



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  

---

**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra přírodovědných oborů**

**Analýza fluorescenčních spekter zdravých  
buněk v závislosti na koncentraci  
nádorových buněk, pH a teploty prostředí**

**Analyse of fluorescence spectra of healthy  
cells as a function of carcinoma cell  
concentration, pH and temperature  
environment**

Diplomová práce

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

Autor diplomové práce: Bc. Jan Svoboda  
Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Marie Pospíšilová, CSc.

---

**Kladno 2021**

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Svoboda** Jméno: **Jan** Osobní číslo: **465486**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra přírodovědných oborů**  
Studijní program: **Biomedicínská a klinická technika**  
Studijní obor: **Přístroje a metody pro biomedicínu**

## II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

**Analýza fluorescenčních spekter zdravých buněk v závislosti na koncentraci nádorových buněk, pH a teploty prostředí**

Název diplomové práce anglicky:

**Analyse of fluorescence spectra of healthy cells as a function of carcinoma cell concentration, pH and temperature environment**

Pokyny pro vypracování:

Zadání: Na vzorcích zdravých a nádorových buněk kultivovaných stejným způsobem analyzujte fluorescenční spektra zdravých buněk v rozsahu vlnových délek 400nm - 700nm při excitaci vln. délkou 365nm a 490-750nm při excitaci 460nm pro pH 6,5 a 7 a laboratorní teplotě a teplotě 370 C, při zvolené koncentraci nádorových buněk. K měření fluorescenčních spekter připravených vzorků použijte „Fluoromax 4“, k jejich analýze program GASpeD. Diskutujte, jak mohou být výsledky využity pro návrh vláknového senzoru pro detekci nádorových buněk

Seznam doporučené literatury:

- [1] Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, ed. 3, Springer, 2006, 954 s., ISBN 9780387312781
- [2] Adáček P., Application of Genetic Algorithms to Analysis of High-parameter Plasma, 2003, Diplomová práce
- [3] SIO R., Pospíšilová M., Kučera P., Turňová J., Comparison of fluorescence spectra of healthy and carcinoma cell cultures, IMBM FBME CTU, Conference Proceedings, 2018
- [4] Mierke C. T., Physics of Cancer, ed. 1, IOP Publishing, Inc., 2015, ISBN DOI 10.1088/978-0-7503-1134-2
- [5] Adáček P., Pospíšilová M., Turňová J., Influence of pH environment on fluorescence spectra of samples of healthy and carcinoma cell cultures, IMBM Conference Proceedings, 2019, pp.23-27 s.

Jméno a příjmení vedoucí(ho) diplomové práce:

**doc. Ing. Marie Pospíšilová, CSc.**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) diplomové práce:

**Ing. Hana Kalábová**

Datum zadání diplomové práce: **19.05.2021**

Platnost zadání diplomové práce: **18.09.2022**

.....  
prof. RNDr. MUDr. Petr Maršálek, Ph.D.  
podpis vedoucí(ho) katedry

.....  
prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA  
podpis děkana(ky)

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Analýza fluorescenčních spekter zdravých buněk v závislosti na koncentraci nádorových buněk, pH a teploty prostředí“ 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 24. 5. 2021

.....

Jméno autora vč. titulů

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval doc. Ing. Marii Pospíšilové CSc. za její skvělé vedení, rady a pomoc při tvorbě této diplomové práce. Chtěl bych také poděkovat Ing. Haně Kalábové za její pomoc v laboratoři nejen při kultivaci buněk. Nakonec bych chtěl poděkovat za podporu v rámci SGS21/083/OHK4/1T/17.

## **ABSTRAKT**

### **Analýza fluorescenčních spekter zdravých buněk v závislosti na koncentraci nádorových buněk, pH a teploty prostředí**

Nádorová onemocnění patří mezi časté příčiny úmrtí po celém světě. Pro jejich účinnou léčbu je nutná raná detekce onemocnění. Tato práce se zabývá možností detekce nádorových buněk porovnáním fluorescenčních spekter biofluoroforů NADH (volné a vázané na proteiny), FAD a LR zdravých buněk 3T3, nádorových buněk CT26 a nádorových buněk SNU475 a směsí buněk 3T3 a CT26 v rozmezí koncentrací 100 % 3T3 a 0 % CT26 až 0 % 3T3 a 100 % CT26. Fluorescenční spektra byla měřena za laboratorní teploty a teploty 37 °C při normálním pH 7,2 a sníženém pH 6,2, a při excitaci 365 a 460 nm v rozsahu 400 – 700 nm. Fluorescenční spektra jsou rozložena a analyzována programem GASpeD, který je založen na genetickém algoritmu. Tento program rozkládá spektra na příspěvky od jednotlivých biofluoroforů, dle literatury, obsažených v buňce. Je ukázáno, že zastoupení obou forem NADH, volného a vázaného NADH, a vlnové délky jejich maximálních intenzit jsou odlišné pro zdravé a nádorové buňky a jsou ovlivněny teplotou a pH prostředí.

Cílem práce je dokázat, že je možné rozlišit nádorové buňky na základě jejich fluorescenčních spekter od buněk zdravých, a že je možné detekovat přítomnost nádorových buněk i ve směsi zdravých a nádorových buněk 3T3 a CT26. Také je cílem dokázat možnost využití této metody na jiném typu nádorové buňky. Pro srovnání jsou uvedeny výsledky měření na nádorových buňkách SNU475. Z výsledků plyne, že z rozložených fluorescenčních spekter buněk je možné rozlišit nádorové a zdravé buňky, a to jak u čistých vzorků buněk, tak u jejich směsi a při rozdílných teplotách a pH.

### **Klíčová slova**

Fluorescence buněk, NADH, FAD, GASpeD

## **ABSTRACT**

### **Analyse of fluorescence spectra of healthy cells as a function of carcinoma cell concentration, pH and temperature environment**

Cancer disease belongs among common causes of death all along the world. For their effective treatment an early detection of the disease is necessary. This study focuses on the option of detecting the cancerous cells by comparing the fluorescence spectra of biofluorofores NADH (free and bound), FAD and LR in healthy cells 3T3, cancerous cells CT26 and cancerous cells SNU475 and in mixture of 3T3 and CT26 cells in concentrations ranging from 100 % 3T3 and 0 % CT26 to 0 % 3T3 and 100 % CT26. Fluorescence spectra are measured at laboratory temperature and at 37 °C in normal pH of 7,2 and low pH of 6,2 with excitation of 365 and 460 nm in ranges between 400 – 700 nm. Fluorescence spectra are analyzed with software GASpeD, which is based on genetic algorithm. This software breaks down the spectra into contributions of specific biofluorofores of the cells according to literature. It is shown that the presence of both free and bound NADH and the position of their fluorescences' maximum intensities are different for healthy and cancerous cells and change based on temperature and pH of the environment.

The point of this study is to prove the possibility of distinguishing cancerous cells on the basis of their fluorescence spectra from healthy cells and the possibility of detecting presence of cancerous cells in a mix of healthy and cancerous cells 3T3 and CT26. The point is also to prove the feasibility of using this method on a different kind of cancerous cells, for which are used SNU475. The results show that there is a possibility to distinguish healthy and cancerous cells based on broken down spectra of their fluorescence for both pure cells and for their mixtures and at different temperatures and pH.

### **Keywords**

Cell fluorescence, NADH, FAD, GASpeD

# Obsah

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Úvod</b> .....  | <b>9</b>  |
| 1.1      | Přehled současného stavu .....   | 10        |
| 1.1.1    | Buněčné procesy .....  | 10        |
| 1.1.2    | Změny metabolismu nádorových buněk .....   | 13        |
| 1.1.3    | Biofluorofory v buňkách .....  | 14        |
| 1.1.4    | Fluorescence .....   | 18        |
| 1.2      | Cíle práce .....   | 21        |
| <b>2</b> | <b>Metody a materiál</b> .....   | <b>22</b> |
| 2.1      | Buňky vybrané pro měření .....   | 22        |
| 2.2      | Chemikálie pro kultivaci a měření .....  | 24        |
| 2.3      | Kultivace buněk .....  | 25        |
| 2.4      | Určení koncentrace buněk v Bürkerově komůrce .....   | 27        |
| 2.5      | Postup měření .....  | 28        |
| 2.6      | Fluorescenční spektrometr FluoroMax 4 .....  | 28        |
| 2.7      | Postup měření fluorescence 3T3 jako funkce koncentrace CT26 .....                                    | 31        |
| 2.8      | Zpracování dat a GASpeD .....  | 33        |
| <b>3</b> | <b>Výsledky</b> .....  | <b>34</b> |
| 3.1      | Fluorescenční spektra 3T3, CT26 a SNU475 a jejich rozklad na příspěvky jednotlivých fluoroforů ..... | 34        |
| 3.1.1    | Fluorescenční spektra při pH 7,2 a laboratorní teplotě .....   | 34        |
| 3.1.2    | Fluorescenční spektra při pH 6,2 a laboratorní teplotě .....   | 37        |
| 3.1.3    | Fluorescenční spektra při pH 7,2 a teplotě 37 °C .....   | 40        |
| 3.1.4    | Fluorescenční spektra při pH 6,2 a teplotě 37 °C .....   | 43        |
| 3.2      | Porovnání emisních spekter 3T3, CT26 a SNU475 při stejných podmínkách .....                          | 46        |
| 3.2.1    | Porovnání spekter při pH 7,2 a laboratorní teplotě .....   | 47        |
| 3.2.2    | Porovnání spekter při pH 6,2 a laboratorní teplotě .....   | 48        |
| 3.2.3    | Porovnání spekter při pH 7,2 a teplotě 37 °C .....   | 49        |
| 3.2.4    | Porovnání spekter při pH 6,2 a teplotě 37 °C .....   | 50        |
| 3.3      | Porovnání emisních spekter 3T3, CT26 a SNU475 při různých pH a různých teplotách .....               | 51        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.3.1    | Porovnání fluorescenčních spekter 3T3 při různých podmínkách .....    | 51        |
| 3.3.2    | Porovnání fluorescenčních spekter CT26 při různých podmínkách...      | 52        |
| 3.3.3    | Porovnání fluorescenčních spekter SNU475 při různých podmínkách<br>53 |           |
| 3.4      | Průběh změny fluorescence v koncentrační řadě roztoků 3T3 a CT26..... | 54        |
| <b>4</b> | <b>Diskuse .....</b>  | <b>59</b> |
| <b>5</b> | <b>Závěr .....</b>  | <b>62</b> |
|          | <b>Seznam použité literatury .....</b>                                | <b>63</b> |



# 1 Úvod

Rakovinná onemocnění patří celosvětově mezi nejvýznamnější smrtelná onemocnění a jejich četnost se stále zvyšuje. Jedná se o skryté a často bezpříznakové onemocnění, které ale v případě pozdního odhalení může být o to nebezpečnější. Proto je nutné kromě samotných léčebných postupů zdokonalovat také diagnostické metody, aby bylo možné nádorové buňky odhalit v pokud možno raném stádiu rakoviny a zvýšit tak šance na přežití pacienta. Prvotním krokem je zjištění na podezření nádoru. Tím může být odhalení bulky či jiného nepřírozeného útvaru pod kůží, nebo změna fyziologických projevů způsobená přítomností nádoru ve specifické tkáni či orgánu. V okamžiku podezření se pak přítomnost nádorového onemocnění ověřuje využitím zobrazovacích technik, od rentgenu, přes výpočetní tomografii a magnetickou rezonanci, až k pozitronové emisní tomografii. Po odhalení místa nádoru je pak potřeba provést biopsii nálezu a cytologicky in vitro stanovit, zda se jedná o rakovinné buňky. [1]

Takováto vyšetření jsou časově i finančně náročná a v případě biopsie i invazivní. Proto je cílem této práce nalezení alternativního způsobu zjišťování přítomnosti rakovinných buněk ve tkáni, přímo v těle pacienta analýzou fluorescenčních spekter biofluoroforů, obsažených v buňce. Pro tuto detekci se jeví jako ideální využití přirozených biofluoroforů buněk. Tyto biofluorofory mají specifické emisní píky, které se v různých druzích buněk nemění. Pro tuto práci významné biofluorofory jsou převážně o látky související se základními funkcemi buňky - dýchacím řetězcem. Z předchozí práce [1] a literatury [5] vyplývá, jaké jsou ideální excitační vlnové délky pro excitaci právě těchto biofluoroforů, mezi něž patří především NADH. Tato látka je jedním z hlavních účastníků buněčného dýchání a vykazuje fluorescenci i bez navázání markerů. Zastoupení její volné formy a její formy vázané na proteiny se liší mezi zdravými a nádorovými buňkami, což je pro tuto práci klíčové. Mezi stávající metody detekce těchto forem patří zejména měření trvání jejich fluorescence (FLIM), jelikož forma vázaná na proteiny má vyšší dobu života. [2-7]

Tato práce ověřuje možnost detekce fluorescenčních spekter vybraných zdravých buněk 3T3 a rakovinných buněk CT26 a SNU475 pomocí rozkladu celkového spektra fluorescence těchto buněk programem GASpeD na příspěvky jednotlivých biofluoroforů. Tyto buňky jsou měřeny ve fyziologickém pH 7,2 a ve sníženém pH 6,2 a ve fyziologické teplotě 37 °C a laboratorní teplotě. Zvolené excitační vlnové délky byly 365nm a 460 nm a rozsah měření FS 400nm – 700nm, které byly zvoleny na základě výsledků předchozí práce a literatury [1-7]. Měřené vzorky buněk byly ve formě suspenze. Kromě samotných buněk 3T3 a CT26 byly proměřeny také jejich směsi v různých koncentracích. Kromě myších buněk 3T3 a CT26 byla proměřena fluorescenční spektra i pro lidské rakovinné buňky SNU475 a stejně jako pro předchozí buňky byla tato spektra rozložena na příspěvky jednotlivých biofluoroforů a vyhodnocena. Z výsledných rozkladů

fluorescenčních spekter jsou provedeny závěry této práce a porovnány s dosud známými poznatky o obsahu volného a vázaného NADH ve zdravých a nádorových buňkách uvedených v literatuře.

Práce je rozdělena do 5 kapitol.

V kapitole 1 jsou uvedeny informace o buněčných procesech, jichž se biofluorofory NADH a FAD účastní, popsané Krebsovým cyklem a dýchacím řetězcem. Dále jsou popsány změny buňky při nádorovém bujení a popis vlastností biofluoroforů NADH a FAD. Nakonec jsou uvedeny základní principy fluorescence, jako nástroje pro charakterizaci zdravých a nádorových buněk.

V kapitole 2 je uveden souhrn použitých buněk 3T3, CT26 a SNU475, použité chemikálie využité při měření a kultivaci buněk. Popsán je způsob kultivace a přípravy vzorku ve formě buněčné suspenze pro měření, postup měření a způsob zpracování dat – jejich korekce a rozklad v programu GASpeD.

V kapitole 3 jsou uvedeny výsledky měření fluorescenčních spekter vzorků ve formě grafů. Ve výsledcích jsou grafy rozložených spekter čistých buněčných suspenzí 3T3, CT26 a SNU475 při teplotě laboratorní a 37<sup>0</sup>C a pH 7,2 a pH 6,2, grafy porovnávající buňky 3T3, CT26 a SNU475 za stejných podmínek, grafy porovnávající jeden typ buňky za různých podmínek teploty a pH prostředí a nakonec koncentrační řada porovnávající změny rozloženého spektra buněk 3T3 a CT26 při postupném navýšení koncentrace CT26 ve vzorku 3T3.

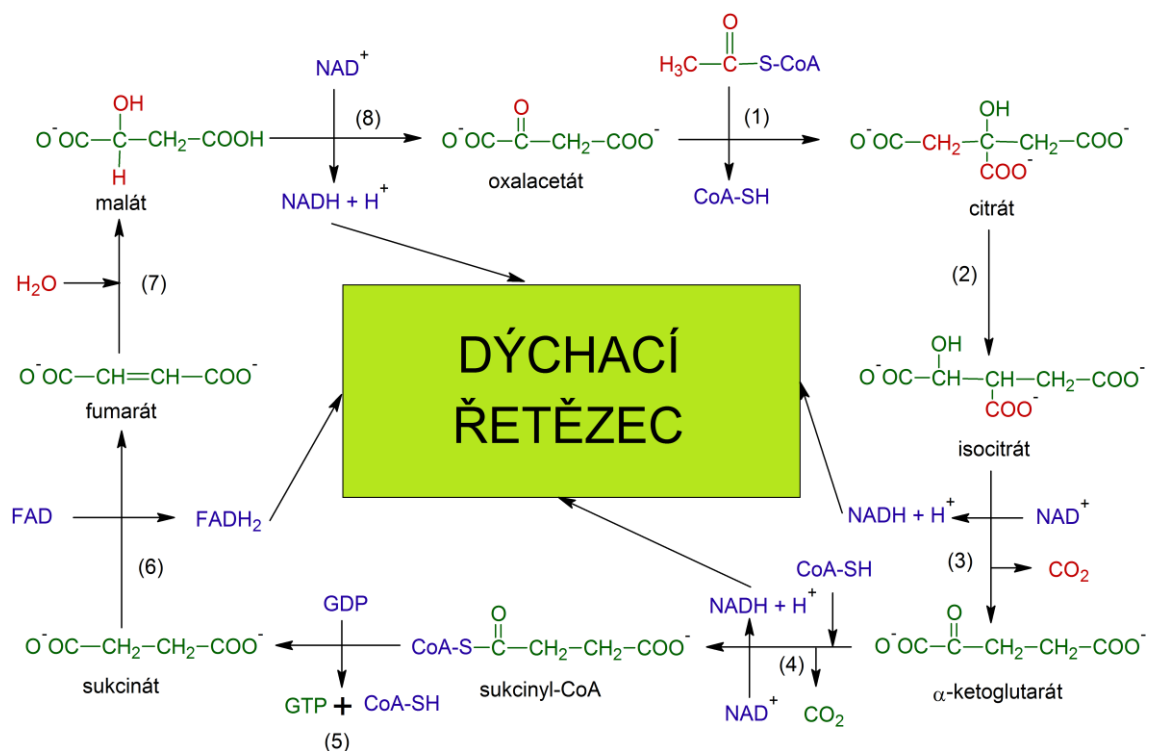
V kapitole 4 jsou výsledky diskutovány a vyhodnoceny. V kapitole 5 jsou uvedeny závěry práce.

## **1.1 Přehled současného stavu**

### **1.1.1 Buněčné procesy**

NADH a FAD jsou metabolity účastníci se základního buněčného procesu – buněčného dýchání. To se dělí na aerobní glykolýzu, Krebsův cyklus, dýchací řetězec a oxidativní fosforylaci. Pro tuto práci je významný především Krebsův cyklus a dýchací řetězec a v nich probíhající chemické reakce. [8]

Krebsův cyklus je metabolickou drahou pro aerobní metabolismus, při němž vzniká NADH + H<sup>+</sup>, které se následně spotřebovává v dýchacím řetězci. Krebsův cyklus je také pro většinu anaerobních organismů využíván k syntéze dalších metabolitů. U aerobních organismů, mezi něž spadá i člověk, slouží hlavně k zisku NADH + H<sup>+</sup> a následně také ATP z pyruvátu, který je produktem glykolýzy, nebo acetyl-S·CoA, který je produktem β-oxidace. Enzymy podílející se na reakcích Krebsova cyklu se nachází v mitochondriích s výjimkou enzymu sukcinátdehydrogenáza, který se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně. Schéma Krebsova cyklu je na obrázku 1. [8-10]

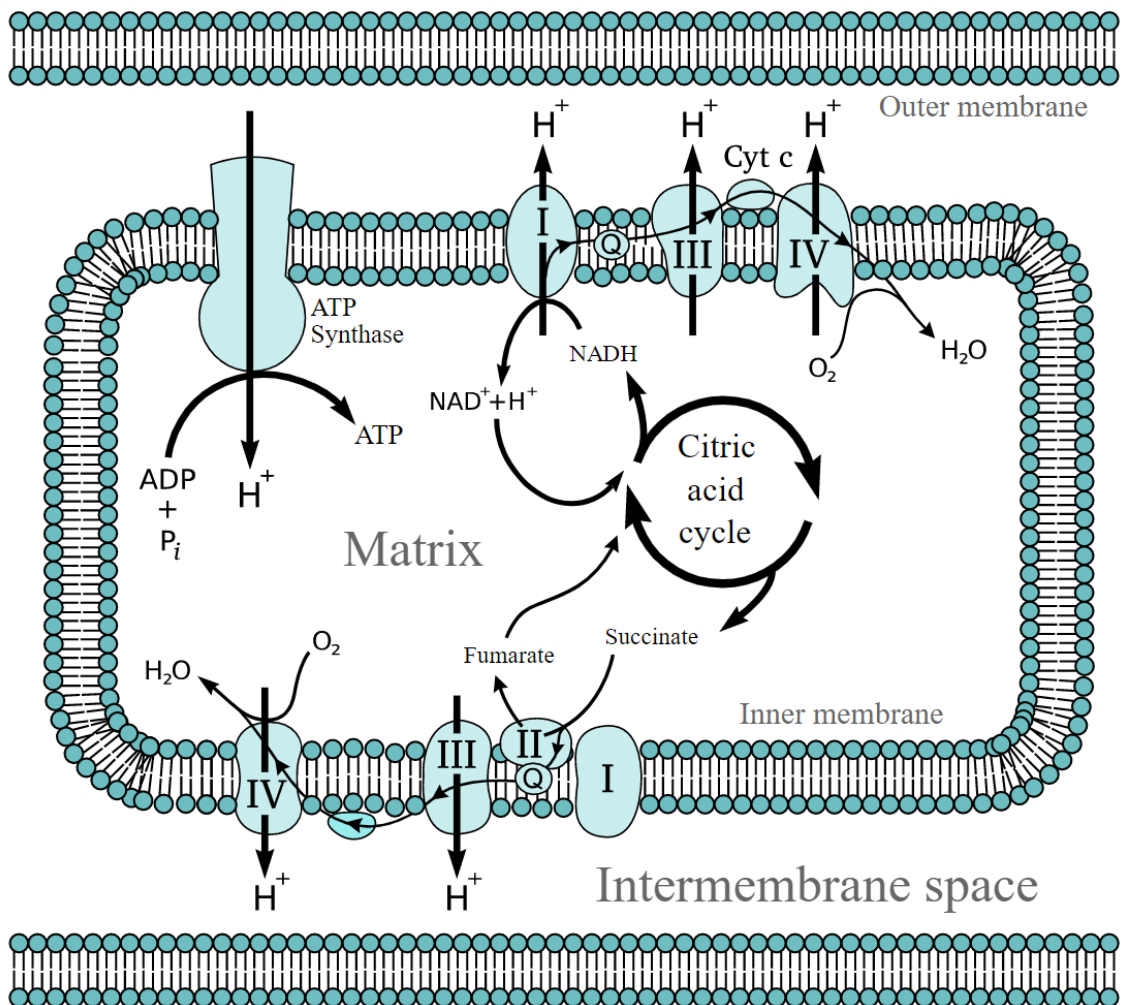


Obrázek 1.1: Schéma Krebsova cyklu [11]

Dýchací řetězec obsahuje řadu reakcí buněčného dýchání, jejichž cílem je zajištění tvorby ATP – základního zdroje energie organismů. Při této tvorbě se využívá redukovaných koenzymů a přenosu elektronů a protonů skrze specifické komplexy. Produktem dýchacího řetězce je energie, voda a teplo. Dýchací řetězec probíhá na vnitřní membráně mitochondrií. Toto umístění zajišťuje přísun redukovaných koenzymů vycházejících z Krebsova cyklu a  $\beta$ -oxidace. Dýchací řetězec spočívá v postupném uvolňování energie uložené aerobní fosforylací ve formě ATP. Intenzita buněčného dýchání je závislá na množství krist – zahybů vnitřní membrány mitochondrií. Ve vysoce vytížených buňkách, jako je například myokard, je vysoké množství mitochondrií s vysokým počtem krist. To umožňuje vysoké zásobení kyslíkem. Ten se na konci dýchacího řetězce slučuje s vodíkem a vzniká voda. Propustnost vnitřní mitochondriální membrány je vysoce selektivní, což umožňuje vytvořit koncentrační gradienty. Ty jsou zásadní při udržování gradientu kationtů vodíku  $\text{H}^+$ . Elektronové přenašeče nejsou umístěny v řetězci náhodně, ale podle hodnoty svého redoxního potenciálu, a to od nejzápornějších po nejkladnější. Z pyridinových koenzymů a flavinových koenzymů se uvolňují elektrony, které jsou přenášeny soustavou přenašečů. To zajišťuje energii pro tvorbu protonového elektrochemického gradientu. Tento gradient je vytvořen pomocí komplexů pumpujících vodíkové kationty z matrixu mitochondrií do intermembránového prostoru. Jedinou

možnou cestu, kterou se nebudou za normálních podmínek vracet protony zpět do matrix, tvoří ATP-syntasa. Díky velikosti gradientu je energie z propuštěných protonů využívána k syntéze ATP z ADP+P<sub>i</sub>. [12-18]

Dýchací řetězec se dělí na 4 reakce. V první z nich komplex I vytvoří vstup NADH+H<sup>+</sup> pyridinového koenzymu, do systému a zároveň od koenzymu přebere dva protony a dva elektrony. Přebírané elektrony jsou dodány koenzymu Q. Energie z přenosu elektronů je postačující k uvolnění čtyř H<sup>+</sup> do intermembránového prostoru. Dva protony pocházejí z NADH+H<sup>+</sup> koenzymů a dva jsou běžně přítomné. V druhé reakci vytváří komplex II vstup FADH<sub>2</sub>, flavinového koenzymu, do systému. Při předání jeho elektronů komplexu III, cyt c-reduktázou, je obcházeno uvolnění protonů z komplexu I. Ve třetí reakci odevzdává koenzym Q 2 elektrony komplexu III a další dva protony se uvolní do intermembránového prostoru. Ve čtvrté reakci přijme komplex IV, cyt c-oxidáza, od komplexu III dva elektrony a přeneše je na kyslík. Ten poté reaguje s volnými protony a vzniká voda. Při této reakci se uvolní energie k přenosu čtyř H<sup>+</sup> do intermembránového prostoru. [12-18]



