasha M. 1950. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Disc faraday Soc* 9:14-19.
- [25] Demchenko AP. 1981. *Ultraviolet spectroscopy of proteins*. Springer-Verlag, New York.
- [26] Longworth JW. 1971. Luminescence of polypeptides and proteins. In *Excited states of proteins and nucleic acids*, pp. 319-484. Ed RF Steiner, I Welnryb, Plenum, New York.
- [27] Permyakov EA. 1993. *Luminescent spectroscopy of proteins*. CRC Press, London.
- [28] Visser AJWG. 1984. Kinetics of stacking interactions in Flavin adenine dinucleotide from time-resolved Flavin fluorescence. *Photochem Photobiol* 40(6): 703-706.
- [29] Benson RC, Meyer RA, Zaruba ME, McKhann GM. 1979. Cellular autofluorescence: is it due to flavins? *J Histochem Cytochem* 27(1):44-48.
- [30] Čepa M., Měření fluorescence NADH ns buněčných kulturách při fotodynamické terapii, 2014, Diplomová práce
- [31] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Přeložil Arnošt KOTYK, přeložil Bohumil BOUZEK, přeložil Pavel HOZÁK. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902-9062-0.
- [32] POLLAK, Nadine, Christian DÖLLE a Mathias ZIEGLER. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochemical Journal* [online]. 2007, **402**(2), 205-218 [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.1042/BJ20061638. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20061638>
- [33] KASIMOVA, M. R. The Free NADH Concentration Is Kept Constant in Plant Mitochondria under Different Metabolic Conditions. *THE PLANT CELL ONLINE* [online]. 2006, **18**(3), 688-698 [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.1105/tpc.105.039354. ISSN 1040-4651. Dostupné z: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.105.039354>
- [34] Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level [online]. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <http://www.differencebetween.net/science/difference-between-nad-and-fad/>

- [35] *Difference Between NADH and FADH2* [online]. [cit. 2018-05-17].
Dostupné z: <https://www.differencebetween.com/difference-between-nadh-and-vs-fadh2/>
- [36] PATTERSON, G. H., S. M. KNOBEL, P. ARKHAMMAR, O. THASTRUP a D. W. PISTON. Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2000, **97**(10), 5203-5207 [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.1073/pnas.090098797. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.090098797>
- [37] CT26.WT ATCC® CRL-2638™ Mus musculus colon carcinoma. *ATCC: The Global Bioresource Center* [online katalog]. b.r. [cit. 2018-05-01]. Dostupné z: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2638.aspx?geo_country=cz
- [38] NIH/3T3 ATCC® CRL-1658™. *ATCC: The Global Bioresource Center* [online katalog]. b.r. [cit. 2018-05-01]. Dostupné z: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1658.aspx?geo_country=cz
- [39] FluoroMax®-4 & FluoroMax®-4P with USB: Operation manual Part number 810005 version B. HORIBA. 2009, 236 s.
- [40] RNDr. Jaroslav Teda, Ph.D.: Genetické algoritmy a jejich aplikace v praxi
- [41] Adámek P., Application of Genetic Algorithms to Analysis of High-parameter Plasma, 2003, diplomová práce
- [42] *Stanovení počtu erytrocytů v jednotce objemu krve* [online]. [cit. 2018-05-17]. Dostupné z: <http://www.lfp.cuni.cz/patofyziologie/materialy/krev/pocitani.htm>
- [43] Yu, Q., Proia, M., Heikal, A.A. Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009, **2009**(95), 46-57.

Příloha



Obrázek 25: Normovaná emisní spektra buněčné linie CT26 a 3T3

