

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Julie Kadlecová**

**Charakterizace nově vyvinutých fluorescenčních sond v buněčných systémech**

Characterization of newly developed fluorescence probes in cellular systems

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

**V Praze, 26.4.2021**

**Podpis .....**

**Julie Kadlecová**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Marii Hubálek Kalbáčové, Ph.D. za její trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala v průběhu vypracování této diplomové práce.

Zároveň bych zde chtěla poděkovat všem kolegyním naší Laboratoře interakcí buněk s nanomateriály z Ústavu patologické fyziologie, 1.LF UK v Praze, za jejich pomoc a přínosné rady, které mi poskytly během práce v laboratoři.

V neposlední řadě také děkuji své rodině a přátelům za podporu při studiu.

## Abstrakt

Nanočástice představují v současné době progresivní oblast vědeckého výzkumu. Možnost syntetizovat je podle požadovaných parametrů otevírá možnosti pro jejich široké využití i v biomedicině. Jedním z příkladů jsou nanočástice schopné detekovat buněčné děje, například pH. Již víme, že pH zdravé a rakovinné buňky se liší opačným gradientem na intracelulární a extracelulární straně membrány. V tomto kontextu se tato práce zabývá studiem fluorescenčních křemíkových nanočástic (SiNP) testovaných na buněčné linii lidských keratinocytů ze zdravého dárce (HaCaT) a z dárce s rakovinou kůže (A431). Po zjištění, že ani nejvyšší použité koncentrace SiNP nepůsobí cytotoxicky, mohly být dále studovány pomocí fluorescenční, konfokální a super-rezoluční mikroskopie. Aby bylo možné posoudit pH detekční vlastnosti těchto SiNP, byla zavedena metoda na měření intracelulárního pH fluorescenční ratiometrickou sondou SNARF-1 pomocí fluorescenční spektroskopie a průtokové cytometrie. Jelikož jsou hodnoty pH intracelulárního prostředí úzce spjaty s buněčným metabolismem, byl taktéž charakterizován a porovnán metabolismus buněk linie A431 a HaCaT. K tomu byly využity metody pro měření spotřeby analogu glukózy (2-NBDG) a poměrně nová metoda na měření metabolismu v reálném čase SeaHorse. Rozdíly pozorované mezi buněčnou linií A431 a HaCaT na více úrovních by mohly poukazovat na jejich možné využití jako modelu v diagnostice rakoviny.

### Klíčová slova:

SiNP, SNARF-1, keratinocyty, mikroskopie, fluorescence, intracelulární pH, metabolismus, glykolýza

## **Abstract**

Nanoparticles (NP) are currently a progressive area of scientific research. The possibility of synthesizing them according to the required parameters opens up possibilities for their wide use also in biomedicine. One example is a nanoparticle that can detect cellular processes, such as pH. We already know that the pH of healthy and cancer cells differs by the opposite gradient on the intracellular and extracellular side of the membrane. In this context, this work deals with the study of fluorescent silicon nanoparticles (SiNP) tested on a human keratinocyte cell line from a healthy donor (HaCaT) and from skin cancer donor (A431). Once found that even the highest concentrations of SiNP used are not cytotoxic, they can be further studied by fluorescence, confocal and super-resolution microscopy. In order to assess the pH detection properties of these SiNPs, a method for measuring intracellular pH with a fluorescent ratiometric probe SNARF-1 using fluorescence spectroscopy and flow cytometry was introduced. Since the pH values of the intracellular environment are closely related to cellular metabolism, the metabolism of A431 and HaCaT cells was characterized and compared. To do this, methods for measuring analog glucose consumption (2-NBDG) and another new method for measuring real-time metabolism SeaHorse were used. The differences observed between the A431 and HaCaT cell lines at multiple levels could indicate their possible use as a model in cancer diagnosis.

### **Keywords:**

SiNP, SNARF-1, keratinocytes, microscopy, fluorescence, intracellular pH, metabolism, glycolysis

# Obsah

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>12</b>
<b>3 PŘEHLED LITERATURY</b> .....	<b>13</b>
3.1 Buněčné pH.....	13
3.2 Regulace vnitrobuněčného pH .....	14
3.3 Sondy pro měření pH.....	18
3.4 Nanočástice .....	22
<b>4 MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>26</b>
4.1 Buněčné kultury .....	26
4.2 Charakterizace buněk.....	28
4.2.1 Dynamika růstu populace buněčné linie .....	28
4.2.2 Charakterizace buněčné linie NHDF fluorescenčním mikroskopem Olympus .....	28
4.2.3 Stanovení buněčné životaschopnosti .....	29
4.3 Charakterizace křemíkových nanočástic .....	30
4.3.1 Testování možné cytotoxicity rozdílných koncentrací SiNP .....	34
4.3.2 Proliferační test CyQuant.....	35
4.6 Vizualizace SiNP fluorescenčním mikroskopem Olympus .....	35
4.7 Lokalizace SiNP pomocí konfokální mikroskopie.....	37
4.8 Lokalizace SiNP pomocí super-rezoluční mikroskopie.....	38
4.9 Stanovení intracelulárního pH pomocí pH indikátoru SNARF-1.....	39
4.9.1 Kalibrace SNARF-1 .....	39
4.9.2 Detekce SNARF-1 metodou fluorescenčním spektroskopie.....	40
4.9.3 Detekce SNARF-1 metodou průtokové cytometrie .....	40
4.10 Vizualizace SNARF-1 fluorescenčním mikroskopem Olympus .....	41
4.11 Lokalizace SNARF-1 konfokálním mikroskopem.....	42
4.12 Stanovení buněčné spotřeby glukózy použitím jejího analogu 2-NBDG.....	43
4.13 Charakterizace buněčného metabolismu metodou SeaHorse .....	44
4.13 Statistické vyhodnocení .....	45
<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>46</b>
5.1 Charakterizace buněk.....	46