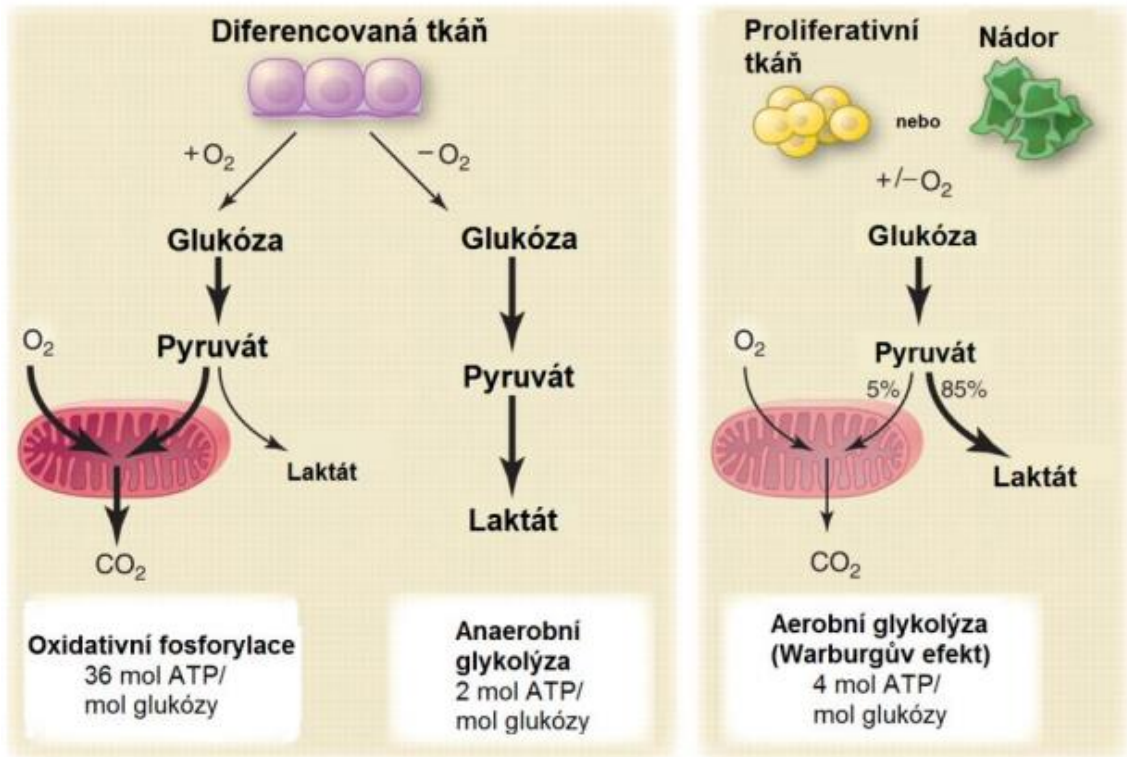
Obrázek 1.2: Schéma dýchacího řetězce [19]

Výsledkem dýchacího řetězce je reoxidování redukováných ekvivalentů  $\text{FADH}_2$  a  $\text{NADH}+\text{H}^+$  a vytvoření vody. Při využití  $\text{NADH}+\text{H}^+$  dojde k přenesení deseti  $\text{H}^+$  do intermembránového prostoru. Při využití  $\text{FADH}_2$  dojde k přenesení šesti  $\text{H}^+$ . Po těchto krocích dochází k aerobní fosforylaci, při které  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPasa uvolňuje  $\text{H}^+$  do matrix mitochondrií při tvorbě ATP. Za každé čtyři  $\text{H}^+$  je vytvořeno jedno ATP. Za každé  $\text{NADH}+\text{H}^+$  je vytvořeno 2,5 ATP. Za každé  $\text{FADH}_2$  je vytvořeno 1,5 ATP. Schéma dýchacího řetězce je na obrázku 2. [12-18]

### 1.1.2 Změny metabolismu nádorových buněk

Jedním ze společných rysů nádorových buněk je změna metabolismu. Díky narušení metabolismu se buňky mohou adaptovat na změněné prostředí a uspokojit svou potřebu rychlého růstu a proliferace. Nádorové buňky mají větší spotřebu glukózy a glutaminu než normální buňky a jsou závislé především na rychlé glykolýze s omezením využití respiračního řetězce. V nádorových buňkách se také zvyšuje množství různých proteinových enzymů, jako je LDH, PDH, a G6PDH, které je NADH schopno vázat. Navzdory tomu dochází u nádorových buněk ke zvýšení množství volného NADH, které se nespotřebovává pomocí elektronového transportního řetězce při oxidační fosforylaci.[1,20-23]

Respirační řetězec je schopen při normálním spalování z jediné molekuly glukózy vyprodukovat osmnáctkrát více molekul ATP než kolik lze získat pouhou glykolýzou. Nádorové buňky však zapnou mechanismus anaerobní glykolýzy i v přítomnosti kyslíku. To je zdůvodněno tím, že glykolýza je až stokrát rychlejší při oddělení od mitochondriálního metabolismu. Na obrázku 1.3 je energetická bilance normálních buněk proti buňkám nádorovým. Na levé straně obrázku je vidět zdravá tkáň, kde dochází v aerobním prostředí k oxidační fosforylaci za vzniku 36 molů ATP. V případě anaerobního prostředí, které může nastat například ve svalech při vysoké tělesné aktivitě, dojde k mnohem méně efektivní ale výrazně rychlejší anaerobní glykolýze. Na pravé straně je vidět, že v nádorové tkáni dochází díky Warburgovu efektu k aerobní glykolýze, tj. neefektivnímu, ale rychlému spalování i v aerobním prostředí a pouze malá část je prováděna aerobně. To má za následek zrychlení metabolismu tkáně za cenu menší efektivity. [20-24]

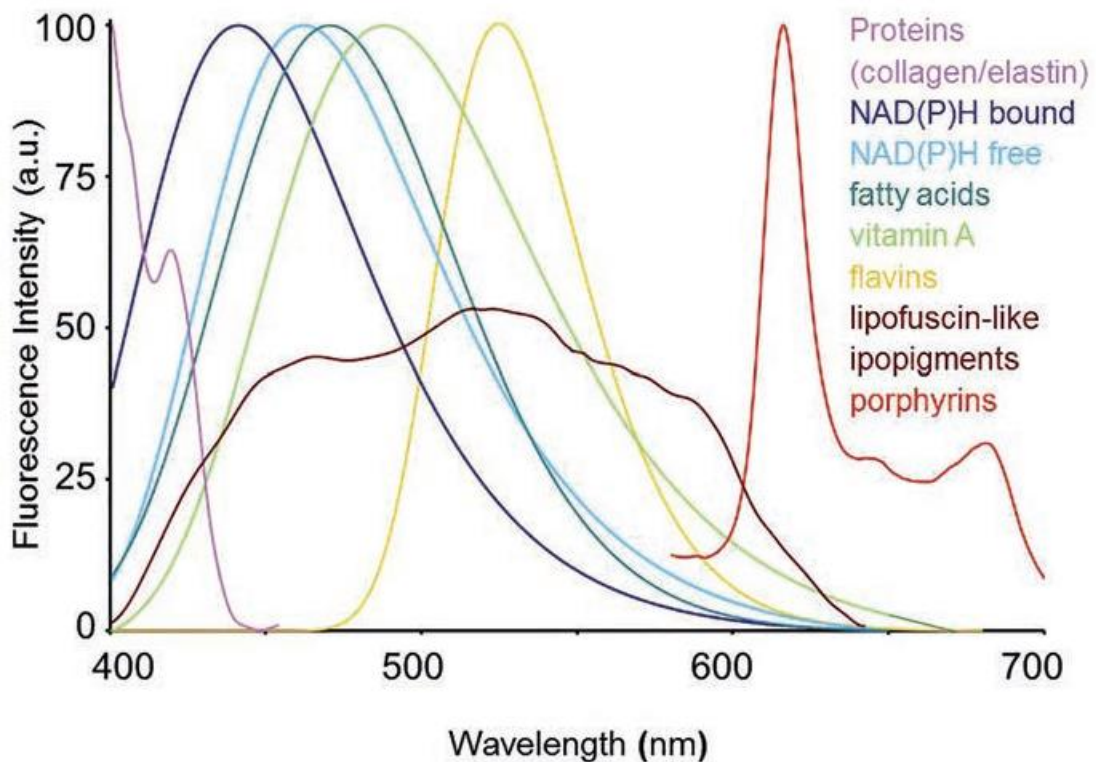


Obrázek 1.3: Schéma porovnání energetických bilancí zdravých a nádorových buněk [20]

### 1.1.3 Biofluorofory v buňkách

Biofluorofory jsou látky, které se nachází v živých organismech a jsou schopny emitovat luminiscenční záření. Mezi nejdůležitější biofluorofory obsažené v buňce, které se účastní buněčného dýchání a které jsou dle literatury důležitou součástí metabolismu zdravých i nádorových buněk, patří NADH a FAD. Všechny významné biofluorofory jsou uvedeny na obrázku 1.4. Přehled biofluoroforů buňky, jejich excitačního maxima a emisního maxima jsou uvedeny v tabulce 1. 1. [1, 6].

NADH, celým názvem nikotinamidadeninukleotid, slouží jako přenašeč redukčních ekvivalentů. NADH se využívá především při katabolických reakcích, kde zprostředkovává oxidaci paliv a přenáší elektrony do dýchacího řetězce. Je také nepostradatelný pro syntézu ATP. NADH se také nazývá koenzym I a je to běžně vyskytující se molekula v přírodě.  $\text{NAD}^+$  se v reakcích nachází ve své formě, kdy akceptuje elektron a redukuje se do formy NADH, ve které může dále fungovat jako donor elektronu. Tyto reakce jsou hlavní funkcí NAD a NADH. Molekuly NADH jsou rozpustné ve vodě a vlivem obsahu adeninu absorbují ultrafialové světlo. Fluorescenci molekuly NADH způsobuje redukovaná nikotinamidová část, což znamená, že molekula je fluorescenční pouze v redukované formě, protože  $\text{NAD}^+$  má oproti NADH téměř nulovou fluorescenci. Maximum absorpce NADH se nachází na vlnových délkách 260, 340 a 350 nm, maximum emise na 460 nm pro volné a 440 nm pro vázané [1, 6, 25-29]

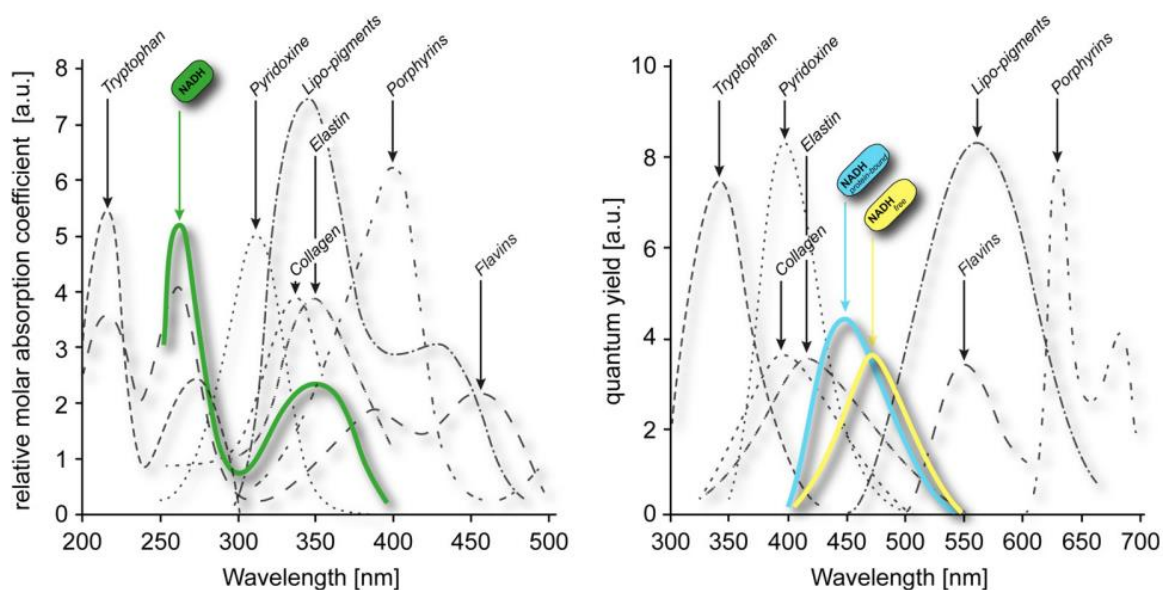


Obrázek 1.4: Fluorescenční spektra biofluoroforů v buňce [6]

Tabulka 1. 1: Přehled biofluoroforů buňky. TPF je tryptofan, TYR tyrosin, PHE fenylalanin. LR jsou lipofuscin, riboflavin a lipopigmenty [1, 6]

| Biofluorofory       | Excitační maxima (nm) | Emisní maxima (nm) |
|---------------------|-----------------------|--------------------|
| TPF, TYR, PHE       | 240-280               | 280-350            |
| Pyridoxal 5'-fosfát | 330                   | 400                |
| Pyridoxin           | 340                   | 400                |
| NADHb               | 260, 340, 350         | 440                |
| NADH                | 260, 340, 350         | 462                |
| Mastné kyseliny     | 330-350               | 470-480            |
| Vitamin A           | 370-380               | 490-510            |
| FAD a flaviny       | 350-370;440-450       | 480;540            |
| LR                  | 400-500               | 480-700            |

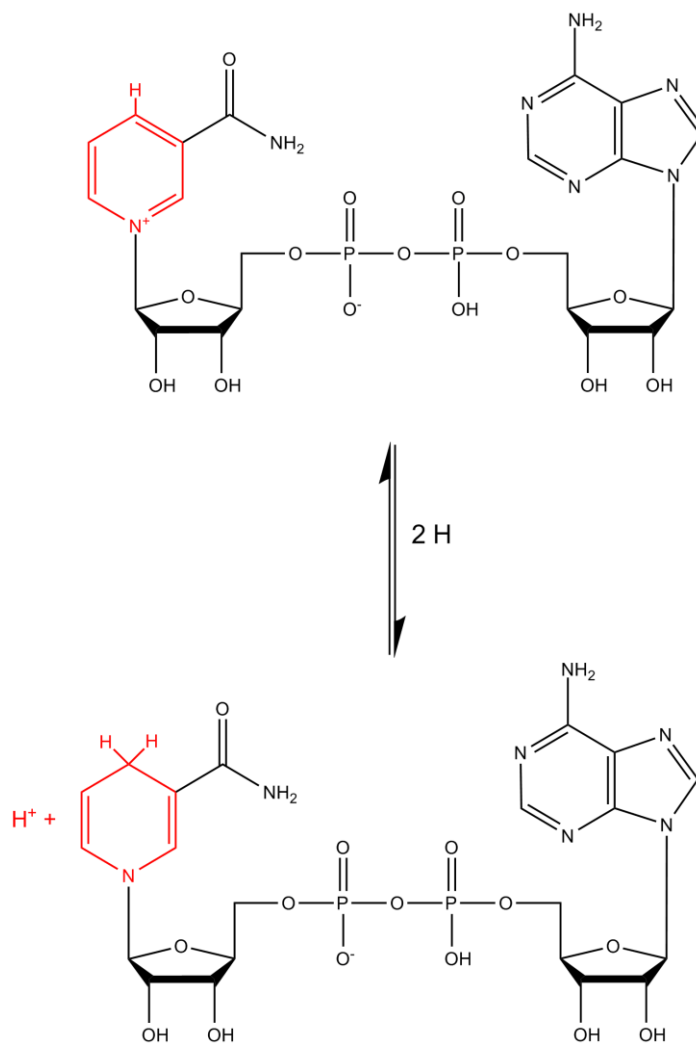
Ačkoliv je maximum absorpce NADH na vlnové délce 340 nm, vhodnější je měřit jej při excitační vlnové délce 365 nm. Při 365 nm totiž dochází stále k výrazné excitaci NADH, ale výrazně se omezuje excitace jiných biofluoroforů s excitačními maximy okolo 340 nm (viz graf 1.1) [1,5,6]



Graf 1.1: Excitační a emisní spektrum NADH a dalších biofluoroforů [5]

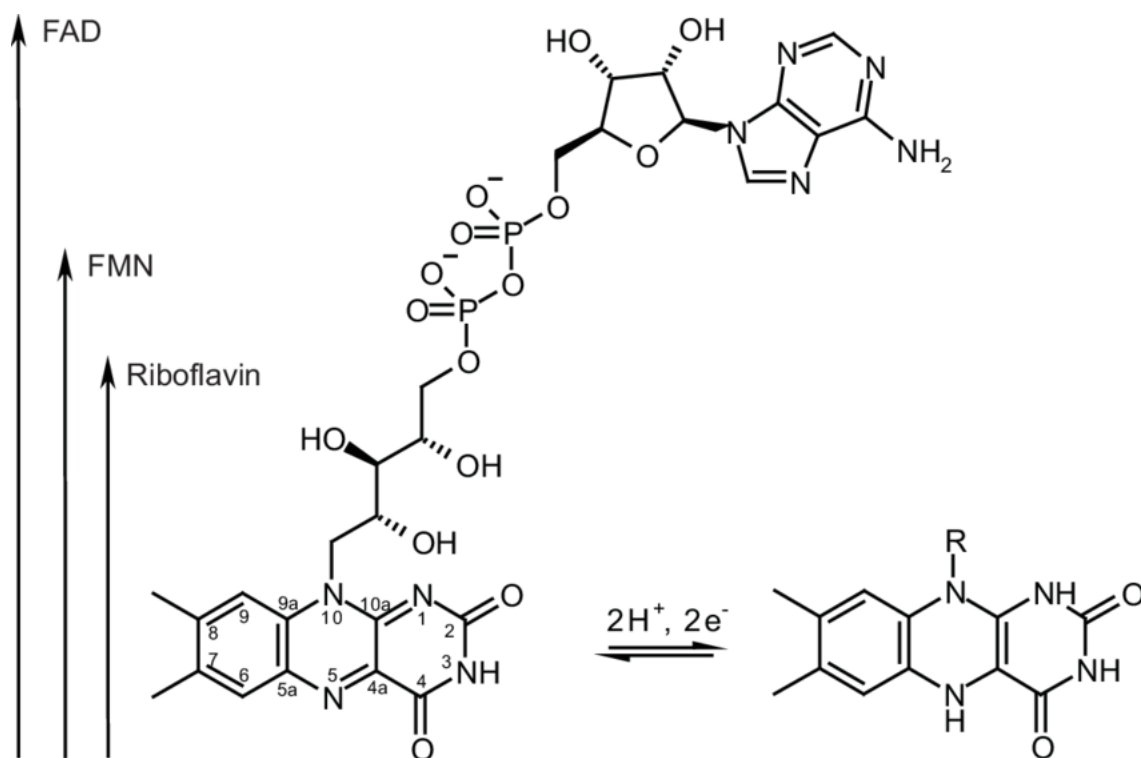


NADH se v buňce vyskytuje ve volné formě a ve formě vázané na proteiny. V nádorových buňkách se zvyšuje množství některých proteinových enzymů, jako jsou LDH, PDH, a G6PDH. Díky schopnosti NADH vázat se na tyto proteiny se u nádorových buněk zvyšuje množství vázaného NADH. Struktura redukované i oxidované formy NAD je na obrázku 1.5. [1,21,22]



Obrázek 1.5: Struktura NAD<sup>+</sup> (nahore) a NADH + H<sup>+</sup> (dole) [30]

FAD, celým názvem Flavinadenindinukleotid je prostetická skupina obsahující vitamín B2 (riboflavin), který je navázaný na ADP (adenosindifosfát). Celá molekula obsahuje riboflavinovou skupinu, dva fosfáty, ribózu a adenin. Flavinadenindinukleotid je součástí mnoha proteinů - flavoproteinů. FAD je oxidovanou formou Flavinadenindinukletotidu a FADH<sub>2</sub> je jeho redukovanou formou. FADH<sub>2</sub> vzniká v Krebsově cyklu. Dochází k tomu při dehydrogenaci sukcinátu na fumarát. FADH<sub>2</sub> umí přenést elektrony a vodíkové atomy z krebsova cyklu do dýchacího řetězce. Na konci dýchacího řetězce dochází k syntéze ATP. FAD absorbuje světlo o vlnové délce 450 nm a emituje světlo o vlnové délce okolo 540 nm. Na rozdíl od NADH, oxidovaná forma flavinu fluoreskuje a redukovaná forma ne. Jeho struktura je vidět na obrázku 1.6. [1, 31-33]

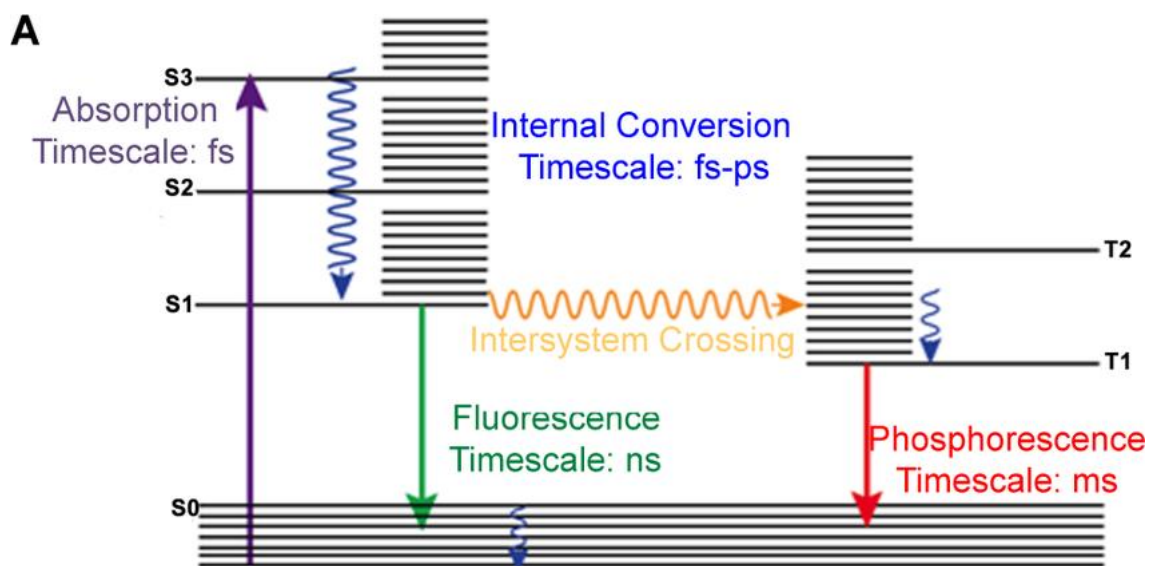


Obrázek 1.6: Struktura FAD (vlevo) a FADH<sub>2</sub> (vpravo) [34]

### 1.1.4 Fluorescence

Fluorescence je typem luminiscence, schopnosti látek (atomů, molekul) emitovat záření po absorpci fotonů. Jedná se o jev, který patří mezi fotoluminiscenční záření s krátkou dobou života (ns). Všechny jevy, které mohou nastat v látce při absorpci fotonu jsou zobrazeny v Jablonského diagramu (viz. obr. 1.7). V případě fluorescence jde o přechod

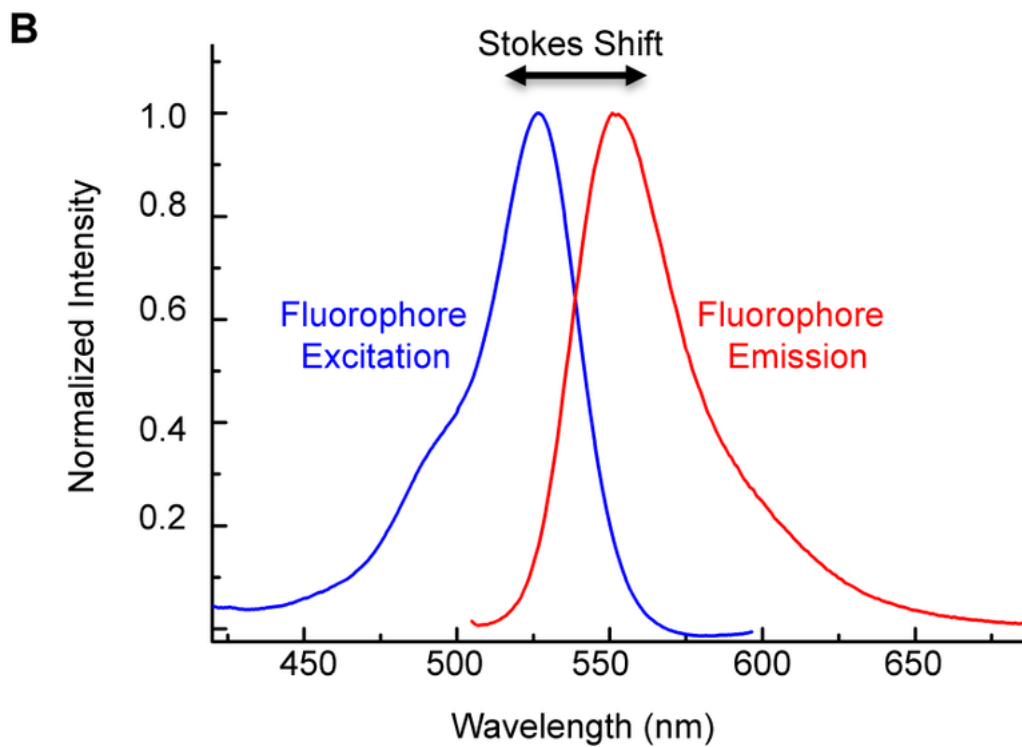
z prvního singletového stavu ( $S_1$ ) do singletové hladiny ( $S_0$ ). Stavy jsou uspořádány svisle podle energie. Nezářivé přechody jsou znázorněny vlnitými šipkami a zářivé přechody přímými šipkami. [6, 25, 27, 35, 36]



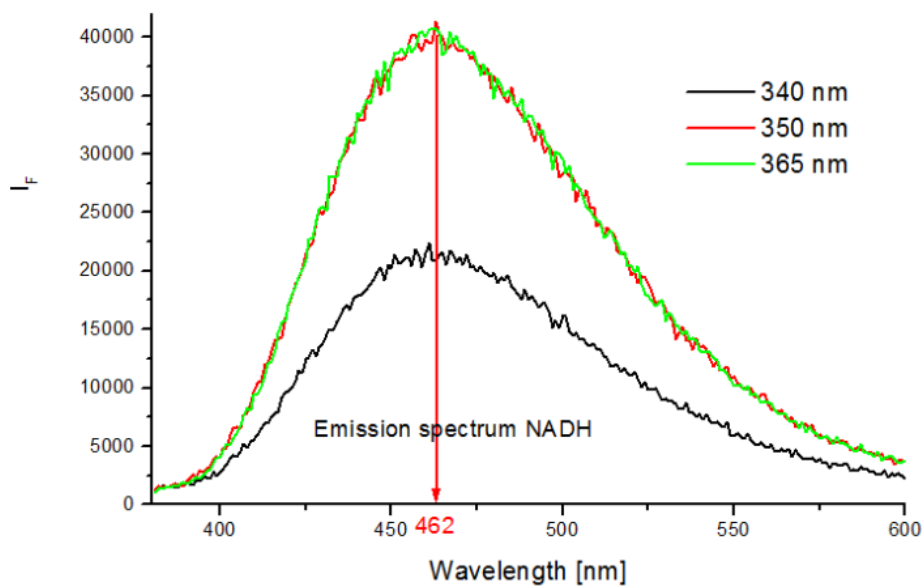
Obrázek 1.7: Jablonského diagram [37]

Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě absorpce násobené kvantovým výtěžkem a koncentrací aktivní látky (biofluoroforu). Její vlnová délka je závislá na vlnové délce absorpce fluoroforů s tím, že fluorescenční emise je vyzařována v delších vlnových délkách, což vyplývá ze zákona zachování energie. Tento jev je nazýván Stokesův posun. Emisní záření má menší energii, tedy menší frekvenci, tedy větší vlnovou délku než excitační záření, což má za následek posun emisního spektra oproti excitačnímu směrem k IR (infrared) oblasti (viz graf 1.2). [35, 38]

Další z vlastností fluorescence je její nezávislost na vlnové délce excitačního záření, Kashovo pravidlo říká, že před emisí fluorescenčního kvanta obvykle dochází k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, z čehož plyne, že fluorescenční přechod nastává z nejnižší energetické hladiny excitovaného stavu  $S_1$ . Tvar emisního spektra tedy není ovlivněn vlnovou délkou excitace a lze excitovat zářením s kteroukoli vlnovou délkou z excitačního spektra. To znamená, že i přes volbu excitační vlnové délky 365 nm pro NADH, které má maximální excitační vlnovou délku 350 nm, by měla být výsledná naměřená emisní spektra s maximem na stejné vlnové délce. Toto tvrzení bylo potvrzeno v práci [1] a je v grafu 1.3. [1, 35, 38]



Graf 1.2: Stokesův posun [38]

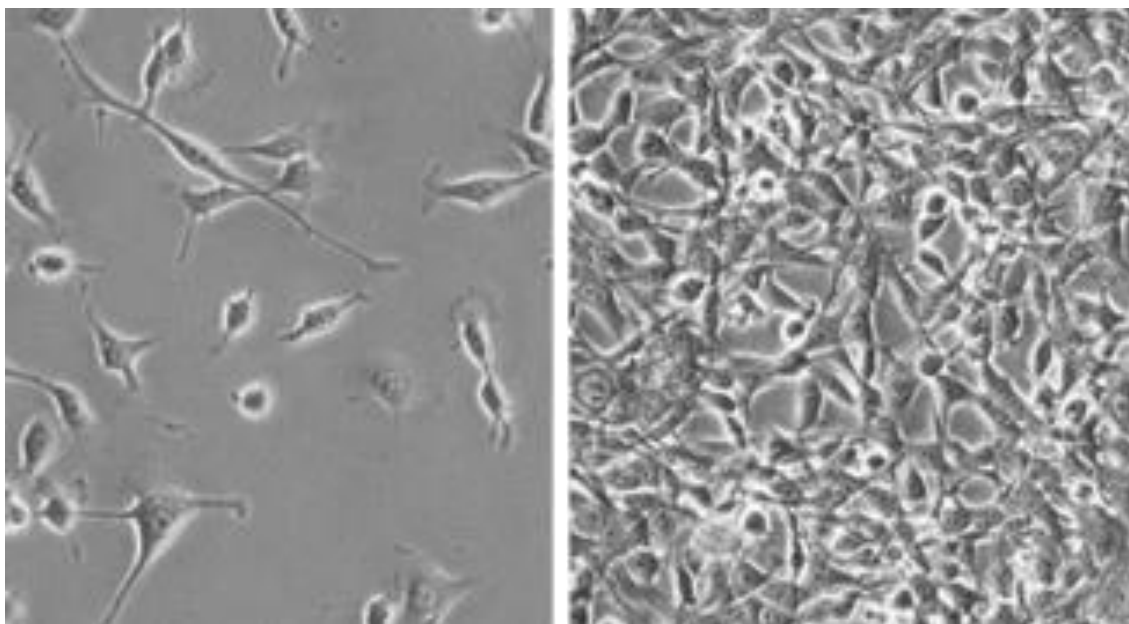


Graf 1.3: Graf změny intenzity fluorescence NADH pro rozdílné vlnové délky excitace [1]

## 1.2 Cíle práce

Cílem této práce je ověřit možnost detekce rakovinných buněk za pomoci spektrofotometrického měření jejich emise a to za využití biofluoroforů NADH a FAD zmíněných v předchozích kapitolách. Vzhledem k výskytu NADH ve zdravých i nemocných buňkách a možnosti detekovat volné a vázané NADH by mělo být možné rozlišit zdravé od nemocných buněk na základě rozkladu jejich fluorescenčních spekter. Výstupem práce budou naměřené hodnoty emisí buněk a jejich rozbor, porovnání a vyhodnocení, zda by bylo možné rozlišovat nádorové buňky jen na základě jejich emise.





Obrázek 2.2: Mikroskopický snímek CT26 [41]

Shrnutí vlastností použitých buněčných linií je v tabulce 2.1. [39, 40, 42]

Tabulka 2.1: přehled parametrů buněk

|                       |                                     |                                     |                              |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Organismus            | <i>Mus musculus</i> ,<br>myš domácí | <i>Mus musculus</i> , myš<br>domácí | <i>Homo sapiens</i> , člověk |
| Tkáň                  | embryonální                         | tlusté střevo                       | játra                        |
| Typ buněk             | fibroblast                          | fibroblast                          | n/a                          |
| Stav                  | zmražené                            | zmražené                            | zmražené                     |
| Morfologie            | fibroblast                          | fibroblast                          | epitel                       |
| vlastnosti<br>kultury | adherentní                          | adherentní                          | adherentní                   |
| věk                   | embryonální (14-<br>17 dní gestace) | dospělé                             | 43 let                       |
| Stav                  | zdravé                              | rakovinné                           | rakovinné                    |
| kmen / rasa           | BALB/c                              | BALB/c                              | Asijská                      |

Posledními použitými nádorovými buňkami je linie SNU475. Ty jsou využity v poslední části této práce. Jedná se o lidské buňky hepatocelulárního karcinomu. [42]

## 2.2 Chemikálie pro kultivaci a měření

Pro měření buněčných suspenzí při pH 7,2 a jejich kultivaci byl použit pufr PBS (Phosphate Buffered Saline). Jedná se o fosfátový pufr s pH 7,2, který se složením velice podobá prostředí lidské plasmy od firmy Sigma Aldrich [31]. Pro měření v pH 6,2 byl připraven fosfátový pufr z  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (dále označován jako fosfátový pufr). Pro určení jejich koncentrace se vycházelo z osmolality lidské plasmy, která se pohybuje mezi 280 a 300 mmol/kg. Koncentrace pufru byla zvolena jako 300 mmol/kg. Poměr obou roztoků vycházel z tabulky pro přípravu fosfátového pufru (tabulka 3) a následně upraven pro dosažení pH 6,2 (s přesností na 2 desetinná místa). Výpočet množství látek pro dosažení požadované koncentrace pro 50 ml každého roztoku vychází ze vzorce 2.1. Vzhledem k hustotě vody 1000 g/l byla použita molární koncentrace (osmolarita, mol/l) namísto osmolality (mol/kg) [43,44]

$$V * M * Mr = m \quad (2.1)$$

$$\text{a) } 0,05 * 0,3 * 358,14 = 5,37 \text{ g}$$

$$\text{b) } 0,05 * 0,3 * 136,09 = 2,04 \text{ g}$$

kde  $V$  je objem,  $M$  je molární koncentrace,  $Mr$  je molekulová hmotnost sloučeniny a  $m$  je hmotnost rozpouštěné soli.

a) výpočet pro  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a

b) výpočet pro  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Poměry složek požadovaného pH fosfátového pufru jsou v tabulce 2.2. [44]



Tabulka 2.2: Tabulka poměrů koncentrací solí pro tvorbu pufru [44]

| pH při lab. T | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (ml) | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ml) |
|---------------|---|--------------------------------------|
| 5,80          | 4,00  | 46,00                                |
| 6,00          | 6,15  | 43,85                                |
| 6,20          | 9,25  | 40,75                                |
| 6,40          | 13,25   | 36,75                                |
| 6,60          | 18,75   | 31,25                                |
| 6,80          | 24,50   | 25,50                                |
| 7,00          | 30,50   | 19,50                                |
| 7,20          | 36,00   | 14,00                                |
| 7,40          | 40,50   | 9,50                                 |
| 7,60          | 43,50   | 6,50                                 |
| 7,80          | 45,75   | 4,25                                 |
| 8,00          | 47,35   | 2,65                                 |

Pro kultivaci buněk bylo využito kultivační médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Alternativním kultivačním médiem je RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) od firmy Sigma Aldrich. Kultivační média slouží jako výživa buněk při jejich kultivaci v inkubátoru a pro zastavení účinku trypsinu. [45, 46]

Dalšími použitými chemikáliemi jsou trypsin + EDTA o koncentraci 0,25 % a trypanová modř. Trypsin patří mezi proteázy. Obě tyto chemikálie jsou od firmy Sigma Aldrich. Trypsin + EDTA slouží k oddělení buněk po kultivaci ode dna petriho misky. Trypanová modř slouží k obarvení buněk při počítání jejich koncentrace v Burkerově komůrce a určení jejich viability. [47, 48]

### 2.3 Kultivace buněk

Aby byly buňky vhodně připravené k měření je nutné je nejdříve namnožit (kultivovat) a následně přenést do pufru o správném pH pro měření. Tento proces jsem rozdělil do dvou částí, které jsou od sebe děleny 48 hodinami. První část spočívá v rozmrazení buněk, jejich přesun do kultivačního média, přemístění do petriho misky k další kultivaci, kontrole koncentrace buněk a nakonec umístění do inkubátoru s prostředím o teplotě 37 °C. Druhá část spočívá v kontrole buněk, jejich odběru z petriho misky do zkumavek a přidání pufru o vybraném pH.

Postup části 1:

Potřebné chemikálie: Kultivační médium (DMEM nebo RPMI), trypanová modř

- 1) Rozmrazit 2 ml 3T3 a CT26 v kryovialkách v kelímku s vlažnou vodou
- 2) Přenést buňky zvlášť do dvou 10 ml zkumavek
- 3) Přidat 8 ml kultivačního média (pomalu, aby nedošlo k poškození buněk)
- 4) Promíchat buňky pipetou a vložit do centrifugy (1100 rpm, 5 min)
- 5) Slít superlativ
- 6) Přidat 1 ml kultivačního média a promíchat pipetou
- 7) Přenést obsah zkumavek do petriho misek. (ponechat alespoň 8  $\mu$ l)
- 8) Přidat do každé petriho misky 8 ml kultivačního média
- 9) Vložit do inkubátoru
- 10) Pro kontrolu koncentrace a živosti buněk odebrat 8  $\mu$ l ze zkumavky a přidat 8  $\mu$ l trypanové modři.
- 11) Odebrat 8  $\mu$ l do Bürkerovy komůrky.
- 12) Spočítat množství buněk ve vzorku a určit koncentraci.

Postup části 2:

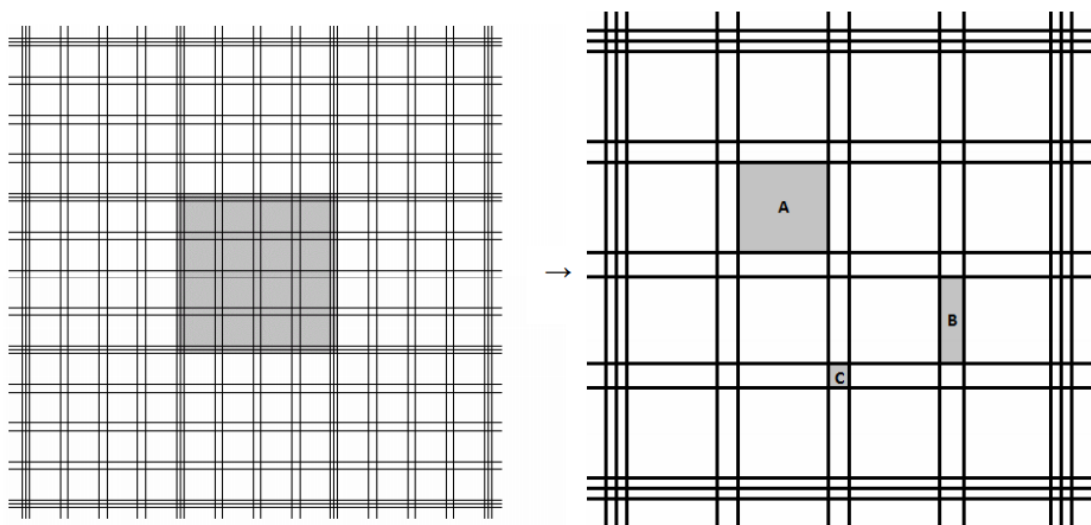
Potřebné chemikálie: PBS, Kultivační médium, trypsin, trypanová modř, fosfátový pufr

- 1) Zkontrolovat životnost buněk na mikroskopu
- 2) Z petriho misek odsát medium
- 3) Přidat 5 ml PBS, opláchnout a odsát
- 4) Přidat 2 ml 0,25 % trypsinu
- 5) Vložit na 5 minut do inkubátoru
- 6) Zkontrolovat uvolnění buněk na mikroskopu
- 7) Přidat 8 ml kultivačního média
- 8) Přenést obsah petriho misek do 10 ml zkumavek
- 9) Promíchat buňky pipetou a vložit do centrifugy (1100 rpm, 5 min)
- 10) Slít superlativ
- 11) Dolít do 3,5 ml pufr (pro 7,2 pH PBS, pro pH 6,2 fosfátový pufr) a promíchat
- 12) Odebrat 3 ml každého vzorku do zkumavek
- 13) Uchovat zbytek pro následné měření koncentrace dle kroků 10-12 v části 1

Zbylých 0,5 ml po odběru do zkumavek slouží k proměření koncentrace buněk. Měření koncentrace probíhá až po měření jejich fluorescence a probíhá stejně jako v části 1 v krocích 10 – 12. Všechny kroky kromě kultivace v inkubátoru a centrifugace probíhaly v laminárním boxu a mimo něj byly vzorky uzavřené.

## 2.4 Určení koncentrace buněk v Bürkerově komůrce

Koncentrace buněk je určena pomocí Bürkerovy komůrky. Ta je tvořena silným podložním sklem se dvěma vyrytými počítacími sítěmi, které mají přesně danou plochu a hloubku. Počítací síť Bürkerovy komůrky je tvořena 9 velkými čtverci, z nichž každý má plochu 1 mm<sup>2</sup>. Tyto velké čtverce jsou dále rozděleny na 16 menších od ploše 0,04 mm<sup>2</sup> (viz. obrázek. 2.3). Pro určení koncentrace buněk se nanese 8 µl roztoku buněčné suspenze a trypanové modři (dle kroku 10 a 11 části 1). Po tomto nanesení roztoku se komůrka vloží do světelného mikroskopu. V mikroskopu se následně sečtou všechny buňky v jednotlivých polích s tím, že se započítávají ty, které jsou uvnitř nebo se dotýkají levé či horní hrany. Živé buňky ze vzorku nejsou obarveny trypanovou modří a tak lze snadno určit a tyto neobarvené buňky lze následně snadno sečíst. Pro výpočet koncentrace buněk se použil vzorec 2.2 [49]



Obrázek 2.3: Schéma Bürkerovy komůrky. Obrázek vlevo ukazuje 9 velkých čtverců o obsahu 1 mm<sup>2</sup>. Obrázek vpravo ukazuje 16 menších čtverců o obsahu 0,04 mm<sup>2</sup>. [49]

$$X = n/c * v * h * z \quad (2.2)$$

kde  $X$  je počet buněk v 1 ml,  $n$  je počet všech sečtených buněk,  $c$  je počet čtverců ve kterých se počítalo,  $v$  je obsah čtverce,  $h$  je výška čtverce a  $z$  je ředění vzorku.

Z tohoto vzorce lze vytvořit jednodušší vzorec, a to vzorec 2.3

$$X = np * z * 10000 \quad (2.3)$$

kde  $X$  je počet buněk v 1 ml,  $np$  je průměrný počet buněk ve velkém čtverci ( $1 \text{ mm}^2$ ) a  $z$  je ředění.

V jednom z měření bylo naměřeno průměrně 6,1 buněk na čtverec. Pomocí vzorce 3 pak určíme koncentraci roztoku.  $z$  je 2, protože roztok je ředěn 1:1 trypanovou modří.

$$X = 6,1 * 2 * 10000$$

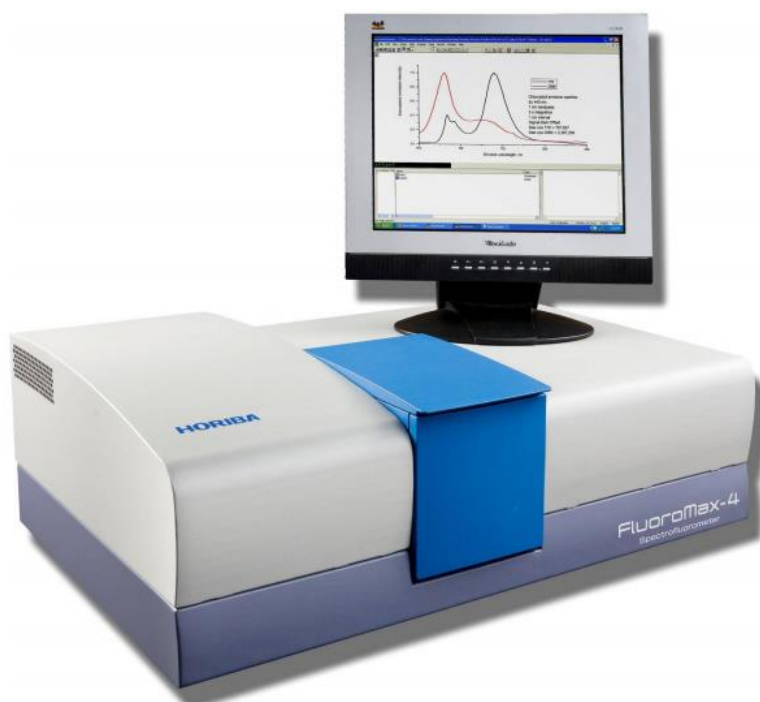
$$X = 122000 \text{ buněk/ml}$$

## 2.5 Postup měření

Vzorky buněk ve formě suspenze o pH7,2 nebo pH6,2 jak byly popsány v kapitole 2.3, byly ve speciálních uzavřených zkumavkách přeneseny do laboratoře s měřicím vybavením k měření fluorescenčních spekter. Vzorky jsou dávkovacími pipetami (3ml) přeneseny do křemenných kyvet (10x10x50mm), je zkontrolováno jejich pH a v případě měření při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  jsou vzorky v kyvetě zahřáty v ohřívači kyvet nastaveném na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , do kterého byly kyvety vloženy na 30 sekund před měřením fluorescenčních spekter. Mezi přípravou buněk a vlastním měřením nebyla časová prodleva větší než 30 minut. Jedno měření fluorescenčního spektra v rozsahu cca 400-700nm trvá 45 vteřin.

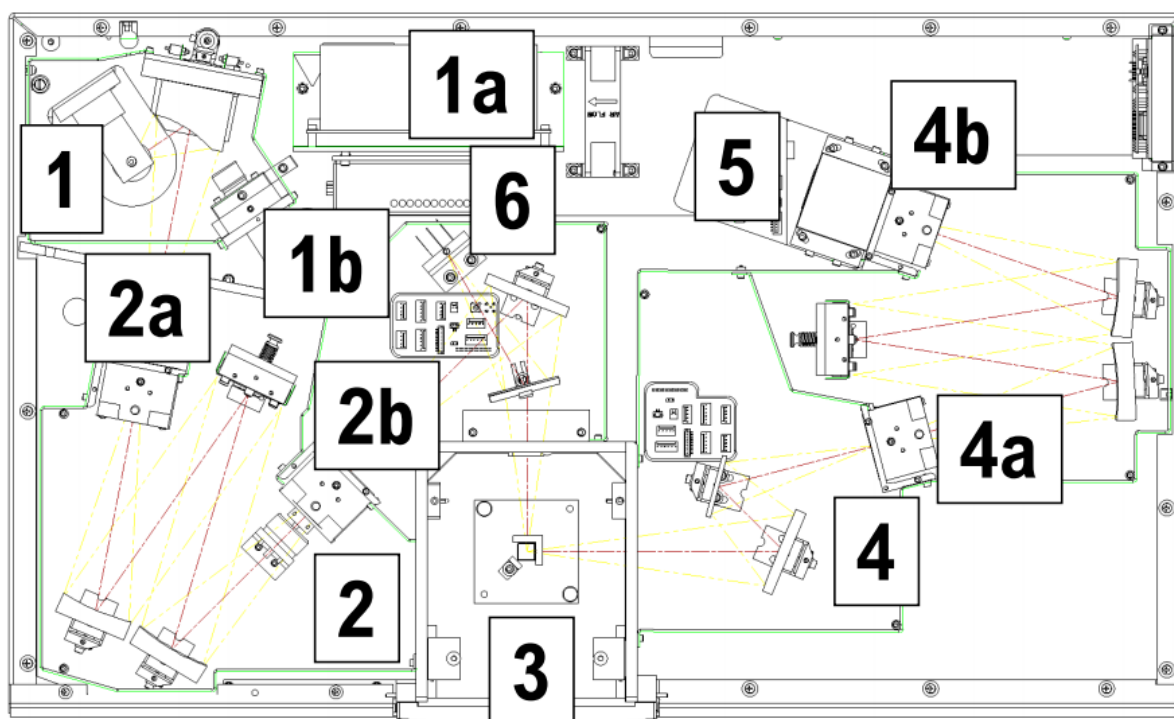
## 2.6 Fluorescenční spektrometr FluoroMax 4

Fluorescenční spektra vzorků buněčných suspenzí byla měřena na přístroji FluoroMax4 firmy Horiba (viz. obr. 2.4) [50, 51]



Obrázek 2.4: Přístroj FluoroMax 4 [50]

Zdrojem záření je xenonová oblouková lampa, která s výkonem 150 W a excitací 220-600 nm Nepřesnost excitačního záření koriguje referenční fotodioda. Výběr a šířku excitačního záření zajišťuje excitační monochromátor Czerny-Turner s planárním drážkováním a vstupní nastavitelná štěrbinu. Svazek je veden soustavou zrcadel ke vzorku, jehož emise je usměrněna přes emisní monochromátor a skrze výstupní štěrbinu. Vstupní i výstupní štěrbinu jsou nastavitelné. Vstupní štěrbinu ovlivňuje šířku spektrální čáry excitačního záření. Emisní štěrbinu reguluje intenzitu signálu dopadající na detektor a spektrální citlivost detekovaného záření. Fluorescence ze vzorku je detekována fotonásobičem R928P od společnosti Hamamatsu [52] s rozsahem 200 – 870 nm. Schéma přístroje FluoroMax 4 je na obrázku 2.5. Přehled všech parametrů uváděných výrobcem je v tabulce 2.3. [50-52]



Obrázek 2.5: Schéma FluoroMax 4. 1) Xenonová oblouková lampa, 1a) Zdroj xenonové lampy, 1b) blesk (pouze pro FluoroMax 4P, 2) Excitační monochromátor, 2a/b) Štěrbinu, 3) Oblast pro vzorek, 4) Emisní monochromátor, 4a/b) Štěrbinu, 5) Detektor signálu, 6) Referenční detektor [50]

Tabulka 2.3: Přehled parametrů FluoroMax 4 [51]

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Optika                | Reflexní zrcadla s vysokou přesností               |
| Zdroj                 | 150 W CW bez-ozonová xenonová oblouková lampa      |
| Monochromátor         | Czerny-Turner design s planárním drážkováním       |
| Excitační drážkování  | 1200 drážek/mm – vyryté při 330 nm                 |
| Emisní drážkování     | 1200 drážek/mm – vyryté při 500 nm                 |
| Štěrbiny              | 0 - 30 nm, plynule nastavitelné                    |
| Přesnost vlnové délky | ± 0,5 nm   |
| Integrační čas        | 1 ms - 160 s                                       |
| Základní detektor     | Fotonásobič R928P, spektrální pokrytí 200 - 870 nm |
| Referenční detektor   | UV-rozšířená silikonová fotodioda                  |
| Transmisní detektor   | UV-rozšířená silikonová fotodioda                  |
| Rozměry               | 83 x 28 x 48 cm                                    |
| Váha                  | 34 kg  |

Ke zpracování výstupních dat z přístroje FluoroMax 4 slouží software FluorEssence od společnosti Horiba, umožňující ovládání všech funkcí zařízení FluoroMax 4 pomocí PC. Tento software byl použit k nastavení parametrů měření, sledování průběhu měření a export naměřených emisních spekter všech vzorků. Nastavené parametry měření jsou v tabulce 2.4. [50]

Tabulka 2.4: Přehled nastavených parametrů FluoroMax 4 pro měření vzorků. Hodnoty v závorce jsou alternativní měření pro excitační vlnovou délku 460 nm. [50]

|                        |                             |
|------------------------|-----------------------------|
| Excitační štěrbina     | 2 nm                        |
| Emisní štěrbina        | 2 nm                        |
| Excitační vlnová délka | 365 nm (460 nm)             |
| Rozsah měření          | 400 – 700 nm (490 – 700 nm) |
| Krok                   | 1 nm                        |

## 2.7 Postup měření fluorescence 3T3 jako funkce koncentrace CT26

pH suspenzí (vzorků) s buňkami CT26 a 3T3 (případně SNU475) jsou po přenosu do laboratoře s přístrojem FluoroMax 4 zkontrolovány pH metrem se skleněnou elektrodou a přeneseny pomocí pipety do křemíkových kyvet o objemu suspenze 3 ml. Kyveta určená k měření je vybavena magnetickým míchátkem, aby bylo zabráněno usazování buněk na dně kyvety během měření fluorescence.

Nejprve se proměřil vzorek CT26, a to za parametrů uvedených v kapitole 2.6. Po proměření emisních spekter pro excitace 365nm i 460nm je vzorek vyměněn za vzorek 3T3. Po proměření obou vzorků dojde k postupnému proměření koncentrační řady roztoků obou buněk o různých koncentracích. Její vytvoření spočívá v postupném odebírání vzorku 3T3 a současnému přidávání vzorku CT26 do stejné kyvety. Krok odběru byl zvolen 0,3 ml (v pozdějších měřeních zvýšen na 0,6 ml). K odběru z 3T3 (nebo roztoku 3T3 a CT26 který vznikne) dochází až do odebrání a celkového nahrazení 3 ml roztokem CT26.

Vývoj změny objemů a koncentrací (za předpokladu stejné vstupní koncentrace 3T3 a CT26) je v tabulce 2.5. Jak je vidět vznikne v celku 12 roztoků (7 roztoků pro pozdější měření) o různých koncentracích 3T3 a CT26 a to za použití pouze 3 ml roztoků každého typu buněk. Procentuální zastoupení vzorků ve sloupci 4 a 5 je pouze orientační. Přesné procentuální zastoupení je počítáno pro každý vzorek zvlášť podle spočtené koncentrace zjištěné za pomoci Burkerovy komůrky (viz kapitola 2.4). Při prvotních měřeních bylo zjištěno, že po provedení celé této sady měření je životnost buněk v nejhorších případech zhruba o čtvrtinu menší než na začátku měření. To by mělo vliv na výsledky, pokud by nebylo pracováno s normalizovanými hodnotami spekter. Oba druhy buněk, tj. 3T3 i CT26 prokázaly obdobnou životnost a jejich poměr se tedy v průběhu měření neměnil. Výsledná spektra by tedy neměla být ovlivněna.