5.1.1 Dynamika růstu populace buněčné linie .....	46
5.1.2 Charakterizace buněčné linie NHDF fluorescenčním mikroskopem Olympus .....	48
5.1.3 Stanovení buněčné životaschopnosti .....	49
<b>5.2 Charakterizace křemíkových nanočástic .....</b>	<b>49</b>
5.2.1 Testování možné cytotoxicity rozdílných koncentrací SiNP .....	49
5.2.2 Proliferační test CyQuant.....	51
<b>5.3 Vizualizace SiNP pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus.....</b>	<b>53</b>
<b>5.4 Lokalizace SiNP pomocí konfokální mikroskopie.....</b>	<b>71</b>
<b>5.5 Lokalizace SiNP pomocí super-rezoluční mikroskopie.....</b>	<b>77</b>
<b>5.6 Stanovení intracelulárního pH pomocí pH indikátoru SNARF-1.....</b>	<b>80</b>
5.6.1 Kalibrace.....	80
5.6.2 Detekce pH indikátoru SNARF-1 metodou fluorescenční spektroskopie.....	82
5.6.3 Detekce pH indikátoru SNARF-1 metodou průtokové cytometrie .....	82
<b>5.7 Vizualizace SNARF-1 fluorescenčním mikroskopem Olympus .....</b>	<b>83</b>
<b>5.8 Lokalizace SNARF-1 pomocí konfokální mikroskopie.....</b>	<b>87</b>
<b>5.9 Stanovení buněčné spotřeby glukózy použitím jejího analogu 2-NBDG.....</b>	<b>89</b>
<b>5.10 Měření buněčného metabolismu metodou SeaHorse .....</b>	<b>92</b>
<b>6 DISKUZE .....</b>	<b>94</b>
<b>7 ZÁVĚR.....</b>	<b>103</b>
<b>8 SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>104</b>

## Seznam zkratek

2-NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-deoxyglukóza
ATP	adenosintrifosfát (z <i>angl. adenosintriophosphate</i> )
BCECF	2',7'-Bis-(2-carboxyethyl) -5-(and-6-) carboxyfluorescein
BR	průchozí světlo (z <i>angl. bright field</i> )
CA	karboxyanhydráza (z <i>angl. carbonicanhydrase</i> )
Cdk	cyklin dependentní kináza 1
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenylindol (z <i>angl. 4',6-Diamidino-2-phenylindol</i> )
DMEM	modifikované základní médium (z <i>angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z <i>angl. Deoxyribonucleic Acid</i> )
DT	doubling time
ECAR	hodnota extracelulární okyselování (z <i>angl. Extracellular Acidification Rate</i> )
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z <i>angl. ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
FACS	průtoková cytometrie (z <i>angl. Fluorescent Activated Cell Sorting</i> )
F6P	fruktózy-6-fosfát (z <i>angl. fructose-6-phosphate</i> )
FBS	fetální bovinní sérum
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát z ( <i>angl. fluorescein-5-isothiocyanate</i> )
F-R	křemíkové nanočástice šarže F pouze s Rho B
F-RF	křemíkové nanočástice šarže F s Rho B i FITC
GA	glutaraldehyd

MFI	průměr intenzity fluorescence ( <i>z angl. Median Fluorescence Intensity</i> )
MTS	3-[4,5,dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxy-phenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium
NHDF	normální lidské dermální fibroblasty ( <i>angl. Normal Human Dermal Fibroblasts</i> )
NHE antiporter	sodík-vodíkový antiporter ( <i>z angl. sodium-hydrogen exchanger</i> )
OCR	spotřeba kyslíku při oxidační fosforylaci ( <i>z angl. Oxygen Consumption Rate</i> )
PEG	polyethylenglykol
PBS	fosfátový pufr ( <i>z angl. Phosphate Buffered Saline</i> )
PFK1	fosfofruktokináza 1 ( <i>z angl. phosphofruktokinase 1</i> )
PI	polydisperzní index
RBITC	Rhodamin B isothiokyanát ( <i>z angl. Rhodamin B isothiocyanate</i> )
Rho B	Rhodamin B
RT	pokojevá teplota ( <i>z angl. room temperature</i> )
SiNP(s)	křemíkové nanočástice ( <i>z angl. Silicon Nanoparticles</i> )
SNAFL	seminaftofluorceiny
SNAFR	seminaftofluoron
SNARF	seminaphtharhodafluor
SNARFs	seminaftorhodafluory
STED	super-rezoluční mikroskopie ( <i>z angl. Stimulated Emission Depletion</i> )
TEM	transmisní elektronová mikroskopie