Po proměření čistých vzorků a koncentrační řady je nutné ještě doměřit čistý pufr. Ten je měřen za stejných podmínek a slouží pro odečtení od naměřených spekter vzorků jako slepý vzorek.

Měření byla prováděna nejprve při laboratorní teplotě tak, jako je uvedeno v postupu. V případě měření vzorků při teplotě 37 °C bylo nutné nejprve vzorek nahřát. Toho bylo dosaženo v ohřívači kyvet nastaveném na 37°C do kterého byly kyvety vloženy na 30 sekund před každým měřením emise.

Tabulka 2.5: Změny v objemech a koncentracích roztoků 3T3 a CT26 při tvorbě kalibrační řady

| Název vzorku /množství roztoku | 3T3 (ml) | CT26 (ml) | 3T3 (%) | CT26 (%) |
|--------------------------------|----------|-----------|---------|----------|
| 3T3                            | 3,00     | 0,00      | 100     | 0        |
| 1                              | 2,70     | 0,30      | 90      | 10       |
| 2                              | 2,43     | 0,57      | 81      | 19       |
| 3                              | 2,19     | 0,81      | 73      | 27       |
| 4                              | 1,97     | 1,03      | 66      | 34       |
| 5                              | 1,77     | 1,23      | 59      | 41       |
| 6                              | 1,59     | 1,41      | 53      | 47       |
| 7                              | 1,43     | 1,57      | 48      | 52       |
| 8                              | 1,29     | 1,71      | 43      | 57       |
| 9                              | 1,16     | 1,84      | 39      | 61       |
| 10                             | 1,05     | 1,95      | 35      | 65       |
| CT26                           | 0        | 3         | 0       | 100      |

Výpočet přesné koncentrace je proveden podle vzorce 2.4.

$$x = v1 * X1 / (v1 * X1 + v2 * X2) \quad (2.4)$$

kde  $x$  je procentuální zastoupení 3T3 ve vzorku,  $v1$  je objem 3T3 ve vzorku,  $X1$  je vypočítaná koncentrace 3T3 ve vzorku dle vzorce 2.3,  $v2$  je objem CT26 ve vzorku a  $X2$  je koncentrace CT26 ve vzorku dle vzorce 2.3.



## 2.8 Zpracování dat a GASpeD

Data získaná z programu FluorEssence byla převedena do textového souboru pro další zpracování v programech MS Excel a GASpeD. První část zpracování probíhala v programu MS Excel. V této části byla provedena korekce naměřených fluorescenčních spekter pomocí korekční tabulky pro FluoroMax 4 a k odečtení spektra slepého vzorku ve formě pufru. Dále došlo k normalizaci všech dat na úroveň intenzity emise 0 až 1 a výpočet přesné koncentrace buněk v dílčích roztocích koncentrační řady dle vzorce 2.4.

Takto korigovaná data byla zpracována v programu GASpeD. Program GASpeD (Genetic Algorithm for Spectral Decomposition) [53, 54] je určen pro rozklad emisních spekter na jednotlivé zdroje emise. Tento program umožňuje nalézt parametry funkcí popisujících jednotlivé spektrální křivky a také pozadí spektra, které je ve tvaru lineární funkce. Dále umožňuje odhadnout množství spektrálních křivek ve spektru nebo rozdělit spektrum na předem nastavený počet, což byl náš případ. Zvolený počet křivek byl 4 v souladu s dosavadními poznatky z literatury. [1]

Program GASpeD řeší spektrální rozklad pomocí genetického algoritmu (GA). Jedná se o postup, který se snaží pomocí principů evoluční biologie nalézt řešení problémů, pro které není použitelný žádný exaktní algoritmus. Genetické algoritmy patří mezi evoluční algoritmy, tedy techniky, které napodobují evoluční procesy, jako jsou mutace a dědičnost. GASpeD kombinuje genetický algoritmus spolu s lokální optimalizační technikou Levenber-Marquardt. Ta se používá typicky pro závěrečnou fázi optimalizace. Pro tuto práci je program GASpeD nedocenitelný pro možnost rozkladu fluorescenčního spektra na přínosy jednotlivých fluoroforů buněk a tím rozlišit fluorescenci volného a vázaného NADH. [53, 54]

GASpeD umožňuje volit počet křivek ve spektru, šířku křivky, počet generací. Z předchozích výsledků analýzy FS a literatury [1, 5, 6] jsme volily počet křivek 4, šířku 0-100ns, počet generací 1000. Pro každé naměřené spektrum po korekci a normalizaci byl proveden výpočet stokrát a vybrán nejlepší fit. Data získaná z programu GASpeD byla dále zpracována do grafů, které jsou uvedeny v kapitole 3. [53, 54]

### 3 Výsledky

Výsledky jsou fluorescenční spektra buněk 3T3, CT26 a SNU475 naměřená a korigovaná podle postupu v kapitolách 2.7 a 2.8.

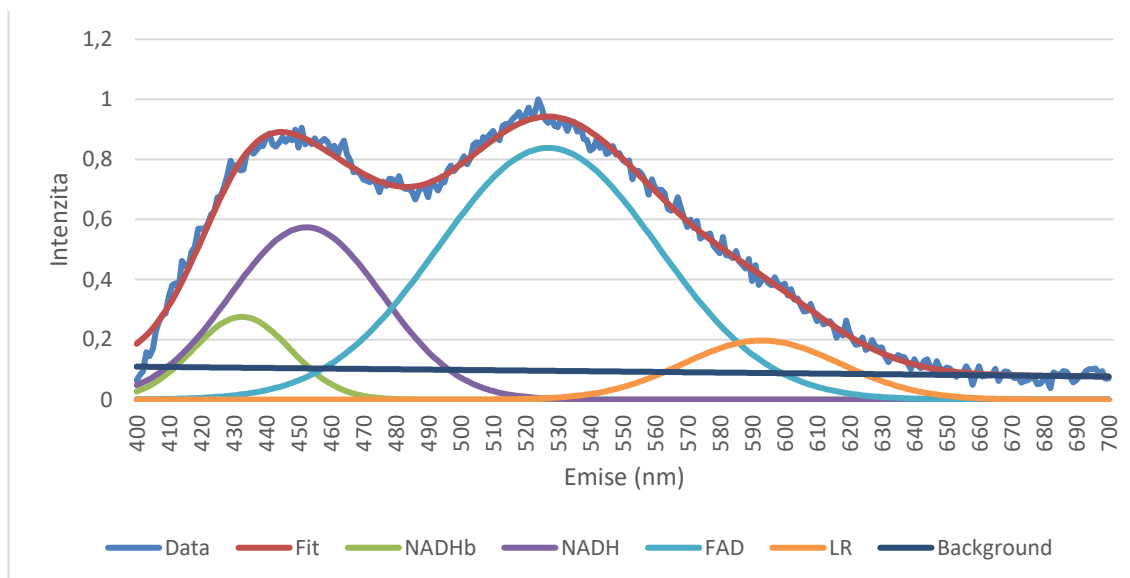
#### 3.1 Fluorescenční spektra 3T3, CT26 a SNU475 a jejich rozklad na příspěvky jednotlivých fluoroforů

Tato část se zaměřuje na analýzu spekter buněk 3T3, CT26 a SNU475 a porovnání příspěvků jednotlivých biofluoroforů. Označení křivek v grafech je následující: Data označuje korigovaná a normalizovaná naměřená data, Fit označuje fitovou funkci odpovídající datům, NADHb označuje vázané NADH, NADH označuje volné NADH, FAD označuje FAD, LR označuje lipofuscin, riboflavin a lipopigmenty, Background označuje šum pozadí. U měření při excitaci 460 nm Res označuje zbylou fluorescenci vzorku z ostatních biofluoroforů. Osa x označuje emisní vlnovou délku v nm, osa y označuje normalizovanou intenzitu emise v úrovni od 0 do 1 v (a. u.).

##### 3.1.1 Fluorescenční spektra při pH 7,2 a laboratorní teplotě

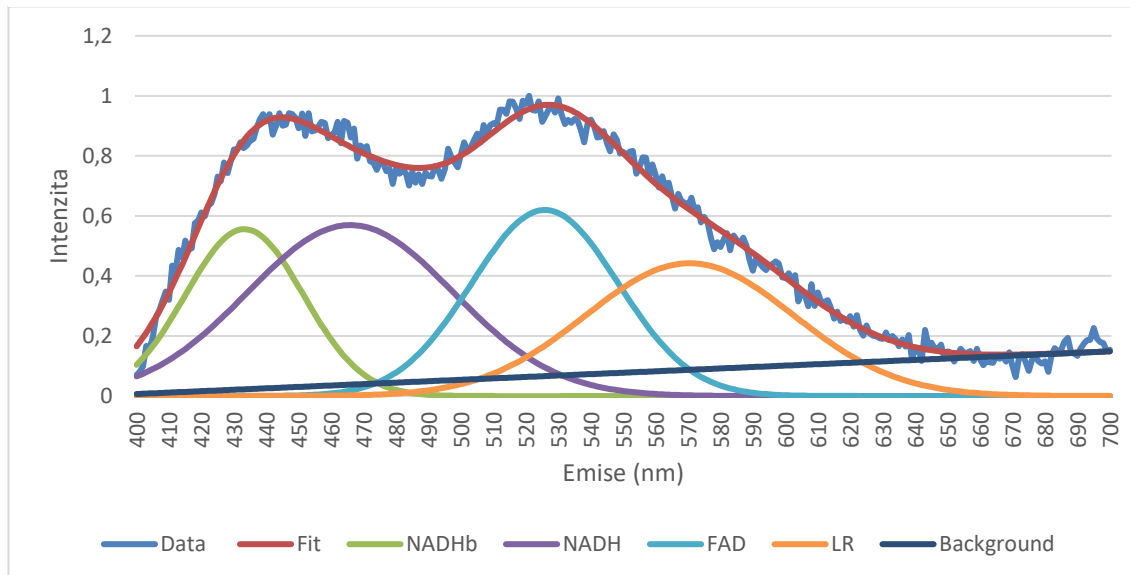
V grafu 3.1 jsou korigovaná data fluorescence 3T3 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.1: Fluorescenční spektrum 3T3, pH 7,2, T lab, exc. 365 nm



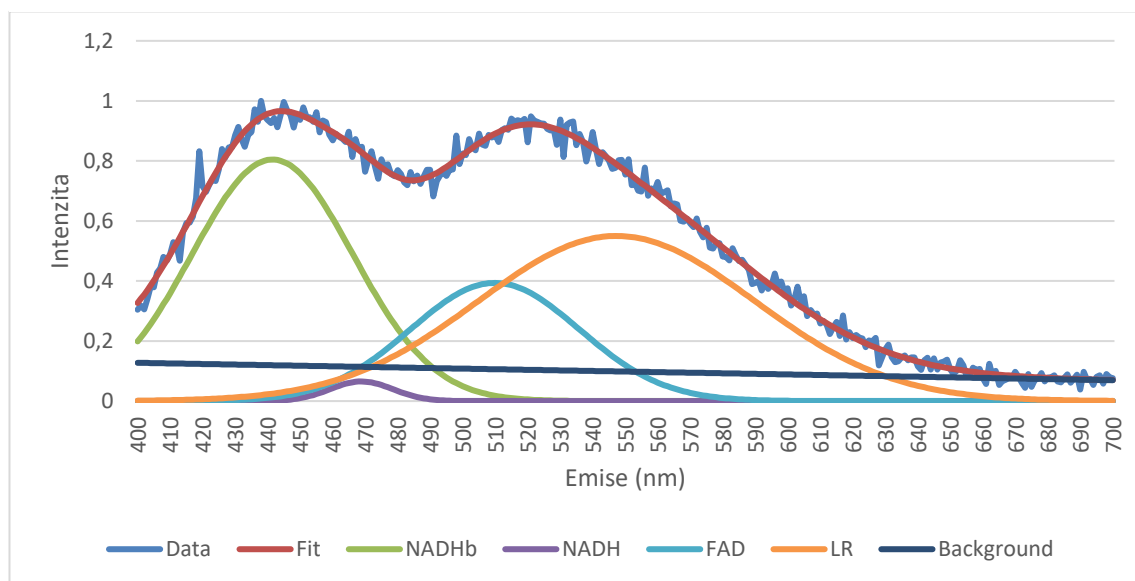
V grafu 3.2 jsou korigovaná data fluorescence CT26 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.2: Fluorescenční spektrum CT26, pH 7,2, T lab, exc. 365 nm



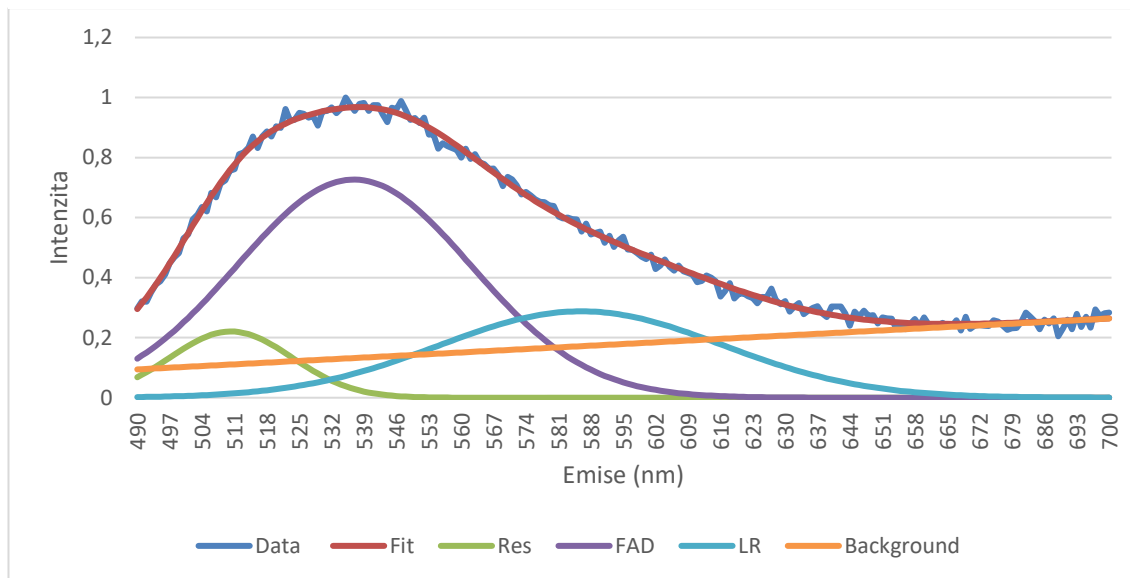
V grafu 3.3 jsou korigovaná data fluorescence SNU475 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.3: Fluorescenční spektrum SNU475, pH 7,2, T lab, exc. 365 nm



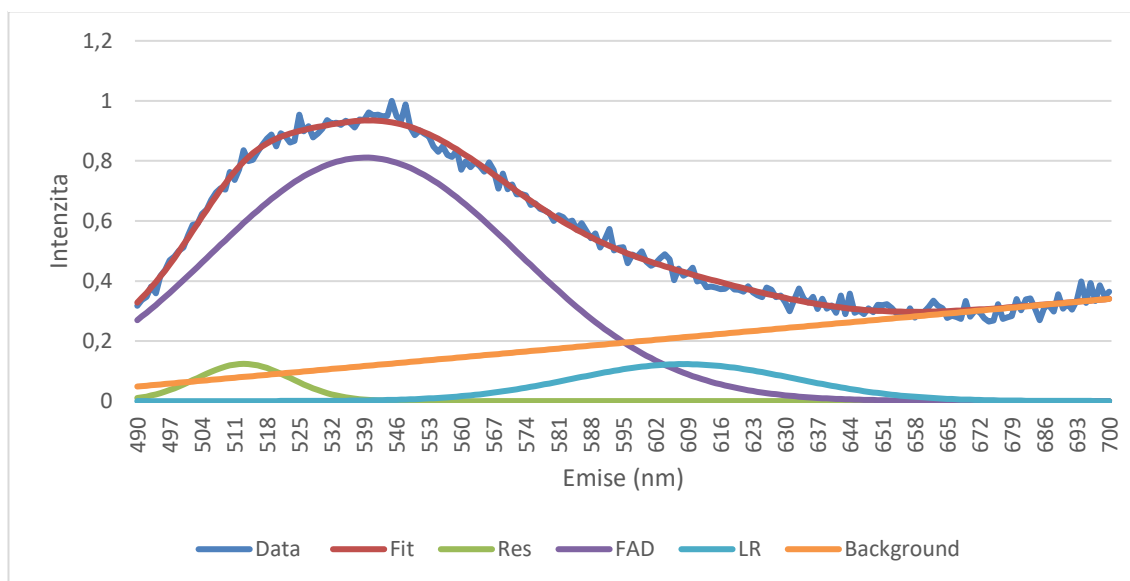
V grafu 3.4 jsou korigovaná data fluorescence 3T3 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.4: Fluorescenční spektrum 3T3, pH 7,2, T lab, exc. 460 nm



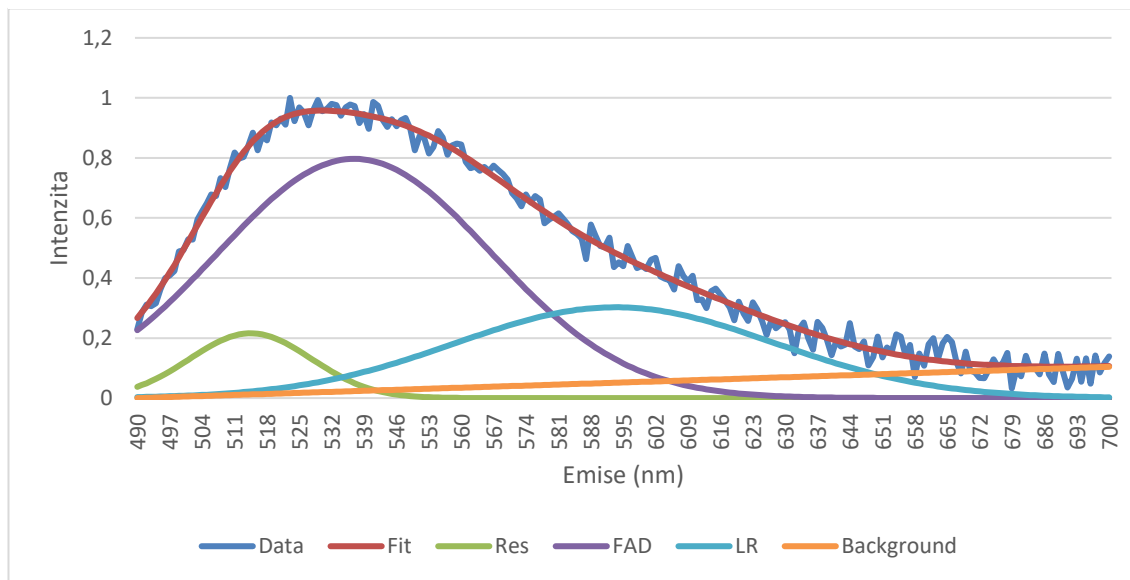
V grafu 3.5 jsou korigovaná data fluorescence CT26 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.5: Fluorescenční spektrum CT26, pH 7,2, T lab, exc. 460 nm



V grafu 3.6 jsou korigovaná data fluorescence SNU475 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

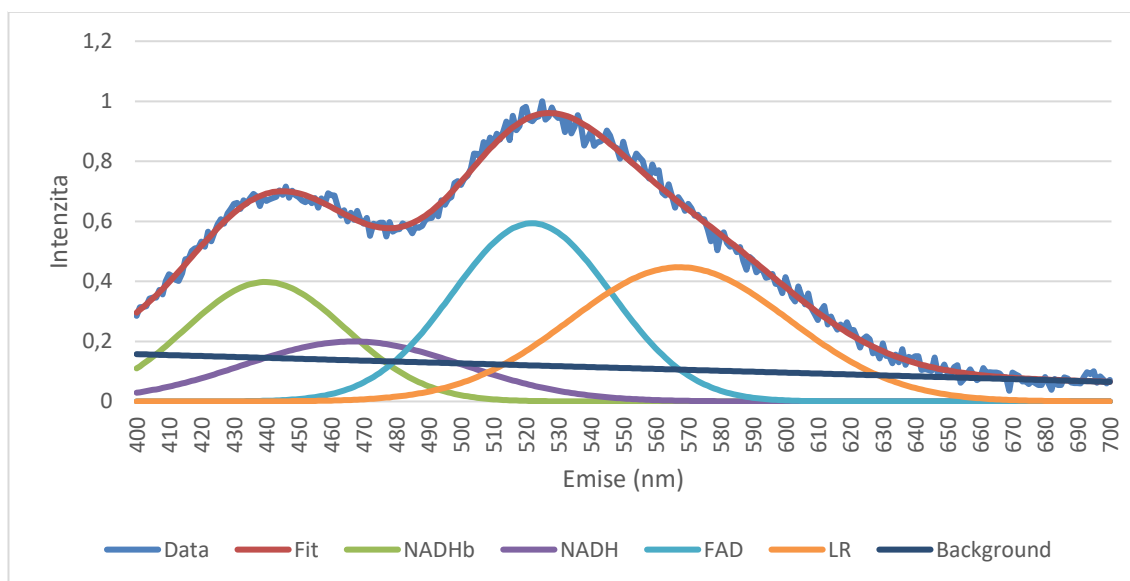
Graf 3.6: Fluorescenční spektrum SNU475, pH 7,2, T lab, exc. 460 nm



### 3.1.2 Fluorescenční spektra při pH 6,2 a laboratorní teplotě

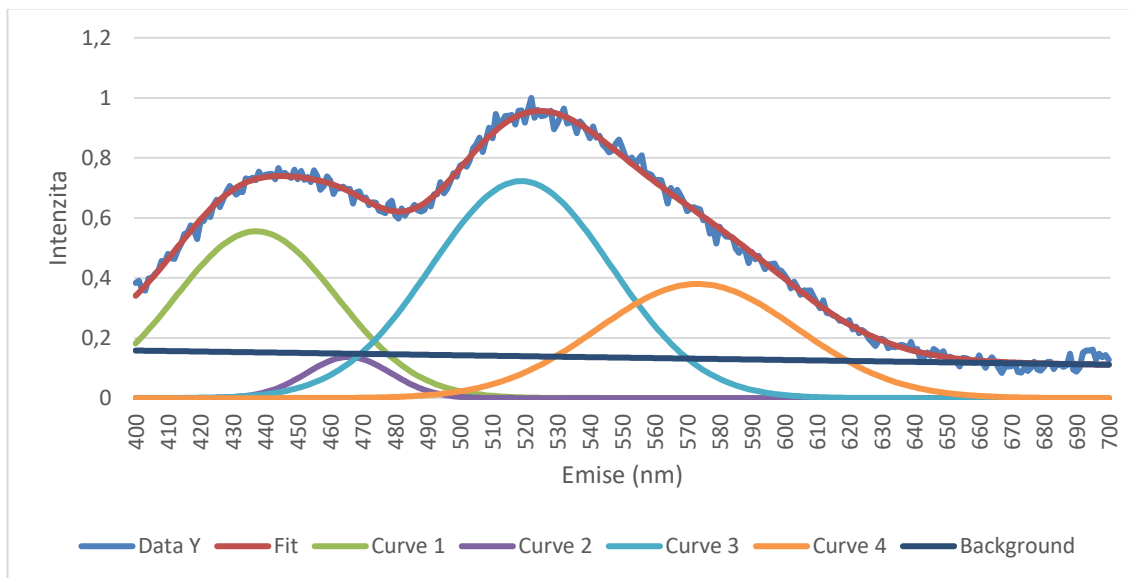
V grafu 3.7 jsou korigovaná data fluorescence 3T3 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.7: Fluorescenční spektrum 3T3, pH 6,2, T lab, exc. 365 nm



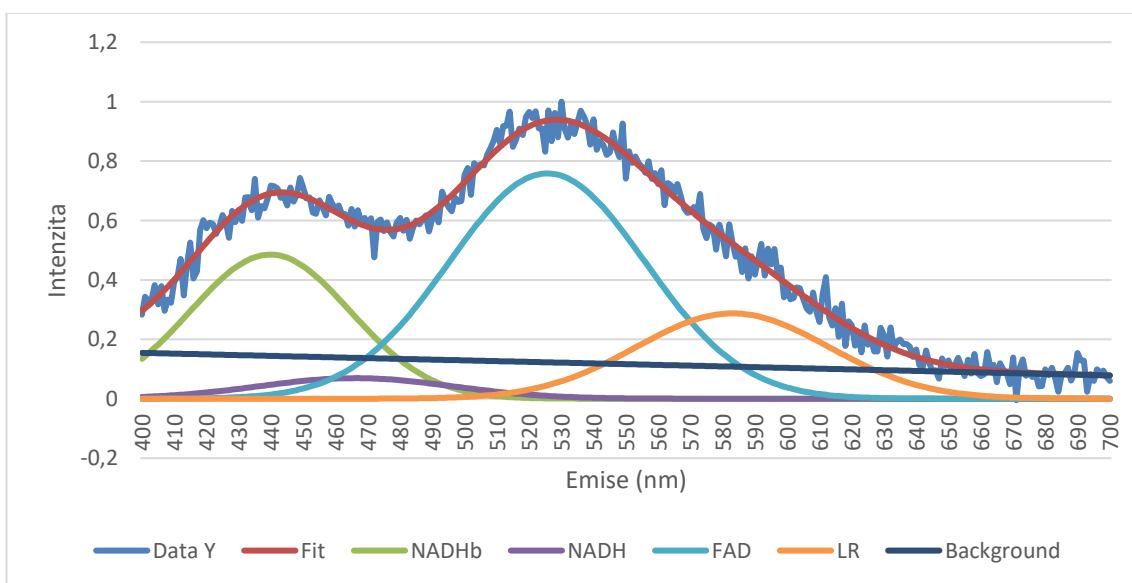
V grafu 3.8 jsou korigovaná data fluorescence CT26 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.8: Fluorescenční spektrum CT26, pH 6,2, T lab, exc. 365 nm