# 1 Úvod

Nanočástice (NP) představují poměrně mladý, ale velmi dynamicky rozvíjející se obor zasahující do rozličných odvětví výzkumu jako jsou povrchové úpravy materiálů (Rezek et al. 2011) nebo znečišťování ovzduší spalovacími motory (Rönkkö et al. 2014). Neznamená to, že nanočástice jsou staré několik desítek let, ale teprve s rozmachem techniky, tedy i metod schopných takto malé objekty pozorovat bylo možné zkoumat jejich vlastnosti a uvažovat o jejich využití (1981 – vynález rastrovacího tunelového mikroskopu/řádkovací tunelový mikroskop). Díky stále dokonalejším a dostupným prostředkům se také otevřela možnost syntetizovat nanočástice zcela podle požadovaných parametrů. Nanočástice mohou nabývat různých tvarů, velikostí a zejména mohou být povrchově optimalizovány pro konkrétní využití. Pokud uvažujeme o použití nanočástic v biomedicině nebo v biotechnologiích, je nutné vybrat takový materiál, jež nebude cytotoxický pro cílové buňky nebo organismus. Do této skupiny lze zařadit například křemík (Si), který je považován pro lidské tělo za biokompatibilní prvek, jelikož je jeho přirozenou součástí. Jak bylo zmíněno, tyto nanočástice lze modifikovat. Globální střed zájmu mnoha vědeckých skupin je bezesporu kancerogeneze a způsoby, jak tyto buněčné změny detekovat, popřípadě jakými mechanismy maligní transformaci zabránit. Nově vyvinuté křemíkové nanočástice se mohou stát jedním z mnoha přístupů, jak detekovat tyto změny v intracelulárním prostředí, jež se projevují mimo jiné i změnou hodnot pH. Je známo, že intracelulární prostředí rakovinné buňky se v důsledku extracelulárního okyselení stává zásaditějším. U zdravé buňky zůstávají hodnoty pH uvnitř buňky v úzkém rozmezí pH neutrálních hodnot. Změny pH hodnot lze detekovat například změnou fluorescence pH senzitivního fluoroforu fluorescein-5-isothiokyanátu (FITC). Pokud na SiNP připojíme fluorofor nezávislý na pH (Rhodamin B), poskytující údaj o lokalizaci nanočástice a současně konjugujeme SiNP s pH senzitivním fluoroforem FITC, lze na základě fluorescence FITC analýzou obrazu vyhodnotit pH v místě, kde se taková nanočástice nachází. Naše laboratoř vedená paní doc. RNDr. Marií Hubálek Kalbáčovou, PhD., jež se dlouhodobě zabývá interakcí buněk s různými nanomateriály (z uhlíku, křemíku, zlata) se proto zaměřila na studium těchto fluorescenčních nanočástic na buněčnou linii lidských keratinocytů HaCaT a buněčnou linii lidských keratinocytů pocházející z pacienta s rakovinou kůže (A431). Hodnoty pH intracelulárního prostředí jsou taktéž úzce spjaty s buněčným metabolismem a vzájemně se ovlivňují. V této

souvislosti byly rovněž zařazeny metody charakterizující metabolismus buněčné linie A431 a HaCaT.

## 2 Cíle práce

Cílem práce je charakterizovat *in vitro* nově vyvinuté křemíkové nanočástice (fluorescenční sondy) v různých buněčných systémech.

- 1) Charakterizovat vliv připravených nanočástic na životaschopnost buněčných linií lidských keratinocytů (rakovinných A431 a zdravých HaCaT) a fibroblastů (NHDF).
- 2) Vizualizovat a lokalizovat připravené nanočástice po interakci s buňkami lidských linií pomocí dostupných zobrazovacích technik.
- 3) Zavést metody na měření buněčného metabolismu a vnitrobuněčného pH pomocí standardních metod a tím si nakalibrovat systém pro měření vnitrobuněčného pH pomocí připravených fluorescenčních sond.
- 4) Charakterizovat vnitrobuněčné pH pomocí připravených fluorescenčních sond.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Buněčné pH

Hodnota pH je jednou z veličin charakterizujících buněčný systém. Vodíkové ionty udávají makromolekulám jak strukturu, tak náboj a tím předurčují jejich chování. Vodíkové protony hrají taktéž zásadní roli jako energetické platidlo v buňce generováním protonmotivní síly (hnací síla pro pohyb protonů přes membránu založená na koncentrací vodíkových iontů vně membrány a transmembránovém potenciálu).

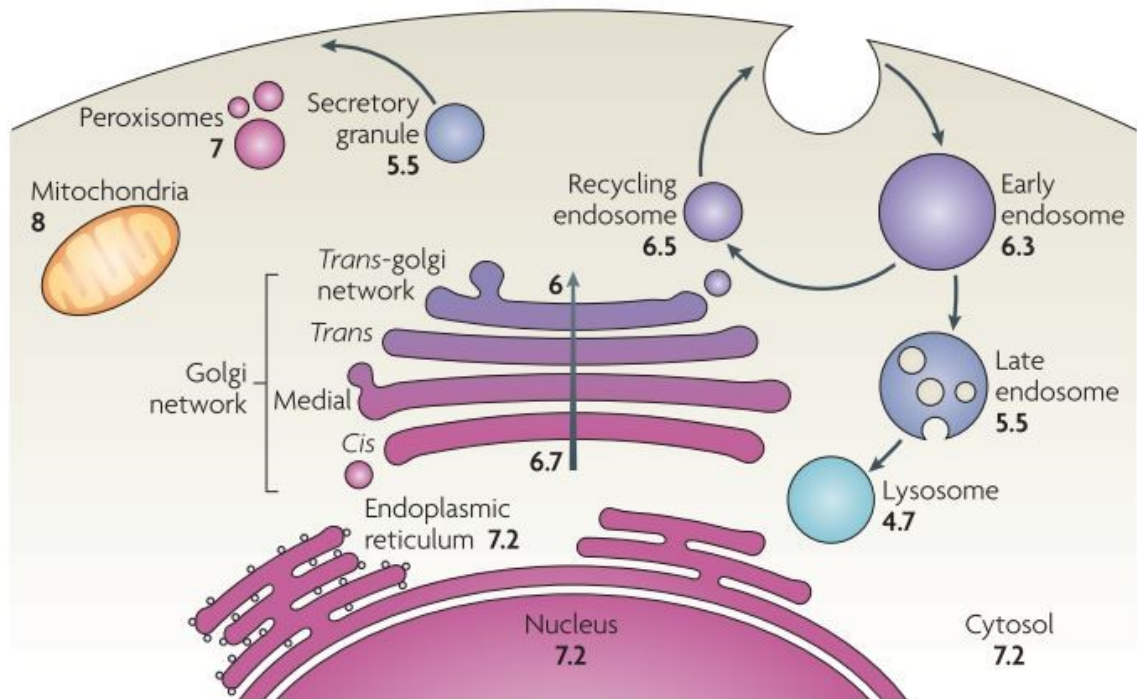
pH můžeme obecně definovat jako kvantitativní vyjádření míry kyselosti nebo zásaditosti vodného či jiného tekutého roztoku. Obecný vzorec vyjadřuje záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů.

$$\text{pH} = -\log(a_{\text{H}_3\text{O}^+})$$

Vnitrobuněčné pH je velmi striktně udržováno v úzkém rozmezí hodnot a jeho výkyvy značí patologické stavy jako rakovina (Lagadic-Gossmann et al. 2004), apoptóza (Webb et al. 2011) nebo Alzheimerova choroba (Davies et al. 1993). Z tohoto důvodu disponuje buněčné pH značným potenciálem zejména pro diagnostické použití v biomedicině.

Aby bylo možné cytosolické pH udržet v úzkém rozmezí fyziologických hodnot, bylo nutné vyčlenit například reakce generující radikály do oddělených kompartmentů. Obecně vyvinutější formy buněk mají svůj vnitřní prostor rozčleněný do membránou obalených organel. Tímto způsobem je zajištěno specifické prostředí zahrnující i rozdílné hodnoty pH pro speciální chemické děje, jež nemohou proběhnout v podmínkách cytosolu.

Za fyziologických podmínek je nízké pH udržováno ve specializovaných buněčných organelách účastnících se endosomální dráhy, kde postupně klesá až k nejnižší hodnotě 4,7 v lysozomu. Naopak pH matrix mitochondrie je považováno za mírně zásadité, jak je znázorněno na obrázku č.1 (Casey and Grinstein 2009). Za zajištění odlišných hodnot pH v různých organelách je odpovědná široká škála iontových transportérů.



Obr. č. 1.: Buněčné kompartmenty prototypické savčí buňky s odpovídajícími hodnotami pH, jež byly nasbírány z různých zdrojů. Převzato z (Casey and Grinstein 2009).

### 3.2 Regulace vnitrobuněčného pH

Udržování hodnot pH v buněčných organelách je v první řadě chráněno pH pufrací kapacitou roztoku, což je pojem pro schopnost konkrétního roztoku udržet lokální pH v jistém rozmezí i po přidání silné kyseliny nebo zásady. Koncentrovanější pufr snáší větší výkyvy pH, zředěním se tato schopnost snižuje. Je vyjádřena podílem počtu kyselých a alkalických ekvivalentů, jež jsou potřebné ke změně pH. Jako kyseliny se v prostředí buňky mohou chovat postranní řetězce aminokyselin a jako zásady fosfátové skupiny (Roos and Boron 1981). Například neustálý vliv oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$ ) na savčí buňky, jež prochází volně membránou, může nabývat protonovaného stavu kyseliny uhličité ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) a tím se taktéž chovat jako pufr. Role pufru bude na příkladu hemoglobinu dále popsána.

Ovšem je zapotřebí i dalších regulačních mechanismů, jelikož chemické děje v cytosolu jako je syntéza ATP a zároveň tok kladně nabitých iontů z prostředí buňky (v důsledku negativně nabitého vnitřku membrány) mají tendenci cytosol buňky okyselovat.

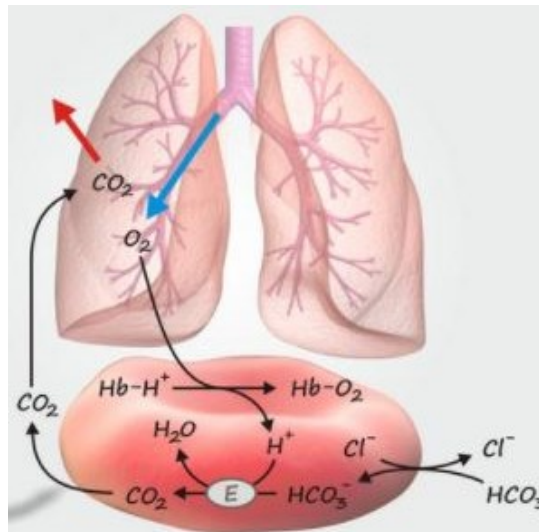
K udržení cytosolického pH zdravé buňky na lehce alkalické straně (za fyziologických podmínek se pohybuje kolem hodnoty pH 7,2) je třeba odčerpávat část protonů a jejich ekvivalentů z buňky do okolí. Tento děj je energeticky náročný, tudíž využívá energii ve formě ATP. Ačkoliv některé typy epitelálních buněk mají výměnný transport vodíkových protonů přímo za spotřeby ATP obsažené ve své membráně, tyto protonové pumpy (ATPázy typu V) nejsou zásadní pro udržení cytosolického pH. Tuto rovnováhu zajišťují transportéry, konkrétně kombinace symportérů a antiportérů. Ty pumpují protony proti elektrochemickému gradientu za současné vazby dalšího substrátu. V případě symportérů takový substrát dovolí protonovým iontům jejich kontransport, jelikož pro tento děj poskytují svojí energii. V případě antiporterů funguje substrát jako výměnný ekvivalent za protonový iont.