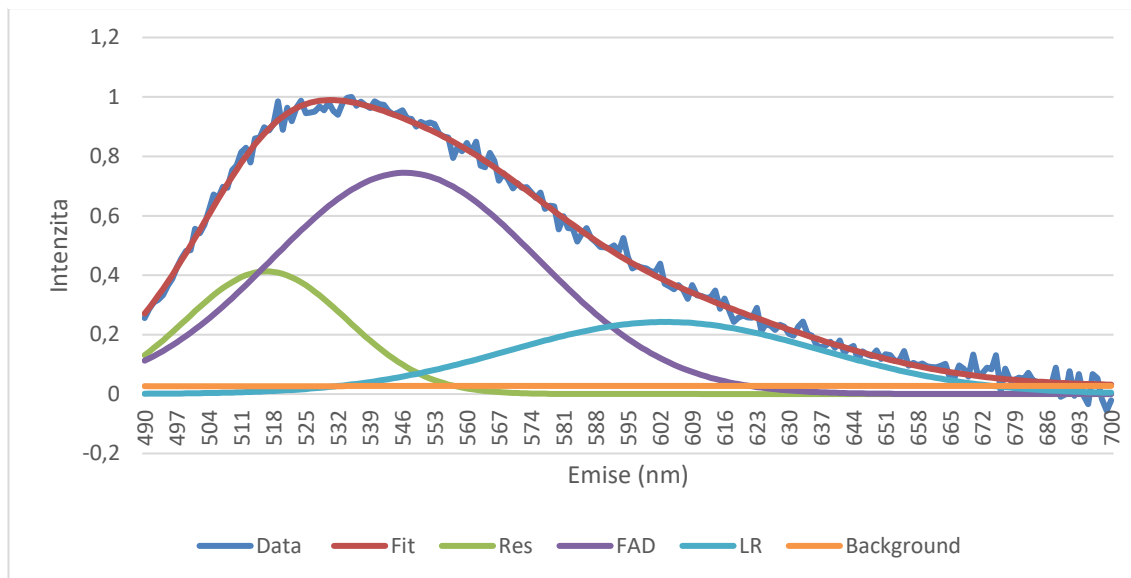
V grafu 3.9 jsou korigovaná data fluorescence SNU475 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.9: Fluorescenční spektrum SNU475, pH 6,2, T lab, exc. 365 nm



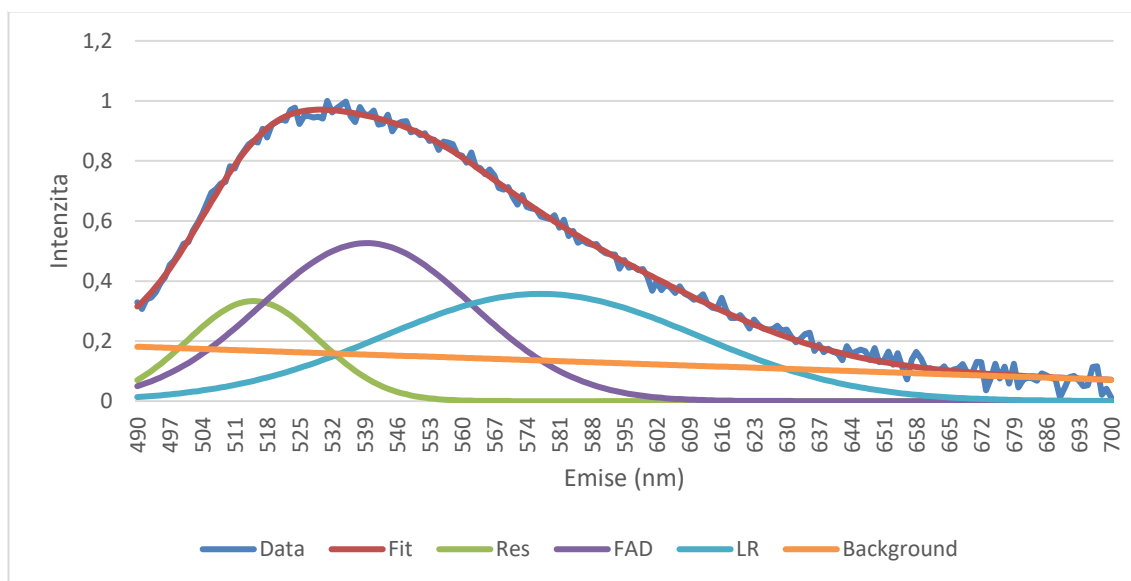
V grafu 3.10 jsou korigovaná data fluorescence 3T3 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.10: Fluorescenční spektrum 3T3, pH 6,2, T lab, exc. 460 nm



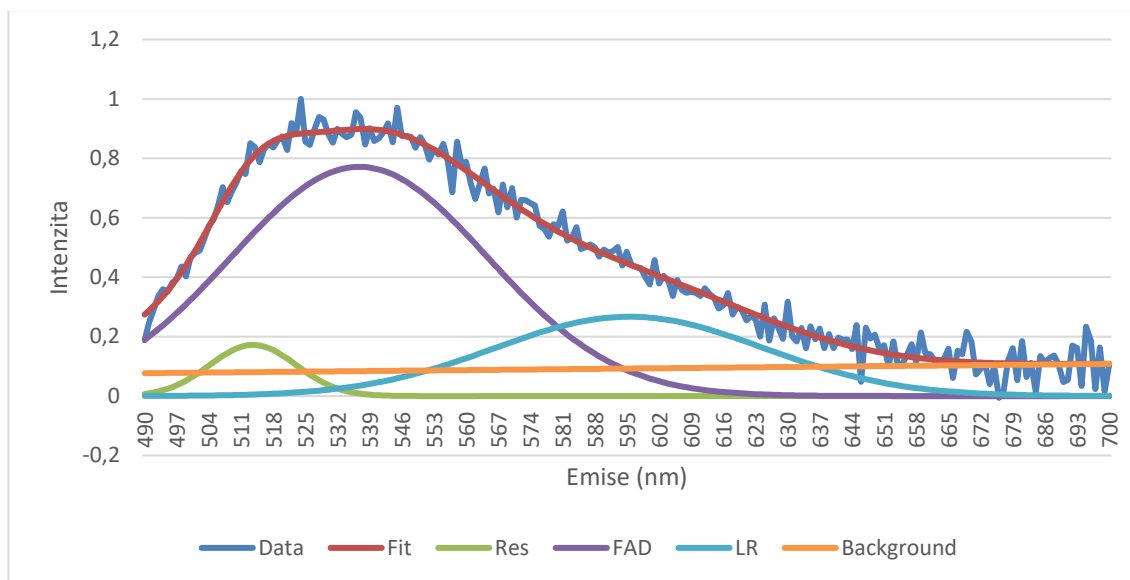
V grafu 3.11 jsou korigovaná data fluorescence CT26 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.11: Fluorescenční spektrum CT26, pH 6,2, T lab, exc. 460 nm



V grafu 3.12 jsou korigovaná data fluorescence SNU475 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

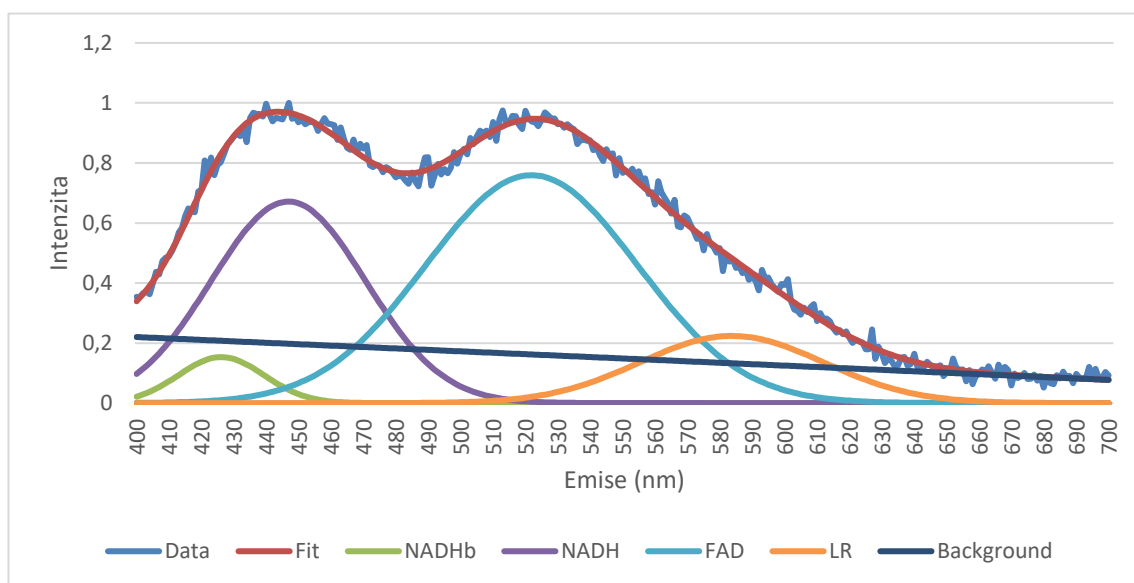
Graf 3.12: Fluorescenční spektrum SNU475, pH 6,2, T lab, exc. 460 nm



### 3.1.3 Fluorescenční spektra při pH 7,2 a teplotě 37 °C

V grafu 3.13 jsou korigovaná data fluorescence 3T3 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

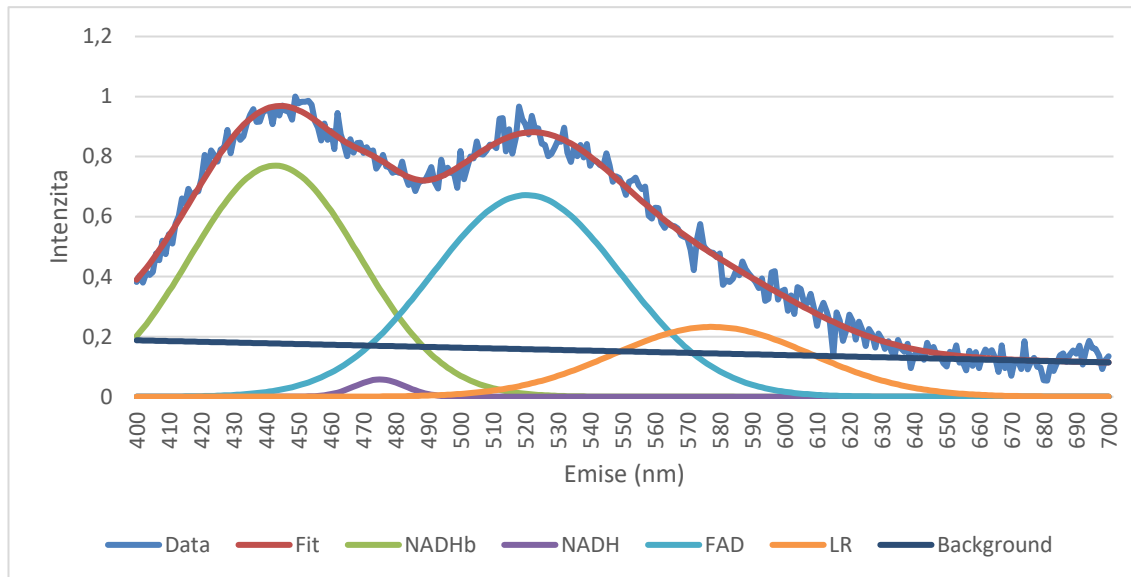
Graf 3.13: Fluorescenční spektrum 3T3, pH 7,2, T 37 °C, exc. 365 nm





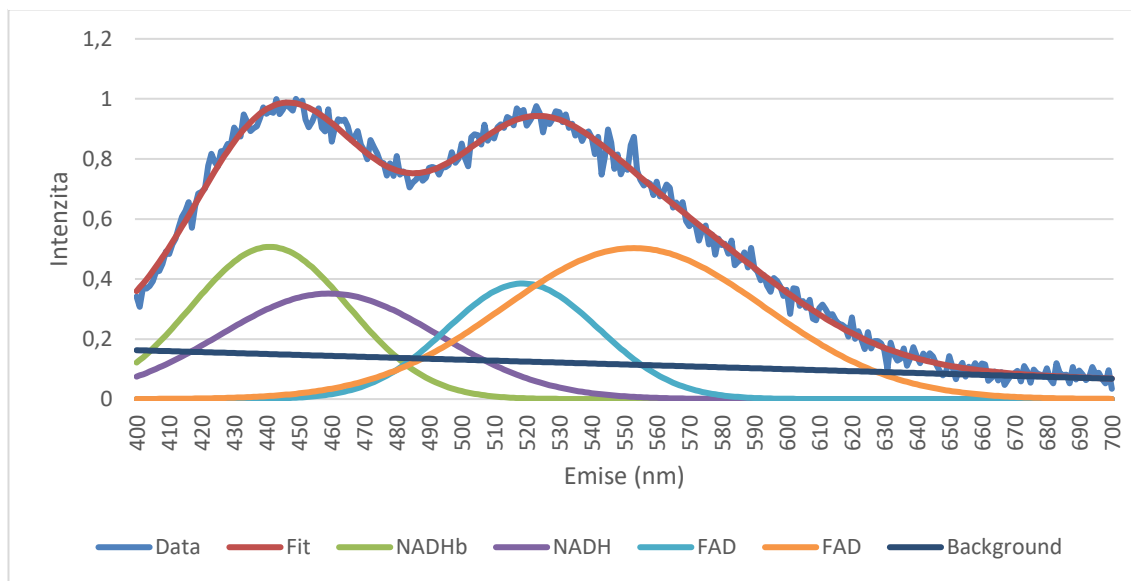
V grafu 3.14 jsou korigovaná data fluorescence CT26 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.14: Fluorescenční spektrum CT26, pH 7,2, T 37 °C, exc. 365 nm



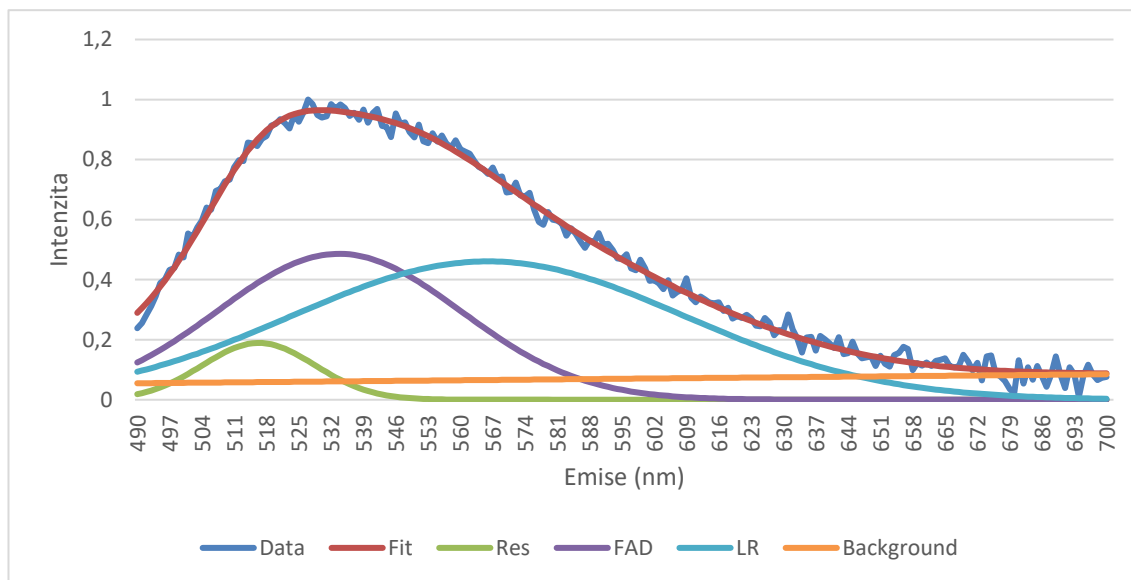
V grafu 3.15 jsou korigovaná data fluorescence SNU475 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.15: Fluorescenční spektrum SNU475, pH 7,2, T 37 °C, exc. 365 nm



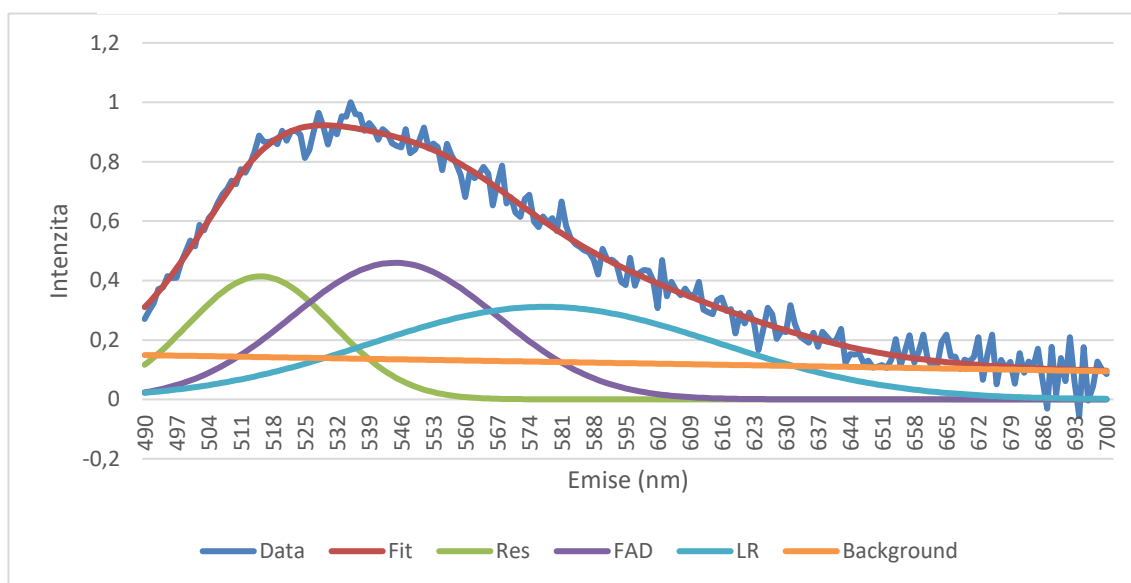
V grafu 3.16 jsou korigovaná data fluorescence 3T3 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.16: Fluorescenční spektrum 3T3, pH 7,2, T 37 °C, exc. 460 nm



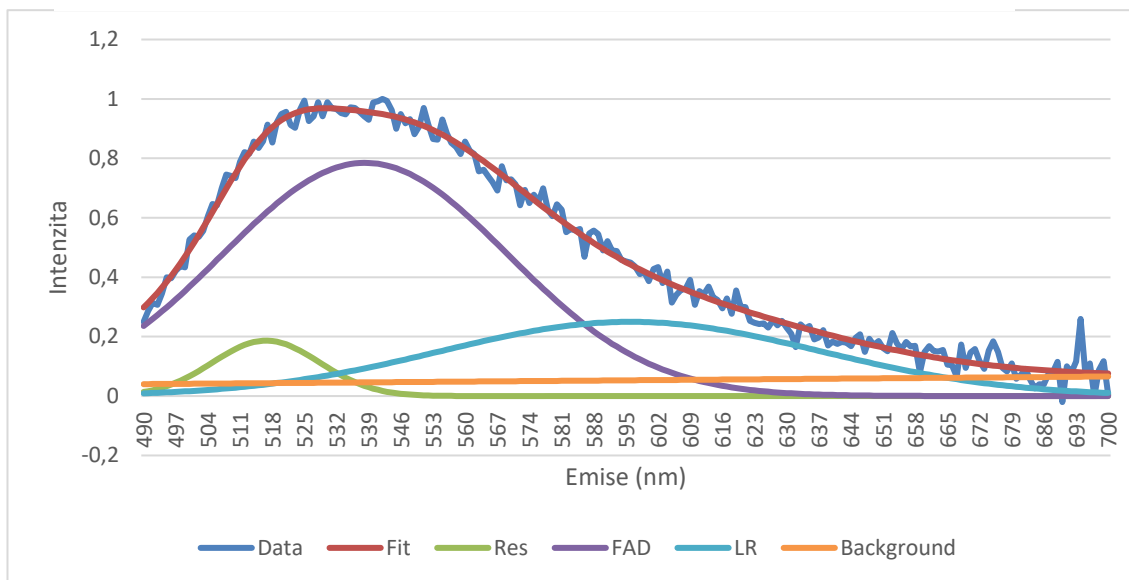
V grafu 3.17 jsou korigovaná data fluorescence CT26 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.17: : Fluorescenční spektrum CT26, pH 7,2, T 37 °C, exc. 460 nm



V grafu 3.18 jsou korigovaná data fluorescence 3T3 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

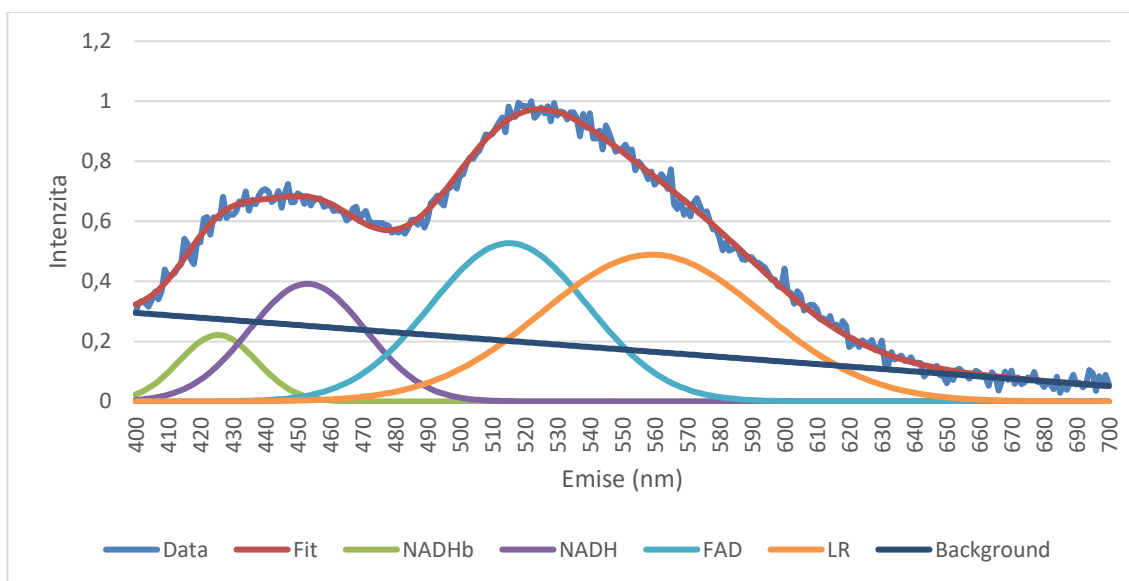
Graf 3.18: Fluorescenční spektrum SNU475, pH 7,2, T 37 °C, exc. 460 nm



### 3.1.4 Fluorescenční spektra při pH 6,2 a teplotě 37 °C

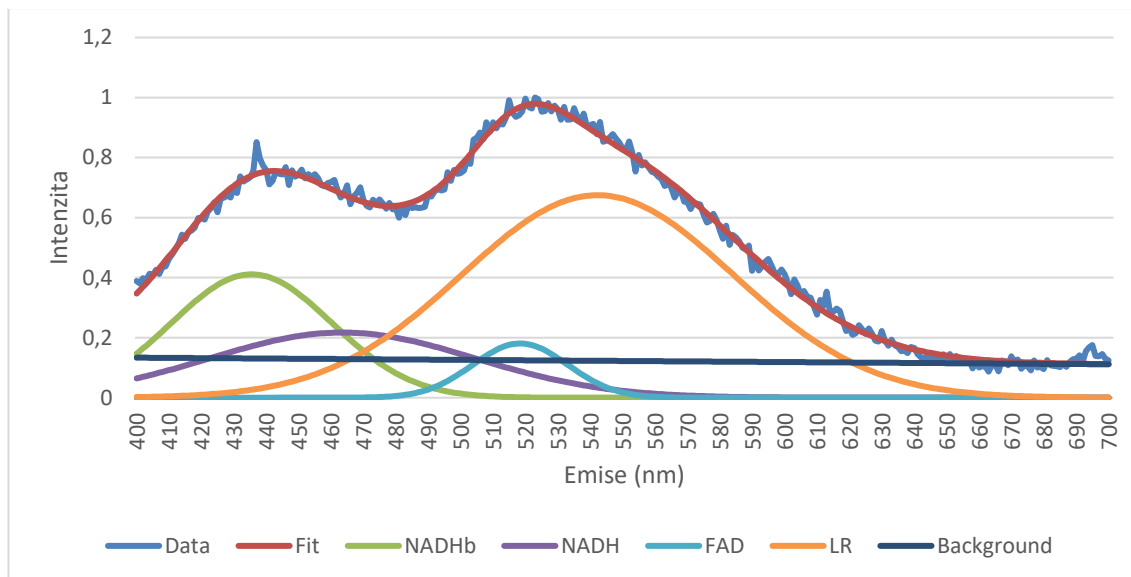
V grafu 3.19 jsou korigovaná data fluorescence 3T3 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.19: Fluorescenční spektrum 3T3, pH 6,2, T 37 °C, exc. 365 nm



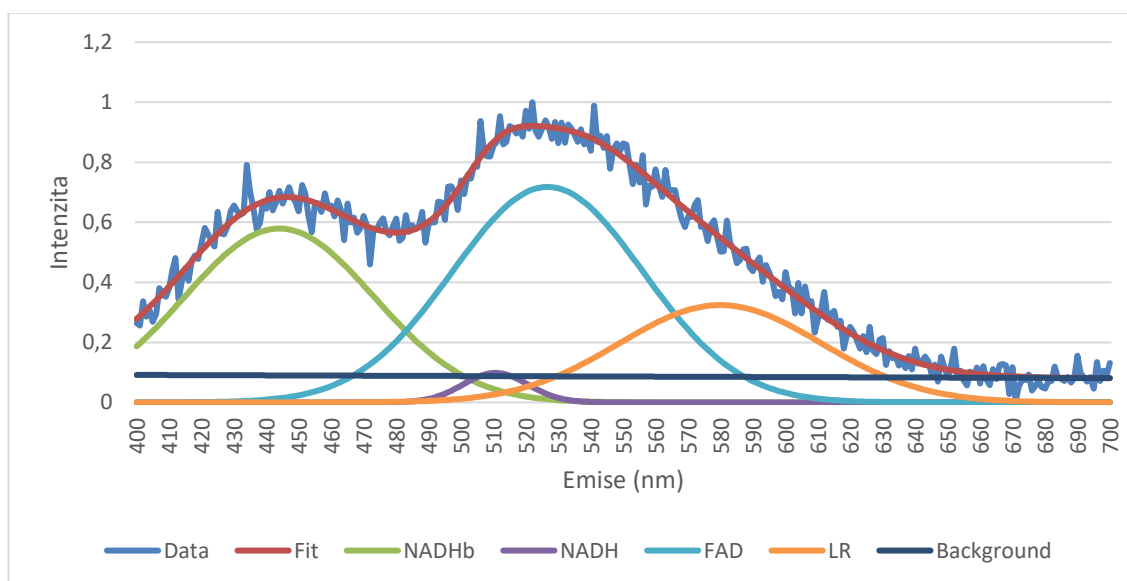
V grafu 3.20 jsou korigovaná data fluorescence CT26 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.20: Fluorescenční spektrum CT26, pH 6,2, T 37 °C, exc. 365 nm