Evolučně konzervovaný mechanismus k ochraně buňky před nežádoucím okyselením je antiport vodíkových iontů za jednomocné sodíkové nebo draslíkové ionty, u savců zejména znám jako NHE antiporter (Na/H exchanger).

Do širší rodiny těchto transportérů patří i NHE1, jež je součástí většiny membrán savčích buněk a významně se podílí na kontrole pH v buňce, k čemuž využívá elektrochemický gradient udržovaný Na/K pumpou. V buňce je udržovaná několikanásobně nižší koncentrace sodíkových iontů, tudíž velmi ochotně dochází k výměně sodíkových iontů za vodíkové, směřované ven z buňky. Avšak pH ve zdravé buňce zůstává i tak nižší, než je tomu na její vnější straně, a to kvůli snížené aktivitě NHE1 při pH vyšší nebo rovno 7,2. Pokud se vodíkové ionty začnou kumulovat v cytosolu, aktivita NHE1 opět vzrůstá a chrání tak buňku před překyselením (Fuster et al. 2008; Aronson 1985).

Savčí buňky jsou pod vlivem všudypřítomného hydrogenuhličitanu ( $\text{HCO}_3^-$ ) v extracelulárním prostředí. Exportem chloridového aniontu výměnou za hydrogenuhličitan lze dosáhnout zvýšení intracelulárního pH. Intracelulární ( $\text{HCO}_3^-$ ) je enzymem karboxyanhydrázou (CA) přeměněn na kyselinu uhličitou ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). Ta se posléze štěpí na vodu a oxid uhličitý, jež může dále difundovat membránou pryč z buňky a tvořit opět ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Casey and Grinstein 2009). Pro ilustraci znázorněno na chování erytrocytu v plicích (obr.č.2.). V plicích se koncentrace volných vodíkových iontů snižuje, což zapříčiňuje zvýšení pH cytoplazmy erytrocytu a je stimulována vazba kyslíku na hemoglobin. Oxygenovaný hemoglobin v daleko menší míře váže vodíkové

ionty než deoxygenovaný, uvolněný vodík je společně s hydrogenuhličitanem přeměněn na vodu a oxid uhličitý, který je v plicích uvolněn. Volný  $H^+$  je přeměněn na vodu, chloridový aniont je vyloučen výměnou na hydrogenuhličitan.



Obrázek č. 2.: Oxygenace hemoglobinu a uvolnění  $CO_2$  z erythrocytu v plicích. Písmeno E symbolizuje enzym karboxyanhydrázu (převzato z Institut Galenus).

pH zdravých vs rakovinných buněk

Při kancerogenezi dochází k mnoha změnám v metabolismu, fenotypu i genové expresi. Jedním z hnacích motorů těchto změn se zdá být i měnící se hodnoty pH, jak extracelulárně, tak zejména intracelulárně. Metabolismus pH rakovinných buněk vykazuje opačný trend, než je tomu u buněk zdravých. U rakovinných buněk je pozorováno snížení pH v extracelulárním prostoru, zatímco pH cytosolu je z toho důsledku mírně zvýšené (pH 7,3-7,6 v rakovinné buňce vs 7,2 ve zdravé buňce). Tento jev provází počátek maligní transformace buněk (Reshkin et al., 2000).

Dalo by se předpokládat, že zrychlením metabolismu a proliferace rakovinných buněk bude mít za následek zvýšenou kumulaci kyselých produktů z metabolismu, tudíž intracelulární pH buňky se bude snižovat. Nicméně, právě zvýšením produkce transportérů iontů podílejících se z většinové části na regulaci intracelulárního pH, změni hodnoty intracelulárního pH opačným směrem. Blokátory těchto transportérů (NHE1) se jeví jako možnost pro protinádorovou terapii (Boedtkjer et al. 2012). Předpokládá se, že zvýšená produkce iontových transportérů ovlivňuje buněčné procesy jako proliferace, migrace a metabolismus ku prospěchu rakovinné buňky (White et al. 2017a).

Již víme, že za zvýšeným pH intracelulárního prostředí stojí zvýšená produkce i odlišné zastoupení transportéru iontů (Cong et al. 2014; Reshkin et al. 2014). Zbývá

objasnit, jak přesně tento jev ovlivňuje proliferaci. V buněčném cyklu zdravé buňky umožňuje dočasné zvýšení intracelulárního pH přechod z S fáze do G2/M fáze udržováním vyšších hladin cyklinu B, potažmo fosfatáz, jež defosforylují inhibiční cyklin dependentní kinázu 1 (Cdk1) (Putney and Barber 2003). V rakoviných buňkách je tento stav zvýšeného pH soustavně udržován, tudíž nutí buňku k další proliferaci, jak bylo pozorováno na studii fibroblastů (Putney and Barber 2004). Naopak snížení intracelulárního pH vede k apoptóze a to jak cestou aktivací kaspáz, tak i uvolněním cytochromu c z mitochondrie (Lagadic-Gossman et al. 2004). Je zřejmé, že toto není pro rakovinnou buňku žádoucí, bohužel tato oblast není dostatečně prozkoumána.

Dalším často pozorovaným rozdílem mezi zdravými a rakovinnými buňkami je přednostní zpracování glukózy v procesu glykolýzy na úkor oxidativní fosforylace. Glukóza poskytuje po rozštěpení energii ve formě ATP. V savcích buňkách může být produktem glykolýzy a následné fermentace laktát nebo CO<sub>2</sub> pocházející z oxidativní fosforylace v mitochondriích. U nádorových buněk je pozorován zvýšený příjem glukózy, která směřuje zejména do glykolýzy produkující laktát, ačkoliv se nenachází v anaerobních podmínkách a oxidativní fosforylace je tudíž možná. Tento jev označujeme jako Warburgův efekt. (Liberti and Locasale 2016). Předpokládá se, že nádorová buňka tak negativně ovlivňuje hromadění kyslíkových radikálů pocházejících z oxidativní fosforylace v mitochondriích a zároveň se tak lépe adaptuje v hypoxických podmínkách. Do extracelulárního prostoru jsou v důsledku zvýšené fermentace vylučovány vodíkové ionty, tím dochází k okyselování okolí nádorové buňky a usnadňuje tak její invazi. Tuto změnu pH špatně snáší okolní zdravé buňky a podstupují ve zvýšené míře apoptózu a nekrózu (Estrella et al. 2013).

Zvýšená poptávka rakovinných buněk po glukóze přímo souvisí se zvýšenou produkcí laktátu vznikajícím glykolýzou. pH senzitivní enzymy účastníci se glykolýzy (Reshkin et al. 2014; Damaghi et al. 2013) jsou částečně zodpovědné za zvýšení intracelulárního pH, jež kladně ovlivňuje tok glukózy glykolýzou (Miccoli et al. 1996; Dietl et al. 2010; Peak et al. 1992; Dechant et al. 2010). Spekulovanými enzymy jsou laktát dehydrogenáza a fosfofruktokináza (PFK-1). S přechodem rakovinných buněk na glykolýzu souvisí i zvýšená aktivita nebo exprese enzymů účastnících se tohoto procesu a jejich produktů. Patří mezi ně laktátdehydrogenáza A, jež je jeden z indikátorů značně metastazujících rakovinných buněk. Jeho důležitou roli potvrzuje fakt, že jeho utlumením došlo k zpomalení růstu nádoru (Fantin et al. 2006; Le et al. 2009).

Rozhodujícím enzymem v glykolýze je fosfofruktokináza 1 (PFK-1), jež je také pH senzitivní s optimem (se zvýšenou aktivitou) mezi pH 7 a 7,4 (Andrés et al. 1990). Byla pozorována jednak zvýšená exprese tohoto enzymu v buňkách vykazujících rakovinový fenotyp (fenotyp rakoviny), zároveň v rakovinových buňkách byla pozorována vyšší míra glykosylace omezující aktivitu enzymu (Yi et al. 2012). Laktát dehydrogenáza i fosfofruktokináza tak nabízí další ovlivnitelné body vedoucí k přechodu zdravé buňky na rakovinnou. Zatím bohužel schází dostatečné podklady, jak tyto pH senzitivní aktivity těchto enzymů funguje na molekulární úrovni. U PFK-1 byl pomocí jeho krystalové struktury identifikován His208 jako konzervovaná část ve všech těchto izoformách PFK-1 (Webb et al. 2015). Při nízkém pH dochází k jeho protonaci a tím se zkomplikuje vazba jeho substrátu - fruktózy-6-fosfátu (F6P), meziprojektu glykolýzy. Meziprojekt F6P tedy obtížněji postupuje do další reakce a tím je negativně ovlivněna hlavní metabolická dráha rakovinné buňky (White et al. 2017b).

### 3.3 Sondy pro měření pH

Intracelulární pH lze stanovit různými metodami. Je možné použití mikroelektrody uvnitř buňky, dále fluorescenční látky, a nakonec nukleární magnetickou rezonancí. Z výše uvedených se budu již dále věnovat pouze metodě fluorescenční sondy, jelikož je nejpřesnější a zároveň relativně nenáročná.

Princip fotoluminiscence již hraje významnou roli v metodách výzkumu i diagnostiky. Jde o jev, kdy po dodání vnější energie (elektromagnetického záření) dojde k excitaci elektronů v atomu fotoluminiscentní látky do vyšších energetických vrstev (excitace – absorpce energie), poté nevyhnutelně dochází k návratu do původního stavu za vyzáření energie (emise) – fotoluminiscence. Fotoluminiscence se dále dělí na fosforescenci a fluorescenci. V případě fluorescence jsou zdrojem energie fotony, například UV záření a na rozdíl od fosforescence dochází po odstavení zdroje energie k okamžitému vyhasnutí.

Fluorescenční molekuly, fluorofory nebo fluorochromy, jsou takové chemické látky, které jsou schopné prostřednictvím obsažené reaktivní sloučeniny vázat nukleofilní skupiny (OH, SH, ...). Dále je možné fluorofory rozdělit na vnitřní a vnější. Vnitřní fluorofory se vyskytují přirozeně. Mezi ně lze zařadit některé proteiny (např. hemoglobin)

vykazující záření ve spektru UV. Tuto schopnost jim poskytují obsažené aromatické aminokyseliny. Vnější fluorofory jsou přidávány k substrátu, který nemá fluorescenční vlastnosti, a mají za úkol takový substrát označit. Proto jsou mnohem častěji využívány, a to ve formě fluorescenčních sond nebo značek.