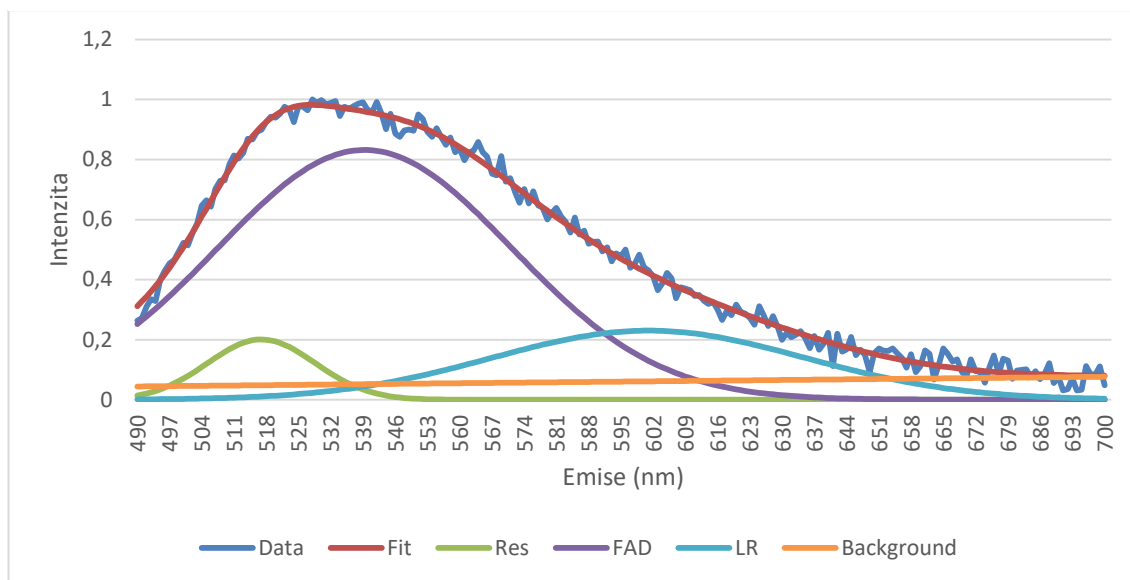
V grafu 3.21 jsou korigovaná data fluorescence SNU475 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.21: Fluorescenční spektrum SNU475, pH 6,2, T 37 °C, exc. 365 nm



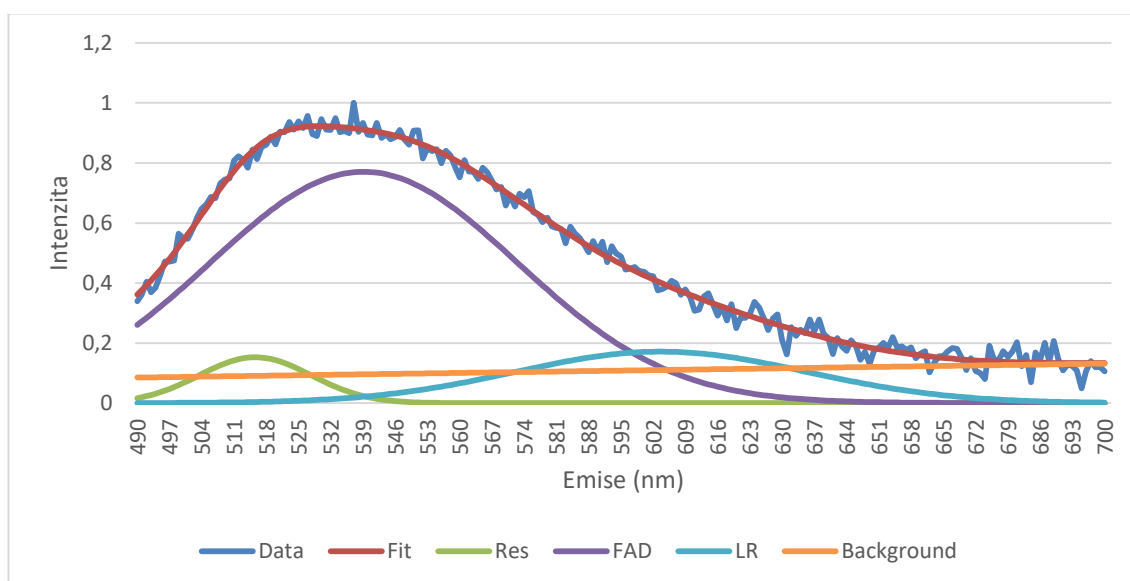
V grafu 3.22 jsou korigovaná data fluorescence 3T3 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.22: Fluorescenční spektrum 3T3, pH 6,2, T 37 °C, exc. 460 nm



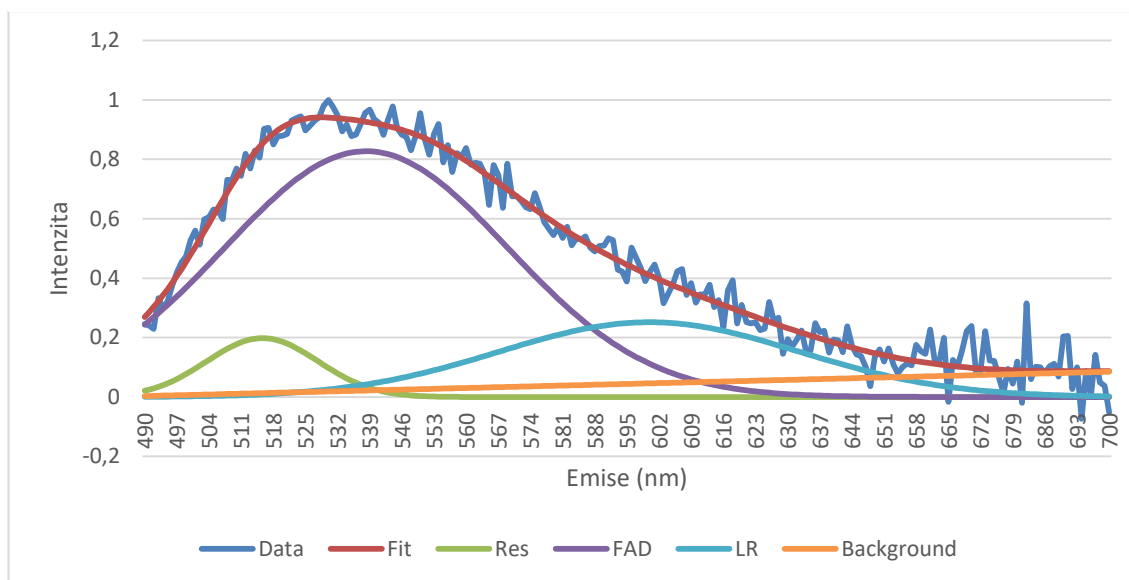
V grafu 3.23 jsou korigovaná data fluorescence CT26 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.23: Fluorescenční spektrum CT26, pH 6,2, T 37 °C, exc. 460 nm



V grafu 3.24 jsou korigovaná data fluorescence SNU475 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.24: Fluorescenční spektrum SNU475, pH 6,2, T 37 °C, exc. 460 nm



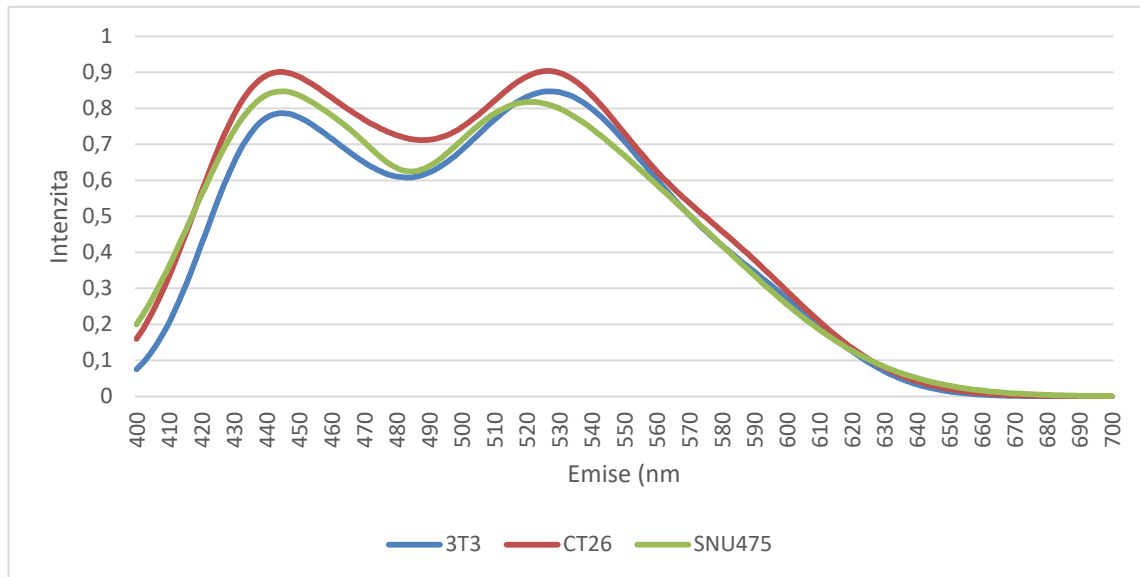
### 3.2 Porovnání emisních spekter 3T3, CT26 a SNU475 při stejných podmínkách

V této části budou v rámci grafů porovnány fity emisních spekter po odečtení backgroundu všech tří druhů buněk při stejných podmínkách. Označení křivek v grafech je podle typu buněk. Spektra budou porovnána pro excitační vlnovou délku 365 a 460 nm. Osa x označuje emisní vlnovou délku v nm, osa y označuje normalizovanou intenzitu emise v úrovni od 0 do 1.

### 3.2.1 Porovnání spekter při pH 7,2 a laboratorní teplotě

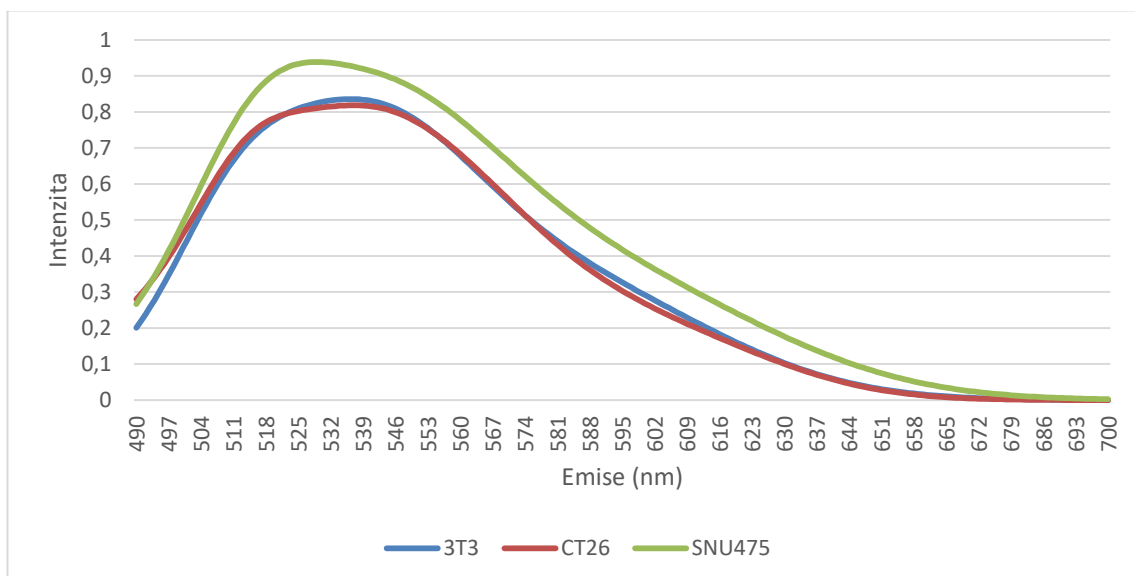
V grafu 3.25 jsou porovnány fity emisních spekter buněk 3T3, CT26 a SNU475 při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.25: Porovnání spekter 3T3, CT26 a SNU475, pH 7,2, T lab, exc. 365 nm



V grafu 3.26 jsou porovnány fity emisních spekter buněk 3T3, CT26 a SNU475 při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

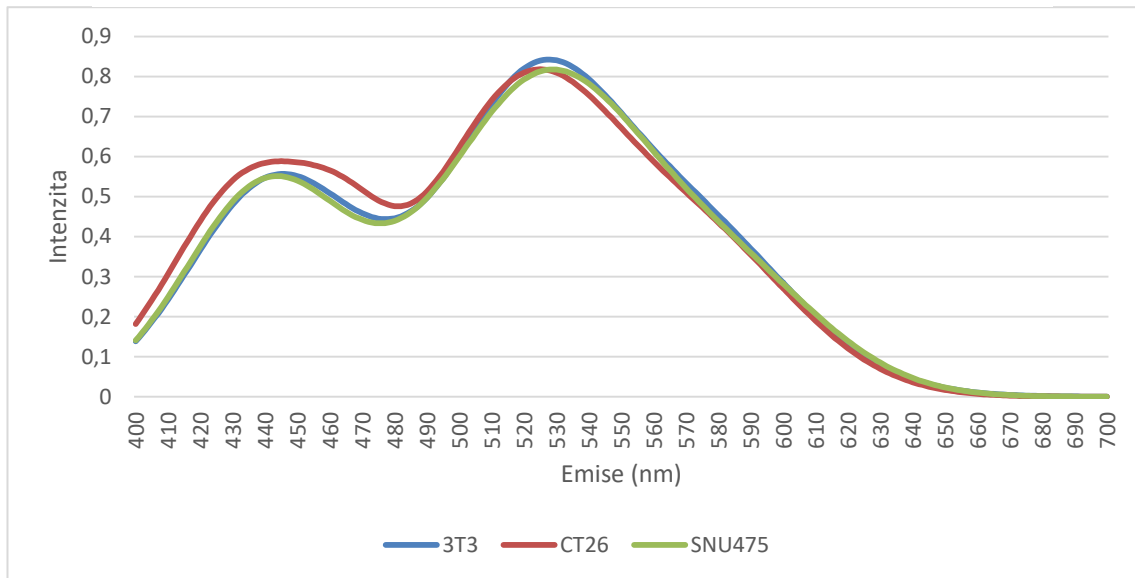
Graf 3.26: Porovnání spekter 3T3, CT26 a SNU475, pH 7,2, T lab, exc. 460 nm



### 3.2.2 Porovnání spekter při pH 6,2 a laboratorní teplotě

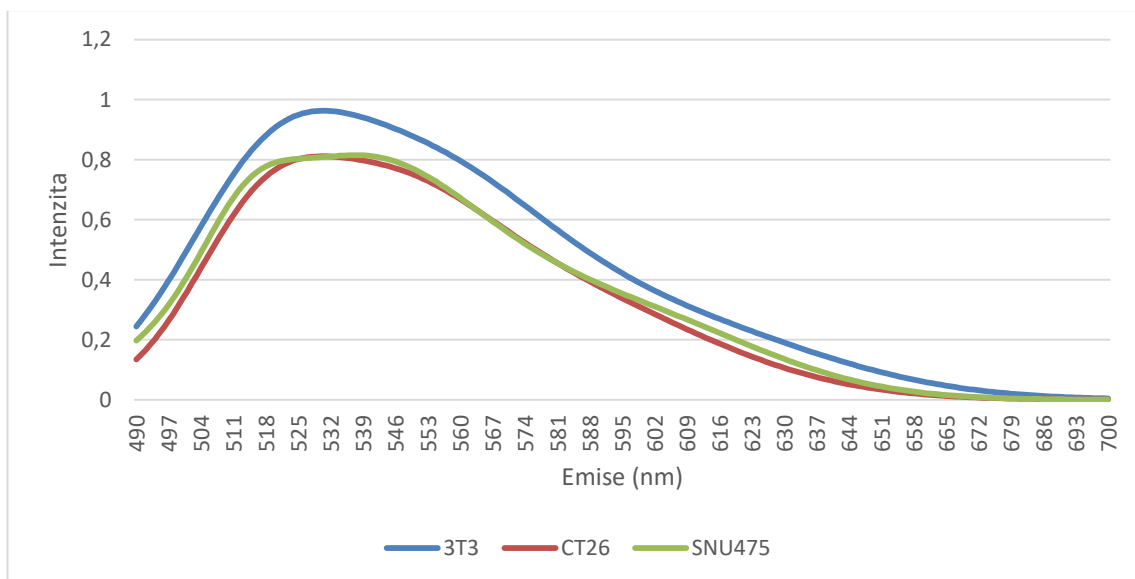
V grafu 3.27 jsou porovnány fity emisních spekter buněk 3T3, CT26 a SNU475 při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.27: Porovnání spekter 3T3, CT26 a SNU475, pH 6,2, T lab, exc. 365 nm



V grafu 3.28 jsou porovnány fity emisních spekter buněk 3T3, CT26 a SNU475 při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.28: Porovnání spekter 3T3, CT26 a SNU475, pH 6,2, T lab, exc. 460 nm

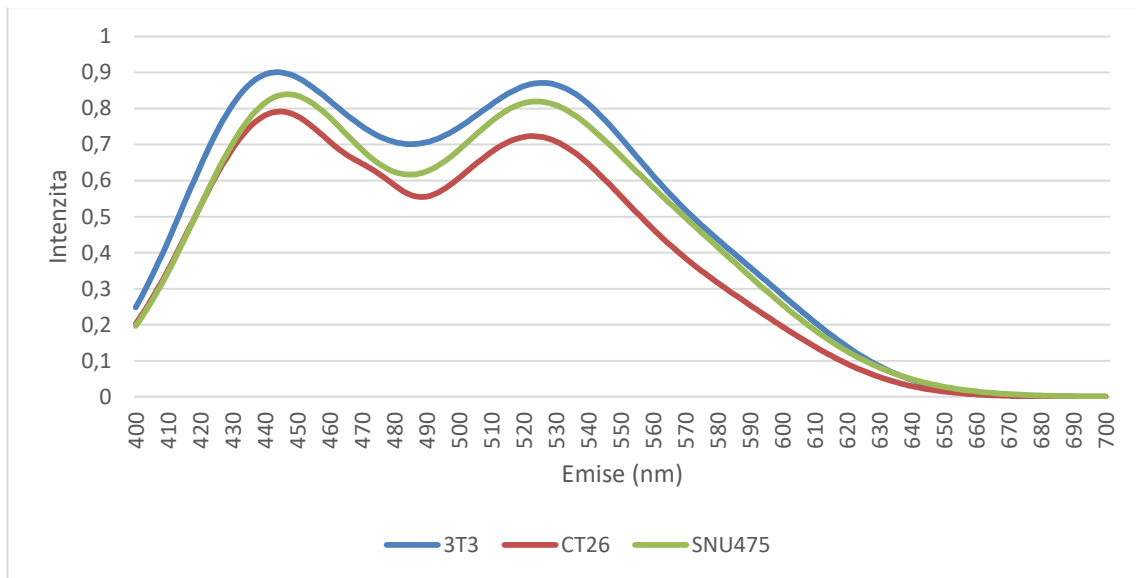




### 3.2.3 Porovnání spekter při pH 7,2 a teplotě 37 °C

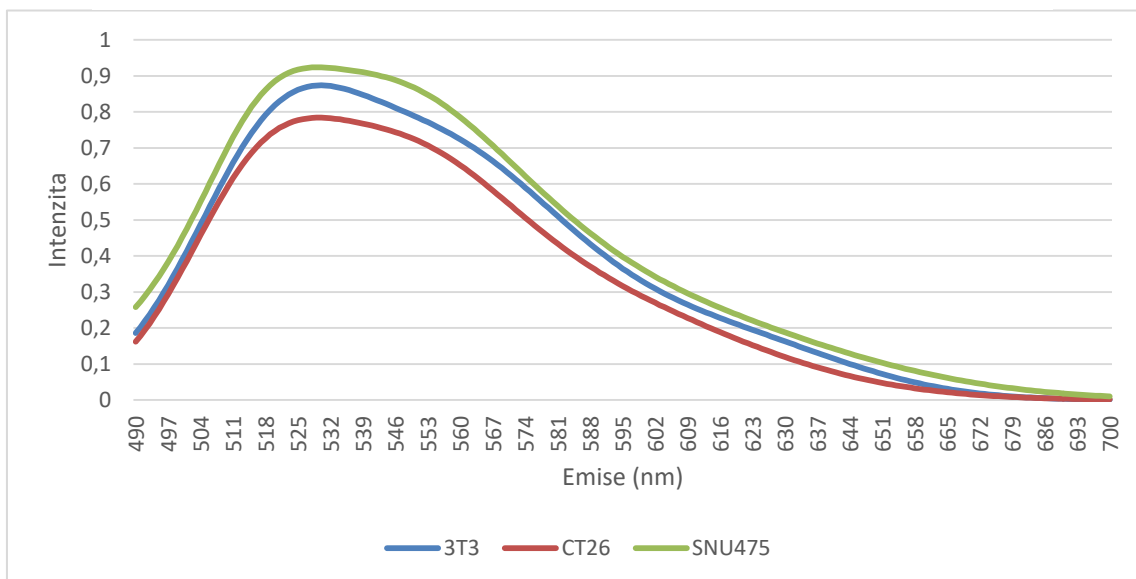
V grafu 3.29 jsou porovnány fity emisních spekter buněk 3T3, CT26 a SNU475 při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.29: Porovnání spekter 3T3, CT26 a SNU475, pH 7,2, T 37 °C, exc. 365 nm



V grafu 3.30 jsou porovnány fity emisních spekter buněk 3T3, CT26 a SNU475 při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

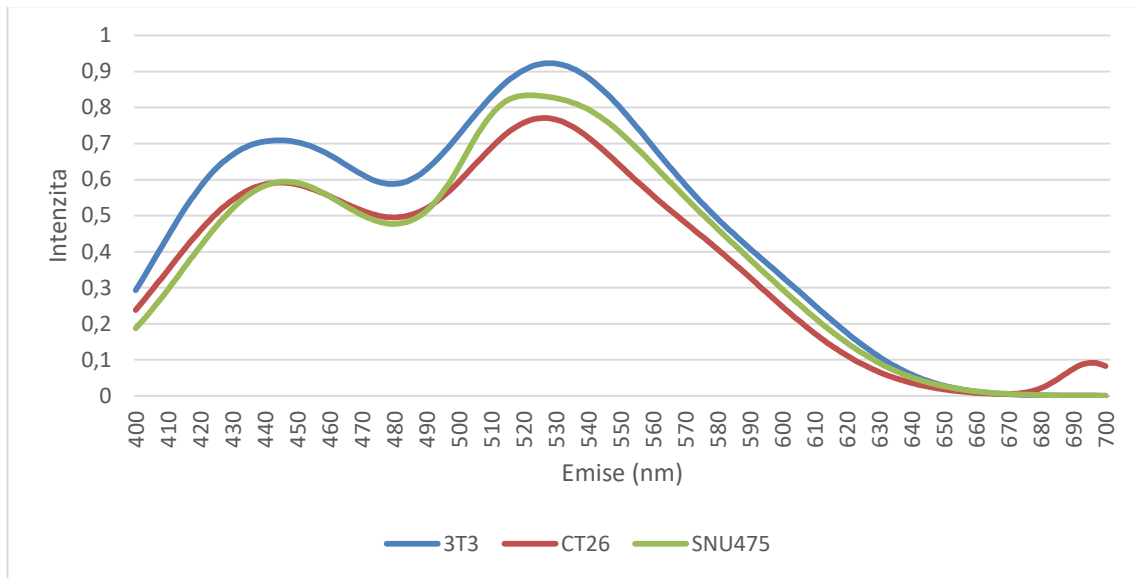
Graf 3.30: Porovnání spekter 3T3, CT26 a SNU475, pH 7,2, T 37 °C, exc. 460 nm



### 3.2.4 Porovnání spekter při pH 6,2 a teplotě 37 °C

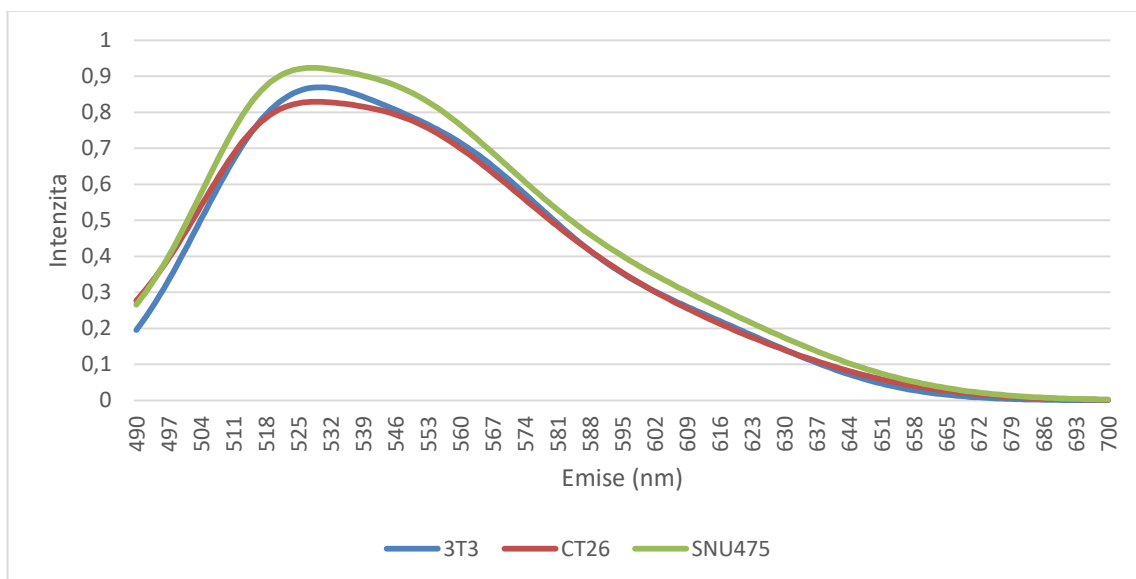
V grafu 3.31 jsou porovnány fity emisních spekter buněk 3T3, CT26 a SNU475 při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.31: Porovnání spekter 3T3, CT26 a SNU475, pH 6,2, T 37 °C, exc. 365 nm



V grafu 3.32 jsou porovnány fity emisních spekter buněk 3T3, CT26 a SNU475 při excitaci vlnovou délkou 460 nm.

Graf 3.32: Porovnání spekter 3T3, CT26 a SNU475, pH 6,2, T 37 °C, exc. 460 nm



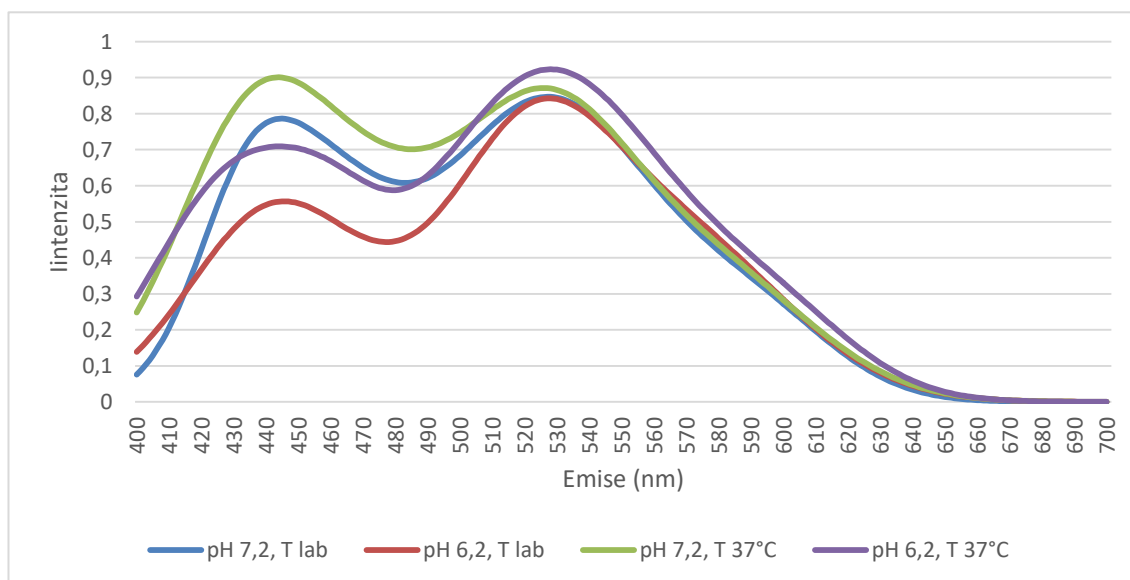
### 3.3 Porovnání emisních spekter 3T3, CT26 a SNU475 při různých pH a různých teplotách

V této části budou v rámci jednoho grafu porovnány čtyři emisní spektra všech tří druhů buněk zvláště při různých hodnotách pH a teploty pro excitační záření 365 a 460 nm. Označení křivek v grafech odpovídá pH a teplotě při měření. Osa x označuje emisní vlnovou délku v nm, osa y označuje normalizovanou intenzitu emise v úrovni od 0 do 1.

#### 3.3.1 Porovnání fluorescenčních spekter 3T3 při různých podmínkách

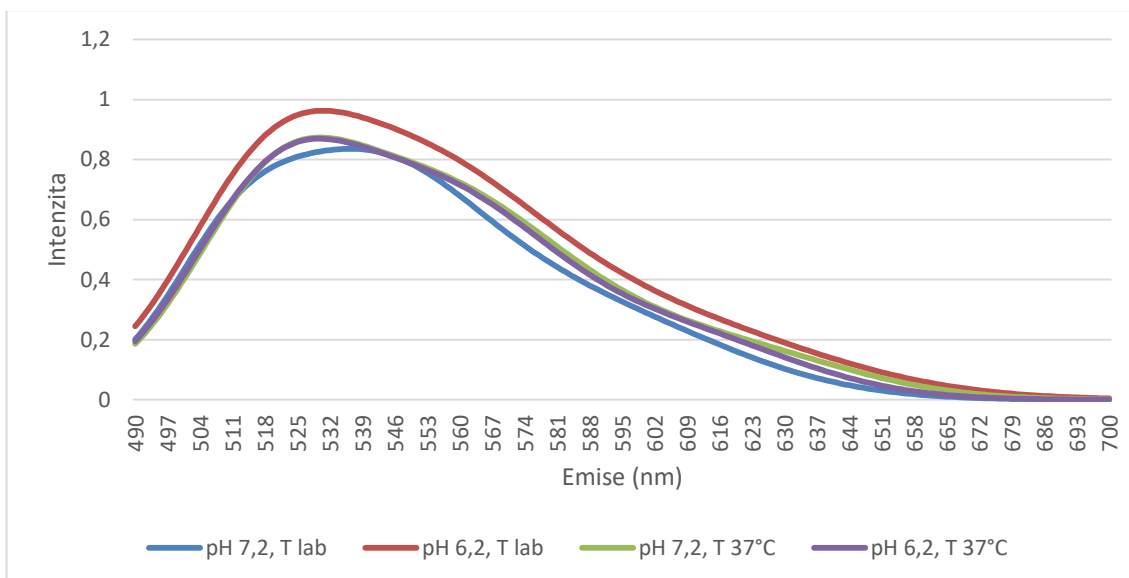
V grafu 3.33 jsou porovnány čtyři emisní spektra buněk 3T3 za pH 7,2 a 6,2 a při laboratorní teplotě a 37 °C při excitaci 365 nm.

Graf 3.33: Porovnání spekter 3T3 při různých podmínkách při excitaci 365 nm



V grafu 3.34 jsou porovnány fity emisních spekter buněk 3T3 za pH 7,2 a 6,2 a při laboratorní teplotě a 37 °C při excitaci 460 nm.

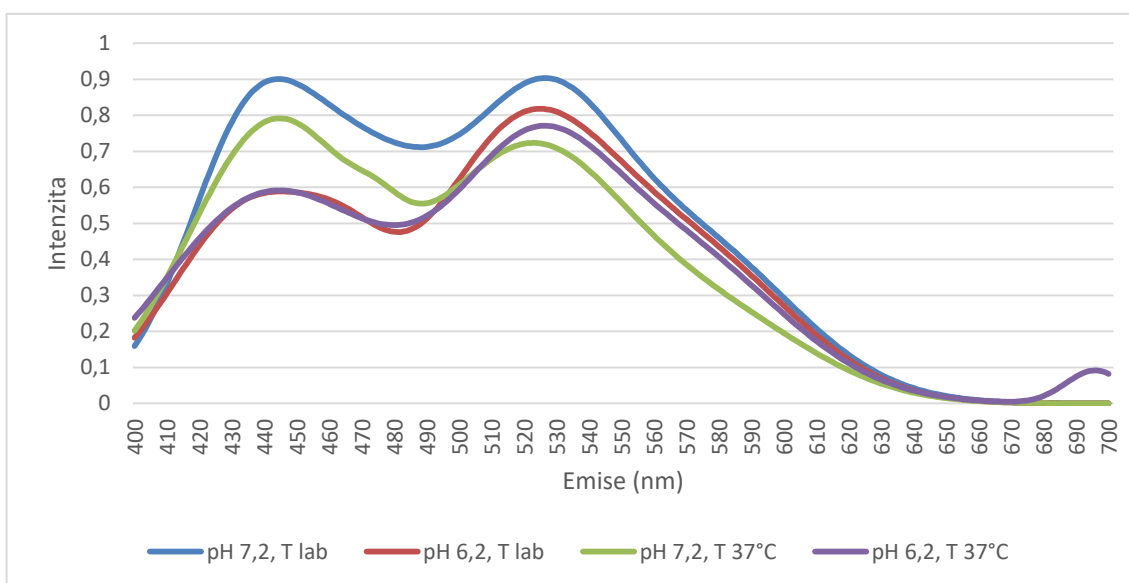
Graf 3.34: Porovnání spekter 3T3 při různých podmínkách při excitaci 460 nm



### 3.3.2 Porovnání fluorescenčních spekter CT26 při různých podmínkách

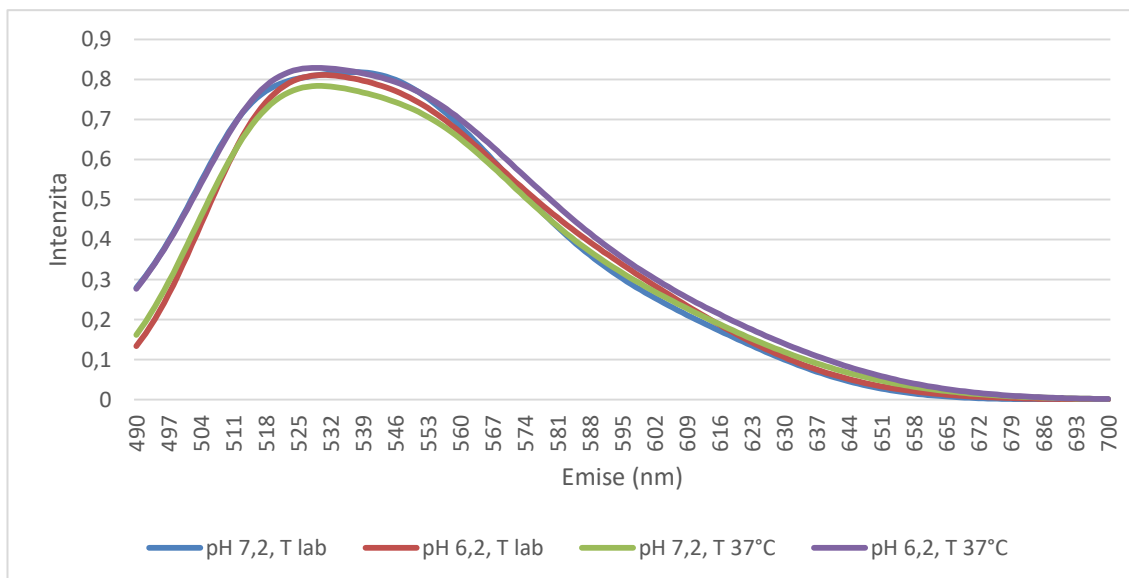
V grafu 3.35 jsou porovnány fity emisních spekter buněk CT26 za pH 7,2 a 6,2 a při laboratorní teplotě a 37 °C při excitaci 365 nm.

Graf 3.35: Porovnání spekter CT26 při různých podmínkách při excitaci 365 nm



V grafu 3.36 jsou porovnány fity emisních spekter buněk CT26 za pH 7,2 a 6,2 a při laboratorní teplotě a 37 °C při excitaci 460 nm.

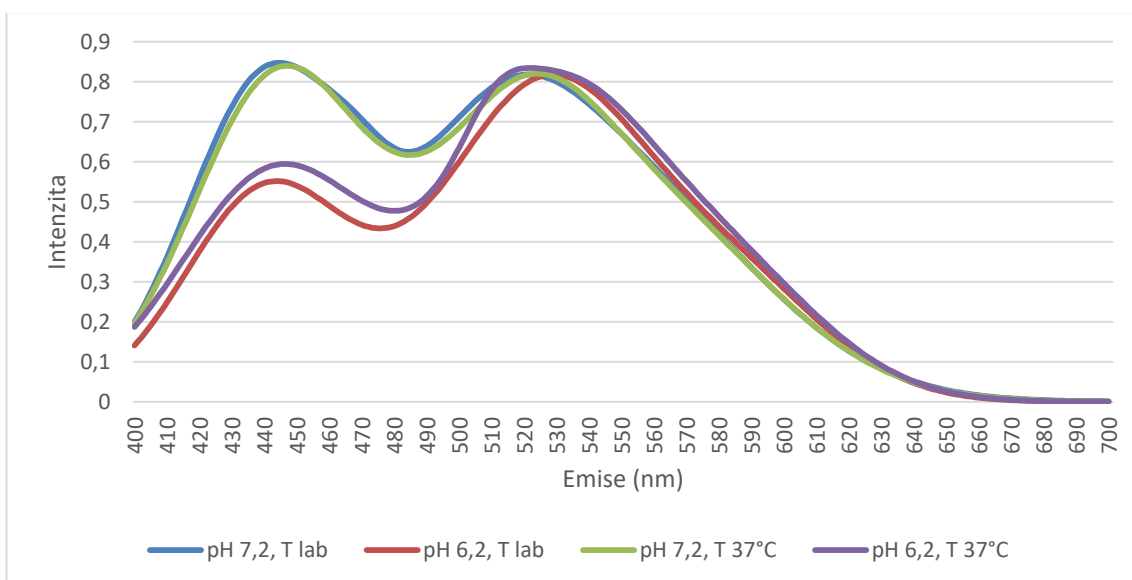
Graf 3.36: Porovnání spekter CT26 při různých podmínkách při excitaci 460 nm



### 3.3.3 Porovnání fluorescenčních spekter SNU475 při různých podmínkách

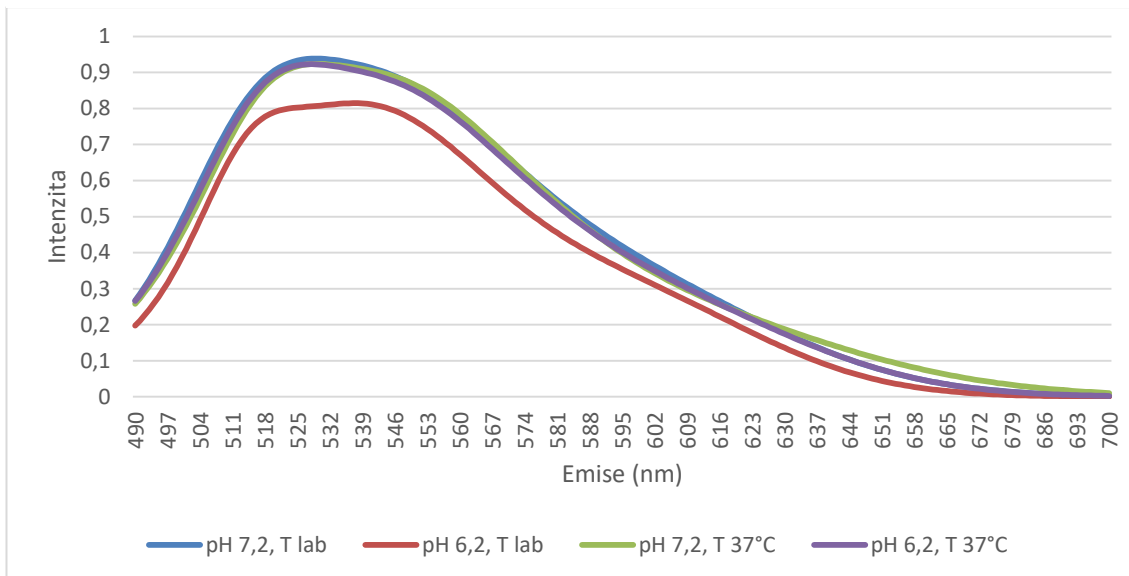
V grafu 3.37 jsou porovnány fity emisních spekter buněk SNU475 za pH 7,2 a 6,2 a při laboratorní teplotě a 37 °C při excitaci 365 nm.

Graf 3.37: Porovnání spekter SNU475 při různých podmínkách při excitaci 365 nm



V grafu 3.38 jsou porovnány fity emisních spekter buněk SNU475 za pH 7,2 a 6,2 a při laboratorní teplotě a 37 °C při excitaci 460 nm.

Graf 3.38: Porovnání spekter SNU475 při různých podmínkách při excitaci 365 nm

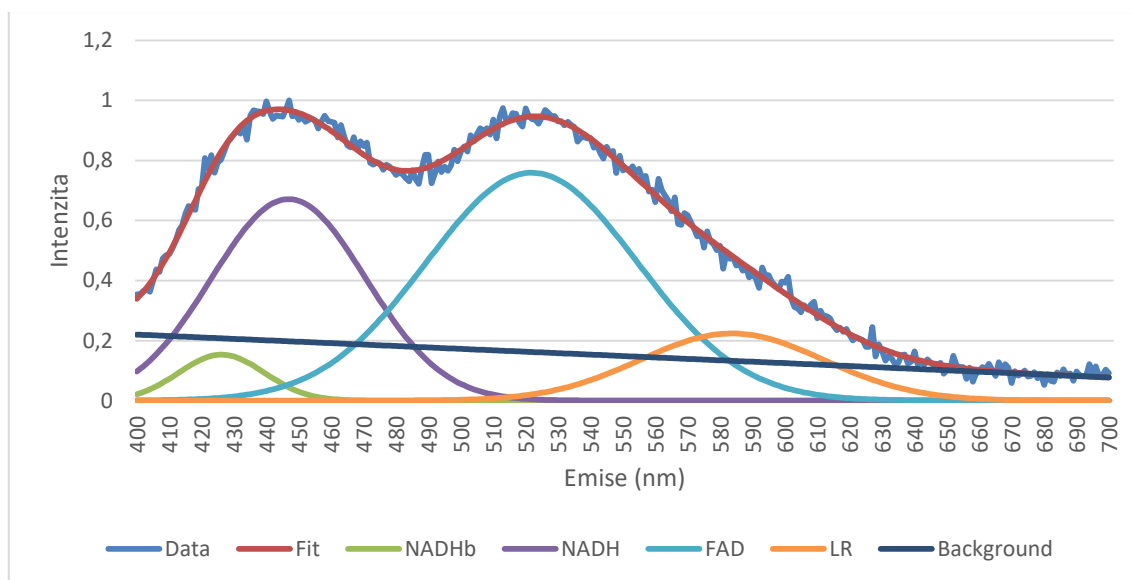


### 3.4 Průběh změny fluorescence v koncentrační řadě roztoků 3T3 a CT26

Tato část se zaměřuje na porovnání změn intenzity jednotlivých biofluoroforů, zejména vázaného NADH a volného NADH, při postupných změnách koncentrace 3T3 a CT26 v roztoku. Uvedeny jsou čisté vzorky a 5 různých úrovní koncentrací mezi nimi. Přesná procentuální zastoupení 3T3 a CT26 jsou uvedena u příslušných grafů. Jsou uvedeny křivky při excitaci 365 nm, pH 7,2 a teplotě 37°C. Označení křivek v grafech je následující: Data označuje korigovaná a normalizovaná naměřená data, Fit označuje fitovou funkci odpovídající datům, NADHb označuje vázané NADH, NADH označuje volné NADH, FAD označuje FAD, LR označuje lipofuscin, riboflavin a lipopigmenty, Background označuje šum pozadí. Osa x označuje emisní vlnovou délku v nm, osa y označuje normalizovanou intenzitu emise v úrovni od 0 do 1 v (a. u.).

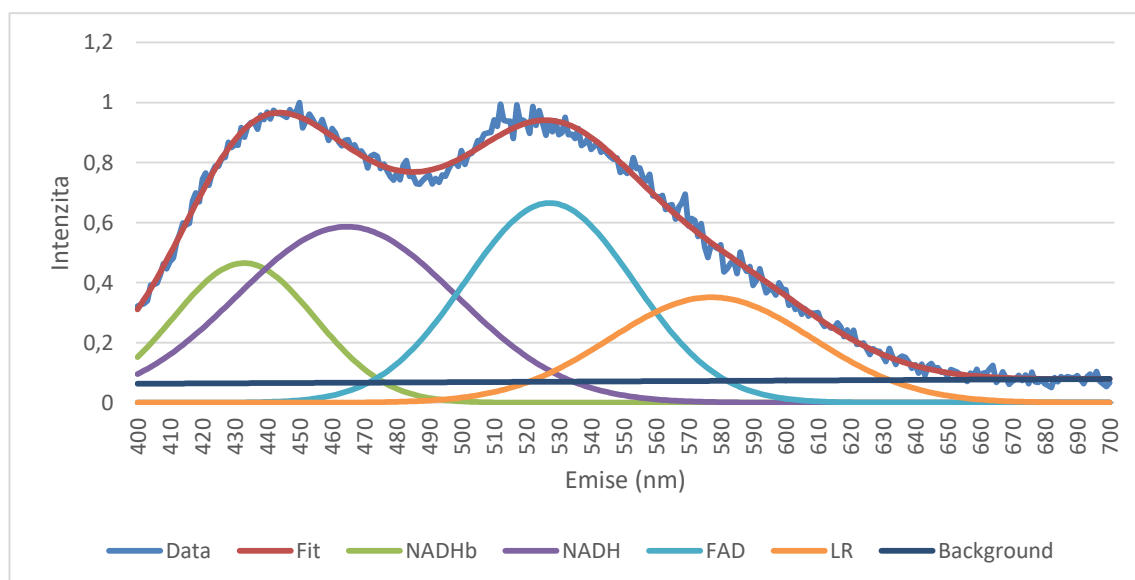
V grafu 3.39 jsou korigovaná data fluorescence 3T3 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.39: Fluorescenční spektrum 3T3, pH 7,2, T 37 °C, exc. 365 nm



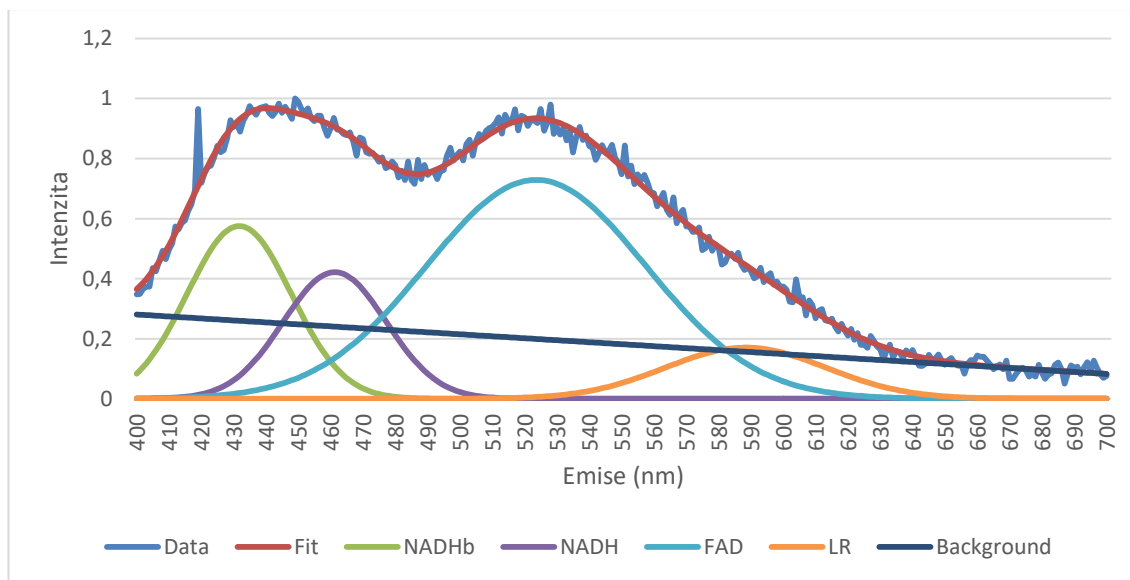
V grafu 3.40 jsou korigovaná data fluorescence směsi 3T3/CT26 v poměru 90/10 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.40: Fluorescenční spektrum 3T3/CT26 v poměru 90/10, pH 7,2, T 37 °C, exc. 365 nm



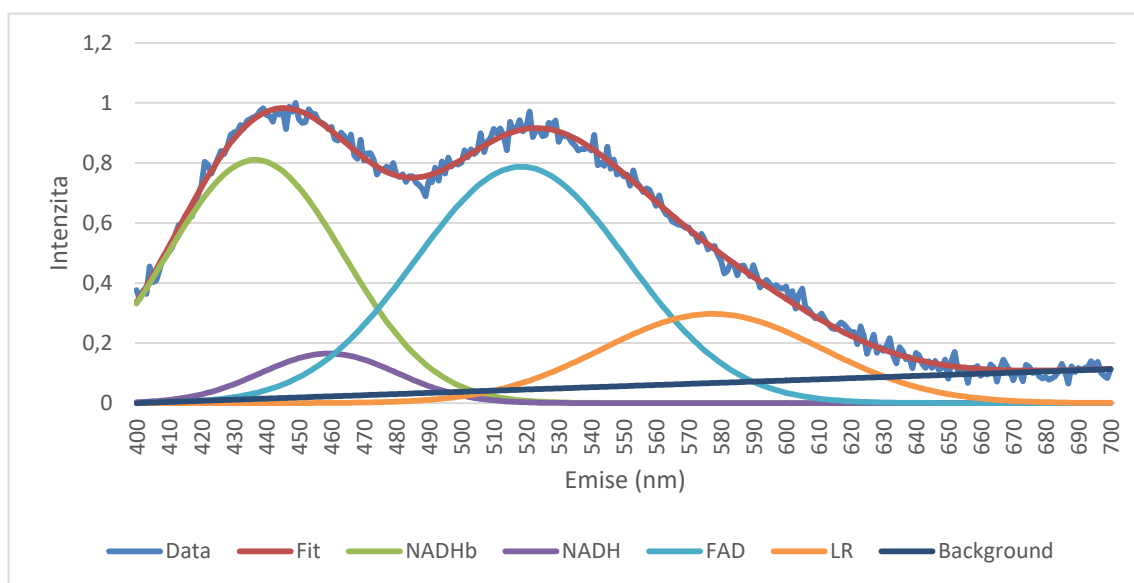
V grafu 3.41 jsou korigovaná data fluorescence směsi 3T3/CT26 v poměru 80/20 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.41: Fluorescenční spektrum 3T3/CT26 v poměru 80/20 , pH 7,2, T 37 °C, exc. 365 nm



V grafu 3.42 jsou korigovaná data fluorescence směsi 3T3/CT26 v poměru 62/38 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

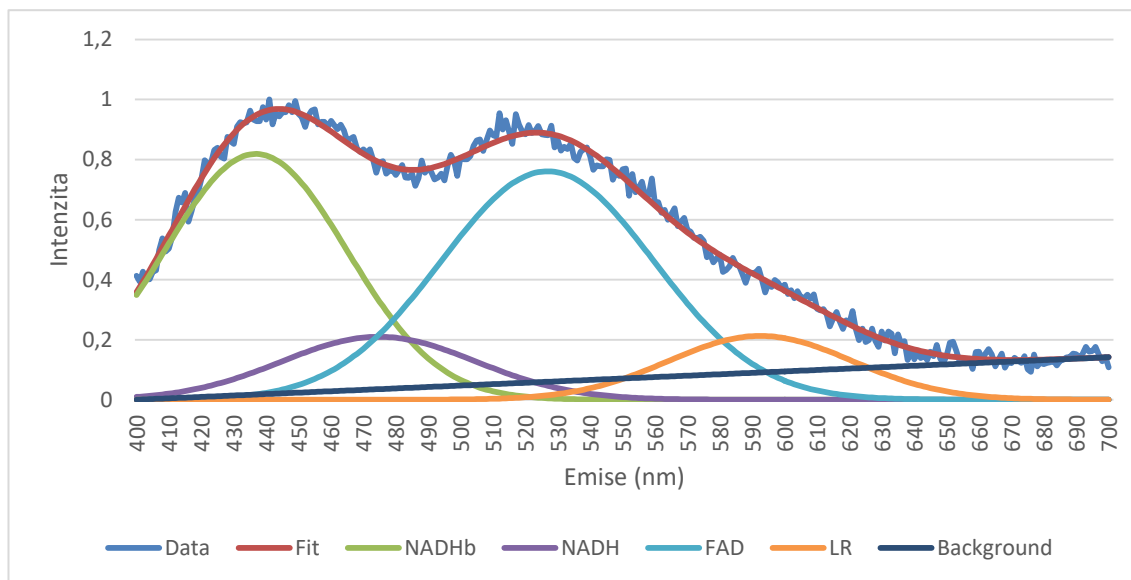
Graf 3.42: Fluorescenční spektrum 3T3/CT26 v poměru 62/38, pH 7,2, T 37 °C, exc. 365 nm





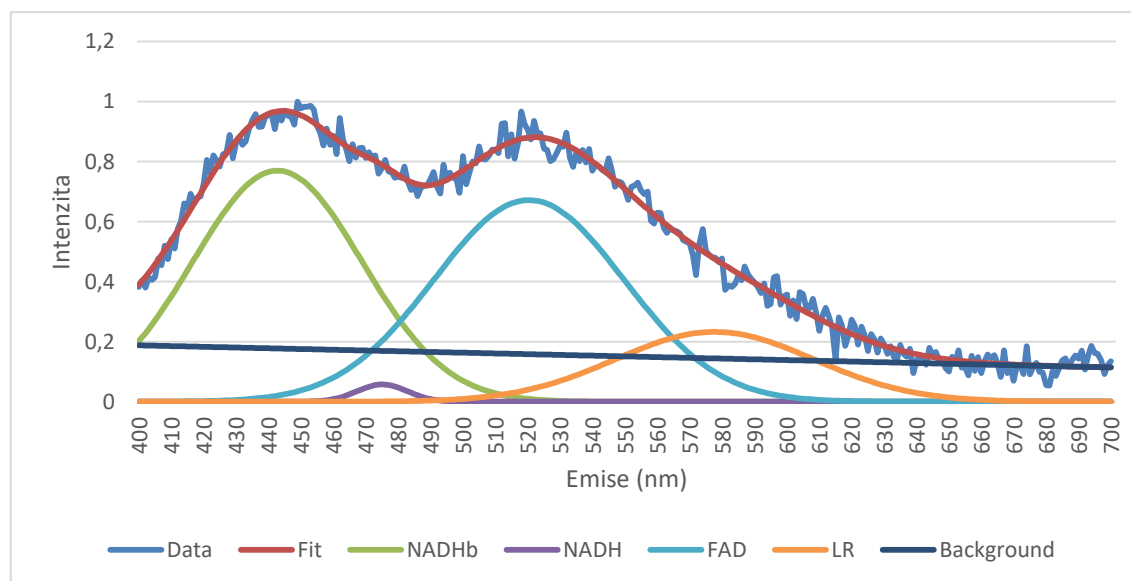
V grafu 3.43 jsou korigovaná data fluorescence směsi 3T3/CT26 v poměru 53/47 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.43: Fluorescenční spektrum 3T3/CT26 v poměru 53/47, pH 7,2, T 37 °C, exc. 365 nm



V grafu 3.44 jsou korigovaná data fluorescence CT26 a jejich Fit a rozklad na příspěvky jednotlivých biofluoroforů při excitaci vlnovou délkou 365 nm.