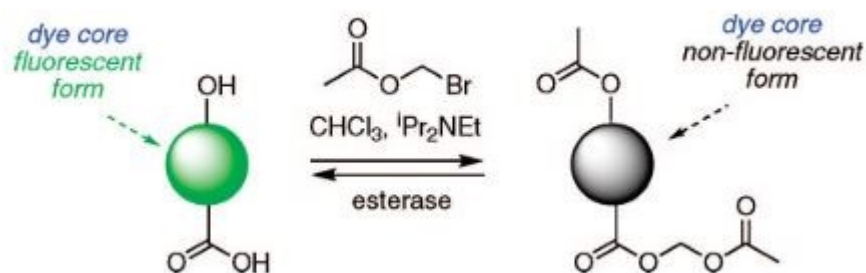
**Fluorescenční značky** se vážou k substrátu kovalentními vazbami, mezi nejnámější patří FITC (fluorescein-5-isothiokyanát). Jeho emisní maximum se nachází při 519 nm, což odpovídá fluorescenci v zeleném spektru. Jeho limitem i předností je citlivost k okolnímu pH. Deriváty odvozené od FITC jsou bohužel náchylné k vysvícení způsobené světelným zářením a jejich vyšší disociační konstanta  $pK_a$  přispívá k vyšší citlivosti na okolní pH. Citlivost fluoroforu FITC na okolní pH může být naopak využíváno cíleně právě k jeho detekci. Sledování fluorescence FITC v úzkém rozmezí hodnot charakteristických pro intracelulární prostředí bude jednou ze stěžejních témat této diplomové práce a bude dále podrobně rozebráno. Nově modifikované fluorescenční značky obsahující atomy boru tyto limitující vlastnosti do určité míry potlačují.

**Fluorescenční sondy** se váží k substrátu nekovalentně a často poté mění i své fluorescenční vlastnosti. Příkladem může být pozorování změny konformace bílkovin nebo membránového potenciálu. Z důvodu slabé fluorescence nukleových kyselin jsou zejména důležité pro vizualizaci chromozomů. Typickým zástupcem fluorescenčních sond je DAPI (4',6-Diamidino-2-fenylindol), který nespecificky označí veškerou jadernou DNA, tím že se váže do malého žlábků DNA dvoušroubovice (Kočárek et al., 2010).

Výhodou těchto fluorescenčních sond je jejich snadná aplikace prakticky k jakémukoliv vzorku, relativně snadné zacházení a dostupnost (Terai and Nagano, 2013). Obecně schopnost fluoroforů o malé molekulové hmotnosti připojit se k libovolným makromolekulám poskytuje taktéž širokou nabídku využití v závislosti na potřebách konkrétního experimentu (Klymchenko 2017).

## Internalizace fluorescenčních sond do buněk

Navzdory tvrzení, že fluorescenční sondy mohou být aplikovány k širokému spektru vzorků, mohou také významně poškodit fyziologický stav buňky, například narušením buněčné membrány. Elegantním řešením jsou takové fluorescenční sondy, jež jsou ve formě acetoxymetyl esteru schopné projít buněčnou membránou do nitra buňky, kde pak vlivem buněčných esteráz dochází k odštěpení acetoxymetylu. Výsledkem je uvěznění zbytku nabitě molekuly (např. SNARF-1 - Seminaphtharhodafleur) v cytosolu, zobrazeno na obrázku č. 3 (Hinton et al. 2009).



Obr. č. 3: Přechod mezi fluorescenčním a nefluorescenčním stavem AM nebo esterů acetátu. (převzato z Han and Burgess 2010).

Kvalitativní stanovení pH je umožněno takovými fluorescenčními indikátory (sondami), jež se budou rozsvěcet a zhasět v úzkém rozmezí pH. Takové podmínky jsou schopné zajistit právě ratiometrické fluorofory.

V návaznosti na problematiku pH ve zdravých a rakovinných buňkách se dostává takovým pH senzitivním ratiometrickým fluoroforům velké pozornosti. Princip spočívá v různé sensitivitě senzoru k vodíkovým protonům při odlišných vlnových délkách emise nebo excitace. U takových fluoroforů se měří intenzita fluorescence ve dvou specifických vlnových délkách emise nebo excitace, jež závisí na okolních podmínkách sondy, jež je v tomto případě lokální pH. Kalibrační poměrů těchto intenzit je možné stanovit hodnoty pH.

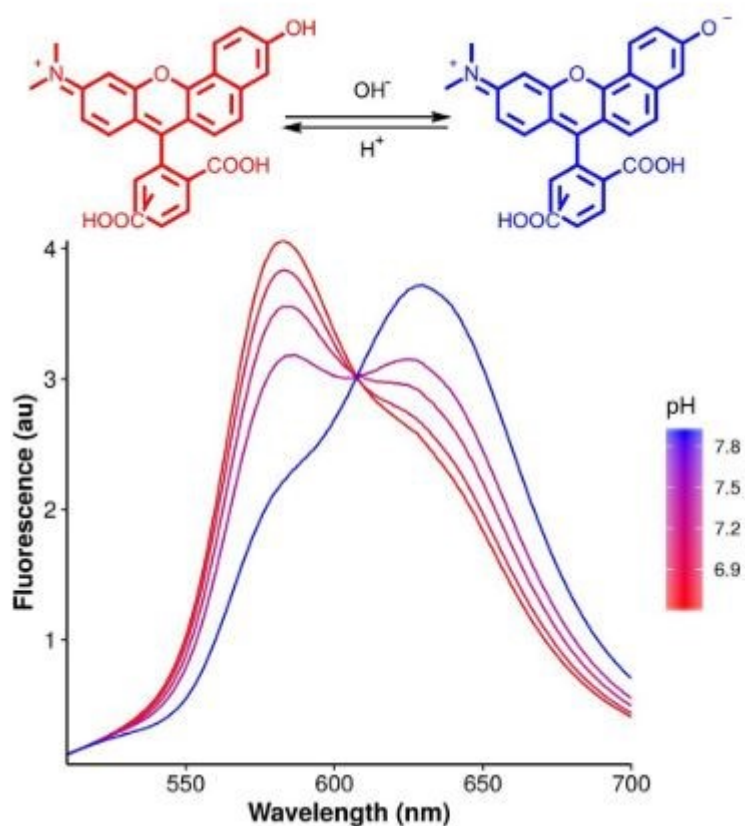
Mezi nejznámější třídy fluorescenčních indikátorů se řadí sondy založené na molekule fluoresceinu, z nichž nejhojněji využívaným zástupcem je 2',7'-Bis-(2-carboxyethyl) -5-(and-6-) carboxyfluorescein (BCECF). Tato sonda byla prvně uvedena pro měření intracelulárního pH s širokým polem působením roku 1982 (Rink et al., 1982).