Graf 3.44: Fluorescenční spektrum CT26, pH 7,2, T 37 °C, exc. 365 nm



V tabulce 3.1 jsou vidět vlnové délky maximální intenzity fluorescence buněk 3T3, CT26 a SNU475 za různých podmínek. Tyto hodnoty pochází z grafů 3.1 až 3.12. Hodnota maximální intenzity fluorescence buněk SNU475 při pH 6,2 a teplotě 37 °C označená \* je pod hranicí šumu a tedy nelze považovat za přesnou či vypovídající a byla uvedena pouze pro kompletnost.

Tabulka 3.1: Maximální intenzity fluorescence všech buněk za různých podmínek

| Buňky  | Podmínky |              | $\lambda$ (nm) pro maximum intenzity |      |
|--------|----------|--------------|--------------------------------------|------|
|        | pH       | Teplota (°C) | NADHb                                | NADH |
| 3T3    | 6,2      | Lab          | 443                                  | 470  |
|        | 6,2      | 37           | 422                                  | 453  |
|        | 7,2      | Lab          | 434                                  | 453  |
|        | 7,2      | 37           | 427                                  | 448  |
| CT26   | 6,2      | Lab          | 440                                  | 468  |
|        | 6,2      | 37           | 434                                  | 465  |
|        | 7,2      | Lab          | 435                                  | 465  |
|        | 7,2      | 37           | 445                                  | 477  |
| SNU475 | 6,2      | Lab          | 441                                  | 470  |
|        | 6,2      | 37           | 445                                  | 511* |
|        | 7,2      | Lab          | 440                                  | 470  |
|        | 7,2      | 37           | 443                                  | 463  |

## 4 Diskuse

Tvar všech naměřených křivek odpovídá měření z práce [1] pro měření při excitaci 365 nm. Tento tvar je odlišný od měření při excitaci 340 a 260 nm ze stejné práce. Při excitaci 340 nebo 260 nm dojde k výraznému útlumu fluorescence druhého maxima v křivce tvořeného FAD a LR. To odpovídá literatuře [6] kde se absorpční maximum právě pro FAD pohybuje od 350 do 370 nm.

První z kapitol výsledků této práce v kapitole 3.1 jsou grafy fluorescenčních spekter čistých buněk 3T3, CT26 a SNU475. Ve zdravých buňkách 3T3 je výrazná převaha volného NADH (viz graf 3.1). Naproti tomu v nádorových buňkách CT26 a SNU475 je převaha NADHb – NADH vázaného na proteiny (viz graf 3.2, 3.3). Literatura [23, 25] uvádí, že u rakovinných buněk dojde ke zvýšení obsahu volného NADH vůči vázanému. V měřeních této práce se ukazuje, že u nádorových buněk má vyšší intenzitu fluorescence vázané NADH a u zdravých buněk má vyšší intenzitu fluorescence volné NADH. Podle literatury [22] se u rakovinných buněk zvyšuje množství proteinů, které se mohou vázat na NADH. To by mohlo zvýšit množství vázaného NADH. Z literatury [3-5] vyplývá, že vázané NADH má výrazně vyšší kvantovou výtěžnost fluorescence než volné NADH, a to by mohlo zdůvodnit vyšší míru intenzity fluorescence vázaného NADH. V kapitole 1 je také uvedeno maximum absorpce FAD pro vlnovou délku 450 nm, což je velmi blízko fluorescenci volného NADH, jehož fluorescence by tak mohla být částečně pohlcena. Při posouzení všech těchto faktů nelze označit zvýšenou intenzitu fluorescence vázaného NADH u nádorových buněk za důsledek zvýšené koncentrace vázaného NADH v buňce. Při porovnání spekter s excitací 460 nm nelze sledovat žádný trend při změně typu buněk ani při změně podmínek. Maximum intenzity FAD je při těchto měřeních okolo 540 nm a to odpovídá literatuře [1,5].

Porovnání mezi jednotlivými buňkami je podrobněji vidět v kapitole 3.2. Rozdíly v intenzitách fluorescence jsou způsobeny převážně odečtením pozadí od naměřené fluorescence. Samotné rozdíly tvaru křivek jsou pak vcelku subtilní. Všechny buňky se chovají za stejných podmínek obdobně a rozdíly jsou vidět především po rozkladu spekter jako v kapitole 3.1. Je ale možné sledovat změny křivek při změně pH a teploty prostředí. Při snížení pH z 7,2 na 6,2 dochází k poklesu intenzity prvního maxima intenzity vázaného NADH a volného NADH oproti druhému maximu intenzity daném fluorescencí FAD a LR. To je důsledkem vytvoření nevhodného prostředí pro život buňky a tedy klesají i procesy dýchacího řetězce, jejichž součástí NADH je. Při změně teploty z laboratorní na 37 °C k žádným výrazným změnám nedochází. To je pozitivní zjištění, protože to ukazuje, že zjištění provedená při laboratorní teplotě lze uplatnit i při fyziologické teplotě člověka. Když porovnáme stejný druh buněk při různých hodnotách pH a teploty, můžeme opět sledovat vlivy těchto faktorů. Tyto porovnání jsou v kapitole 3.3. Z grafů kapitoly 3.3 opět vyplývá, že snížení pH se výrazně projeví na celé fluorescenční křivce, ale změna teploty má vliv minimální. Nejlépe je to vidět na grafu

3.25, kde jsou křivky pro pH 7,2 a různé teploty téměř totožné, ale výrazně odlišné od křivek pro pH 6,2, které jsou opět mezi sebou velmi podobné. Z výsledků měření při excitaci 460 nm nejsou mezi buňkami a ani podmínkami žádné výrazné rozdíly. To je způsobené normalizací dat a rozdíly v maximální intenzitě jsou způsobené odečtem pozadí.

Dalším z výstupů této práce je porovnání koncentrační řady směsi buněk 3T3 a CT26. Tato koncentrační řada je v kapitole 3.4. U čistého vzorku 3T3 na grafu 3.39 je vidět jasná převaha intenzity fluorescence volného NADH nad vázaným. To stejně jako u grafů z kapitoly 3.1. neodpovídá literatuře, ale je reprodukovatelné a odpovídá trendu z kapitoly 3.1. Při přidání buněk CT26 je vidět pokles maxima intenzity fluorescence NADH a současný nárůst maxima intenzity fluorescence NADHb. Již při koncentraci nádorových buněk 10 % (viz graf 3.40) dosahuje peak NADHb na zhruba  $\frac{3}{4}$  intenzity peaku NADH. Při koncentraci 20 % (viz graf. 3.41) již peak NADHb výrazně převyšuje peak NADH. Při vyšších koncentracích se rozdíl ještě zvyšuje a při poměru buněk okolo 1:1 (přesně 53:47 ve prospěch 3T3, viz graf. 3.43) je maximální intenzita volného NADH již 4x menší než vázaného NADH. U čistého vzorku CT26 (viz graf. 3.44) je pak intenzita volného NADH pod hranicí pozadí. Poměr intenzit volného NADH a vázaného NADH odpovídá u čistých vzorků předchozím výsledkům z kapitoly 3.1 a u koncentrační řady ukazuje, že je možné již při poměrně nízké koncentraci nádorových buněk rozlišit jejich přítomnost. U měření při pH 7,2 a teplotě 37 °C, tedy podmínek podobných fyziologickým podmínkám zdravého člověka, dochází k prevalenci vázaného NADH proti volnému NADH již při koncentraci nádorových buněk 20 %. Přesné množství buněk u této koncentrace bylo 97600 buněk/ml 3T3 a 26400 buněk/ml CT26. (vypočítané podle vzorce 2.3) [22]

Na konci kapitoly 3 je uvedena tabulka s maximálními intenzitami fluorescence volného a vázaného NADH (tabulka 3.1). Z té je vidět že maximum intenzity vázaného NADH je na nižších vlnových délkách než u volného NADH u všech druhů buněk za všech podmínek. Maximum intenzity vázaného NADH se pohybuje v rozsahu 422 – 445 nm. Maximum intenzity volného NADH se pohybuje v rozsahu 448 – 477 nm. Tyto hodnoty odpovídají literatuře [5, 6] Z tohoto rozsahu byla vyloučena hodnota označená \* v tabulce 3.1. Intenzita této hodnoty je pod hranicí pozadí a je tedy nevypovídající. Podle očekávání se maximum intenzity volného NADH pohybuje okolo 460 nm a maxima intenzity vázaného NADH jsou na nižších vlnových délkách. [5, 6]

Výsledky této práce ukazují jasný trend zvýšení intenzity vázaného NADH u nádorových buněk. Ze všech provedených měření vyplývá, že je možné odlišit nádorové buňky od zdravých právě podle samotné intenzity fluorescence volného a vázaného NADH. Ať už se jednalo o měření samotných fluorescenčních spekter čistých vzorků buněk, kde se vždy ukázala převaha fluorescence vázaného NADH u nádorových a volného NADH u zdravých buněk, nebo u koncentrační řady, kde se postupně zvyšoval příspěvek fluorescence vázaného NADH se zvyšující se koncentrací nádorových buněk.

Tato práce ukazuje, že je možné využít fluorescenci k detekci nádorových buněk i ve směsi se zdravými buňkami. Toho by bylo možné využít v diagnostice v nemocnicích či ordinacích. Za tímto účelem by samozřejmě bylo nutné sestavit speciální zařízení pro sběr fluorescenčních dat a propojit jej s programem GASpeD pro následné zpracování a rozklad. K tomu se jeví jako nejvhodnější využití sondy s optickým vláknem napojené na emisní detektor. V současnosti existují fluorescenční detektory ve formě malé krabičky s výstupem pro optické vlákno. Takovým příkladem je spektrometr Flame od společnosti Ocean Insight V balíčku Bunde-Flame-FL obsahuje mimo jiné také excitační zdroj o vlnové délce 365 nm [55]. Takový spektrometr by pak mohl být využit k naměření spektra z těla pacienta. Vhodným příkladem využití by bylo využití endoskopu, který už obsahuje optická vlákna, a připojení tohoto či podobného spektrometru do jednoho z kanálů. Při endoskopickém vyšetření, například vyšetření trávicího traktu, by bylo možné nasbírat fluorescenci z místa podezřelého na nádorové bujení a po jejím rozkladu ověřit přítomnost nádorových buněk. Pro toto využití by však bylo potřebné nejprve otestovat možnost detekce buněk z celistvé tkáně namísto buněčné suspenze se kterou byla prováděna tato práce. Vytvoření takového zařízení nebo vyzkoušení měření u člověka by mohlo být vhodným námětem pro další výzkum nádorových buněk a jejich fluorescence.

## 5 Závěr

Ze všech měření provedených v této práci vyplývá, že je skutečně možné detekovat přítomnost nádorových buněk za pomoci rozkladu fluorescenčních spekter programem GASpeD. Při měření čistých vzorků zdravých buněk 3T3 a nádorových buněk CT26 a SNU475 se spolehlivě ukazuje vyšší maximální intenzita fluorescence volného NADH u zdravých a vázaného NADH u nádorových buněk. Při měření koncentrační řady se ukazuje, že intenzita vázaného NADH stoupá spolu se zvyšující se koncentrací nádorových buněk ve vzorku, a že je možné i při poměrně nízkém zastoupení nádorových buněk detekovat jejich přítomnost. Za fyziologických podmínek 37 °C a pH 7,2 převládalo vázané NADH nad volným při koncentraci nádorových buněk 20 %.

Skutečnost, že se podařilo tyto výsledky reprodukovat za všech daných podmínek, tj. pH 7,2 a 6,2 a při laboratorní teplotě a teplotě 37 °C ukazuje, že by bylo možné měřit tato spektra a využít jejich rozklad i za fyziologických podmínek člověka a nejen v laboratoři. Nakonec měření fluorescence při excitaci 365nm lidských buněk SNU475 (oproti myším buňkám 3T3 a CT26) ukazuje, že měření a analýzy fluorescenčních spekter vykazuje stejné výsledky a není limitován na pokusné laboratorní buňky. V budoucnu by bylo možné využít principů ověřených v této práci pro diagnostiku v lékařství za pomoci například vláknové sondy s pomocí dvou pásmových filtrů na 440nm a 460nm určit velikost intenzity fluorescence vázaného a volného NADH.

Takováto diagnostika u člověka by mohla být v budoucnu velmi přínosná. Hlavní výhodou by byla rychlost oproti stávajícím metodám, jelikož naměření fluorescenčního spektra trvá vteřiny a i zpracování programem GASpeD je proveditelné v řádu desítek minut. Další výhodou je neinvazivnost takového měření oproti tradičním metodám jako je právě biopsie.

To bude možné v případě, že se prověří tento přístup pro různé metabolické podmínky, při kterých budou měřena fluorescenční spektra zdravých a nádorových buněk. To by byl možný návrh na pokračování dalšího výzkumu nádorových buněk.

Na základě provedených měření a získaných výsledků lze konstatovat, že zadání a cíle práce byly splněny.

Práce byla vypracována za podpory uděleného grantu č. SGS21/083/OHK4/1T/17.

## Seznam použité literatury

- [1] SIO, Ratanak, 2018. Porovnání fluorescenčních spekter zdravých a nádorových buněčných kultur. Kladno. Diplomová práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství.
- [2] LIN, LI-SHENG, LI-NA LIU, HUI-FANG HUANG, YUAN-ZHONG CHEN, BU-HONG LI a ZHENG HUANG, 2013. CHARACTERIZING FLUORESCENCE LIFETIME OF NAD(P)H IN HUMAN LEUKEMIC MYELOID CELLS AND MONONUCLEAR CELLS. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 06(04). ISSN 1793-5458. Dostupné z: doi:10.1142/S1793545813500429
- [3] REHMAN, Aziz Ul, Ayad G. ANWER, Martin E. GOSNELL, Saabah B. MAHBUB, Guozhen LIU a Ewa M. GOLDYS, 2017. Fluorescence quenching of free and bound NADH in HeLa cells determined by hyperspectral imaging and unmixing of cell autofluorescence. *Biomedical Optics Express*. 8(3). ISSN 2156-7085. Dostupné z: doi:10.1364/BOE.8.001488
- [4] SCHAEFER, Patrick M., Svatlana KALININA, Angelika RUECK, Christine A.F. VON ARNIM a Bjoern VON EINEM, 2019. NADH Autofluorescence-A Marker on its Way to Boost Bioenergetic Research. *Cytometry Part A*. 95(1), 34-46. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.23597
- [5] SALMON, Jean-Marie, Elli KOHEN, Pierre VIALLET, Joseph G. HIRSCHBERG, Alain W. WOUTERS, Cahide KOHEN a Bo THORELL, 1982. MICROSPECTROFLUOROMETRIC APPROACH TO THE STUDY OF FREE/BOUND NAD(P)H RATIO AS METABOLIC INDICATOR IN VARIOUS CELL TYPES. *Photochemistry and Photobiology*. 36(5), 585-593. ISSN 0031-8655. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-1097.1982.tb04420.x
- [6] CROCE, A.C., G. BOTTIROLI, Pierre VIALLET, Joseph G. HIRSCHBERG, Alain W. WOUTERS, Cahide KOHEN a Bo THORELL, 2014. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*. 36(5), 585-593. ISSN 2038-8306. Dostupné z: doi:10.4081/ejh.2014.2461
- [7] LIN, LI-SHENG, LI-NA LIU, HUI-FANG HUANG, YUAN-ZHONG CHEN, BU-HONG LI a ZHENG HUANG, 2013. CHARACTERIZING FLUORESCENCE LIFETIME OF NAD(P)H IN HUMAN LEUKEMIC MYELOID CELLS AND MONONUCLEAR CELLS. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 06(04). ISSN 1793-5458. Dostupné z: doi:10.1142/S1793545813500429
- [8] Citrátový cyklus. WikiSkripta [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Citr%C3%A1tov%C3%BD\\_cyklus#:~:text=Citr%C3](https://www.wikiskripta.eu/w/Citr%C3%A1tov%C3%BD_cyklus#:~:text=Citr%C3)

%A1tov%C3%BD%20cyklus%2C%20cyklus%20trikarboxylov%C3%BDch%20k  
yselín,jín%C3%BDch%20metabolit%C5%AF%20pomoc%C3%AD%20kata%2D  
%20a

- [9] NEČAS, Oldřich, 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. Jinočany. ISBN 80-860-2246-3.
- [10] TRAN-DINH, Son, Frankie BEGANTON, Trong-Thuc NGUYEN, Françoise BOUET a Martine HERVE, 1996. Mathematical Model for Evaluating the Krebs Cycle Flux with Non-Constant Glutamate-Pool Size by <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy. Evidence for the Existence of Two Types of Krebs Cycles in Cells. *European Journal of Biochemistry*. 242(2), 220-227. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0220r.x
- [11] Krebsův cyklus a dýchací řetězec [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/krebsuv-cyklus-a-dychaci-retezec>
- [12] SONGER, Catherine J. a Joel J. MINTZES, 1994. Understanding cellular respiration: An analysis of conceptual change in college biology. *Journal of Research in Science Teaching*. 31(6), 621-637. ISSN 0022-4308. Dostupné z: doi:10.1002/tea.3660310605
- [13] Dýchací řetězec [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/D%C3%BDchac%C3%AD\\_%C5%99et%C4%9Bzec](https://www.wikiskripta.eu/w/D%C3%BDchac%C3%AD_%C5%99et%C4%9Bzec)
- [14] Mitochondrie. WikiSkripta [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Mitochondrie>
- [15] Dýchací řetězec a tvorba ATP. WikiSkripta [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/7-dychaci-retezec-a-tvorba-atp/>
- [16] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN, 2009. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum. ISBN 978-80-246-1416-8.
- [17] DUŠKA, František, Jan TRNKA a Jaroslav CERMAN, 2006. *Biochemie v souvislostech*. Vyd. 2. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1116-3.
- [18] GNAIGER, Erich, Rosmarie STEINLECHNER-MARAN, Gabriela MÉNDEZ, Thomas EBERL a Raimund MARGREITER, 1995. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 27(6), 583-596. ISSN 0145-479X. Dostupné z: doi:10.1007/BF02111656
- [19] Mitochondrial electron transport chain. Wikimedia [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2716553>



- [20] BUDKOVÁ, Zuzana, MIKROPROSTŘEDÍ NÁDORU A JEHO ÚLOHA V NÁDOROVĚ SPECIFICKÉ CHEMOTERAPII NEUROBLASTOMU, 2015. Brno. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [21] MIERKE, Claudia Tanja. Physics of Cancer. 2015. Dostupné z: doi:10.1088/978-0-7503-1134-2
- [22] SHARICK, Joe T., Peter F. FAVREAU, Amani A. GILLETTE, Sophia M. SDAO, Matthew J. MERRINS a Melissa C. SKALA, 2018. Protein-bound NAD(P)H Lifetime is Sensitive to Multiple Fates of Glucose Carbon. Scientific Reports. 2015, 8(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-23691-x
- [23] CONG, Anh, Rafaela M. L. PIMENTA, Hong Bok LEE, Venkatram MEREDDY, Jon HOLY a Ahmed A. HEIKAL, 2019. Two-photon fluorescence lifetime imaging of intrinsic NADH in three-dimensional tumor models. Cytometry Part A. 2015, 95(1), 80-92. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.23632
- [24] MASOPUST, Jaroslav, et al. 2003, Patobiochemie buňky. Vyd. 2. Praha : Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta. ISBN 80-239-1011-6
- [25] VILLETTE, Sandrine, Sophie PIGAGLIO-DESHAYES, Christine VEVEBIZET, Pierre VALIDIRE a Geneviève BOURG-HECKLY, 2006. Ultraviolet-induced autofluorescence characterization of normal and tumoral esophageal epithelium cells with quantitation of NAD(P)H. 5(5). ISSN 1474-905X. Dostupné z: doi:10.1039/b514801d
- [26] SORVINA, Alexandra, Christie A. BADER, Mitchell C. LOCK, Douglas A. BROOKS, Janna L. MORRISON a Sally E. PLUSH, 2018. Label-free imaging of healthy and infarcted fetal sheep hearts by two-photon microscopy. Journal of Biophotonics. 11(1). ISSN 1864063X. Dostupné z: doi:10.1002/jbio.201600296
- [27] ENG, J., R.M. LYNCH, R.S. BALABAN, Douglas A. BROOKS, Janna L. MORRISON a Sally E. PLUSH, 1989. Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. Biophysical Journal. 55(4), 621-630. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(89)82859-0
- [28] NADH, NADPH. WikiSkripta [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/NADH,\\_NADPH](https://www.wikiskripta.eu/w/NADH,_NADPH)
- [29] YING, Weihai, 2006. NAD and NADH in cellular functions and cell death. Frontiers in Bioscience. 11(1). ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/2038
- [30] NAD [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/index.php?curid=17481>
- [31] SCHNEKENBURGER, Michael a Marc DIEDERICH, 2015. Nutritional Epigenetic Regulators in the Field of Cancer. Epigenetic Cancer Therapy. Elsevier,

- 2015, 393-425. ISBN 9780128002063. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800206-3.00018-5
- [32] SKALA, M. C., K. M. RICHING, A. GENDRON-FITZPATRICK, J. EICKHOFF, K. W. ELICEIRI, J. G. WHITE a N. RAMANUJAM, 2007. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(49), 19494-19499. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0708425104
- [33] DYM, Orly a David EISENBERG, 2001. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Science*. 10(9), 1712-1728. ISSN 09618368. Dostupné z: doi:10.1110/ps.12801
- [34] NEFERINK, Nicole, 2009, Characterization and redesign of galactonolactone dehydrogenase, a flavoprotein producing vitamin C. Nizozemí, PhD práce, Wageningen University
- [35] Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, ed. 3, Springer, 2006, 954 s., ISBN 978-0-387-46312-4
- [36] Fluorescence. WikiSkripta [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Fluorescence>
- [37] Jablonski diagram. 17qq [online]. [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: <https://line.17qq.com/articles/pkoopnklv.html>
- [38] SLEZÁKOVÁ, Dagmar, 2008. INTERAKCE HYALURONANU S HYDROFOBNÍMI SOLUTY. Brno. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [39] BALB/3T3. ATCC [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-163.aspx?geo\\_country=cz#generalinformation](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-163.aspx?geo_country=cz#generalinformation)
- [40] CT26.WT. ATCC [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2638.aspx?geo\\_country=cz#characteristics](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2638.aspx?geo_country=cz#characteristics)
- [41] CT26.WT. Imanis [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: <https://imanislife.com/products/ct26-wt-mnis-neofluc-puro/>
- [42] SNU475. ATCC [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2236.aspx?geo\\_country=cz#documentation](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2236.aspx?geo_country=cz#documentation)
- [43] Phosphate buffered Saline. Sigma Aldrich [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/806544?lang=en&ion=CZ>
- [44] Fosfátový pufr [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: <https://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/Fosf% c3% a1 tov% c3% bd-pufr.pdf>

- [45] DMEM. Sigma Aldrich [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z:  
<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/dmem.html>
- [46] DMEM. Sigma Aldrich [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z:  
<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/rpmi-media.html>
- [47] Trypsin-EDTA. Sigma Aldrich [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z:  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t4049?lang=en&ion=CZ#:~:text=EDTA%20is%20added%20to%20trypsin,ions%20increases%20the%20enzymatic%20activity>
- [48] Trypan blue. Sigma Aldrich [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z:  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/trypanbluesolution960817257111?lang=en&ion=CZ>
- [49] Počítání buněk [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z:  
[http://www.rustreg.upol.cz/\\_materials/bubcv/BUBCV4.pdf](http://www.rustreg.upol.cz/_materials/bubcv/BUBCV4.pdf)
- [50] Operační manuál FluoroMax 4 [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z:  
[https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Downloads/UserArea/Fluorescence/Manuals/FluoroMax4\\_4P\\_Manual\\_USB.pdf](https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Downloads/UserArea/Fluorescence/Manuals/FluoroMax4_4P_Manual_USB.pdf)
- [51] FluoroMax series [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z:  
[https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Scientific/Molecular\\_and\\_Microanalysis/FluoroMax/FluoroMax\\_Series.pdf](https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Scientific/Molecular_and_Microanalysis/FluoroMax/FluoroMax_Series.pdf)
- [52] Photomultiplier tubes [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z:  
[https://www.hamamatsu.com/resources/pdf/etd/R928\\_R928P\\_R955\\_R955P\\_TPMS1091E.pdf](https://www.hamamatsu.com/resources/pdf/etd/R928_R928P_R955_R955P_TPMS1091E.pdf)
- [53] ADÁMEK, Petr, Oldřich RENNER, Ladislav DRSKA, Frank ROSMEJ a Jean-Francois WYART, 2006. Genetic algorithms in spectroscopic diagnostics of hot dense plasmas. *Laser and Particle Beams*. (24), 511-518. Dostupné z:  
doi:10.1017/S0263034606060678
- [54] Application of Genetic Algorithms to Analysis of High-parametr Plasma, 2004. Praha. Diplomová práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská.
- [55] Fluorescence measuring packages. Ocean Insight [online]. [cit. 2021-5-22]. Dostupné z: <https://www.oceaninsight.com/products/measurement--technique-bundles/fluorescence-bundles/>