V tomto případě pH ovlivňuje absorbanci snímanou ve dvou vlnových délkách, zatímco emisní maximum je určené pouze jedno.

### SNARF-1

Další neméně významnou skupinou jsou ratiometrické indikátory založené na benzoxanthanech. Zahrnuje sondy jako seminaftofluorony (SNAFR), seminaftofluorceiny (SNAFL) a seminaftorhodafluory (SNARFs), jež byly na trh uvedeny před 30 lety firmou Molecular Probes (dnes Life Technologies, Whitaker et al. 1991).

Na rozdíl od BCECF, pH sonda SNARF-1 má jedno excitační maximum, zatímco intenzita emise je měřena ve dvou vlnových délkách v závislosti na pH. Tento princip lze dobře ilustrovat na chování sondy seminaftorhodafluor (SNARF-1) na obrázku č. 4, kdy v kyselém prostředí měříme emisní maximum za vlnové délky 580 nm, zatímco v zásaditém prostředí se se toto emisní maximum přesouvá do vlnové délky 640 nm.



Obr. č. 4.: Průběh fluorescence sondy SNARF-1 ve dvou různých emisních maximech. První emisní maximum nastává v kyselém prostředí ( $\text{pH} < \text{pK}_a$ ) při 580 nm, zatímco v zásaditém prostředí ( $\text{pH} > \text{pK}_a$ )

pozorujeme emisní maximum při 640 nm. Poměr intenzit fluorescence (I) měřených při emisi 640 nm a 580 nm (I<sub>640</sub>/I<sub>580</sub>) umožňuje stanovit hodnotu intracelulárního pH. Převzato z (Méndez-Ardoy et al. 2020).

### 3.4 Nanočástice

Nanočástice jsou klasifikovány jako objekty s průměrným rozměrem 1-100 nm. V současné době je nanočásticím a rozvíjejícím se nanotechnologiím věnována značná pozornost vědců i laické veřejnosti. To může vyvolávat dojem, že nanočástice před několika desítkami let (1990) snad neexistovaly. Není tomu tak, nanočástice se v masivním množství uvolňovaly například při sopečných erupcích doprovázející přirozené přírodní děje na Zemi, s příchodem člověka se nanočástice uvolňují taktéž při pouhém rozdělání ohně. Po průmyslové revoluci je to právě lidská činnost, jež generuje značný podíl nanočástic do okolního prostředí. Teprve strmým vývojem techniky je možné nejen tyto částice pozorovat, ale taktéž je syntetizovat *de novo*. Jejich význam nabírá na důležitosti ve spojení s ochranou přírody i lidského zdraví (pro ilustraci azbestová nanovlákna, jež se díky svému jehlicovému tvaru „zapíchnou“ do plicní tkáně a tím ji výrazně poškozují). Perspektivní budoucnost je čeká i díky jejich možnému využití v biomedicíně (např. doprava léčiv, biosenzory, ...).

#### Vstup nanočástic do buňky

Nanočástice mohou vniknout do buňky pomocí endocytózy jež dále zahrnuje dva podtypy: fagocytózu a pinocytózu (Kafshgari et al. 2015).

Fagocytóza je přednostně využívána většími nanočásticemi nebo jejich klastry (měřící v průměru více než 500 nm). Touto vlastností disponují například buňky imunitního systému, makrofágy a neutrofilové. Dochází k navázání nanočástice na membránový receptor, membrána buňky vytvoří pánvičku obkružující nanočástici a ve formě fagozomu ji transportuje do cytoplazmy.

Pinocytóza se dále větví na klatrinem zprostředkovanou endocytózu a na klatrinu nezávislou endocytózu zahrnující mikropinocytózu, caveolinem zprostředkovanou endocytózu a další specifické příklady pinocytózy (například využívající Rho GTPázu) (Kafshgari et al. 2015).

Klatrinem zprostředkovaná endocytóza zprostředkovává transport většiny přijatého materiálu do buňky. Transport specifického materiálu je zajištěn pomocí receptorů nebo na základě hydrofobních a elektrických interakcí mezi pohlcovaným materiálem a membránou. Na nanočástici je připojen ligand cílící na konkrétní membránu. Následně je tento komplex rozeznán receptorem, membrána invaginuje dovnitř buňky a vytváří se klatrinem zpevněná jamka. Postupná invaginace vyústí v odškrcení váčku dovnitř cytoplasmy, kde postupuje endocytickou dráhou až do lysozomu. Tato metoda je hojně využívána v dopravě léčiv do buňky (Karimi et al. 2016).

V případě kaveolinem zprostředkované endocytózy se taktéž tvoří invaginováním membrány jamka, jež má tvar baňky. Po jejím odškrcení váček putuje ve většině případů endocytickou dráhou taktéž do lysozomu. Bylo ale pozorováno, že v případě kaveolinem zprostředkované endocytózy je možné obejít lysozom, tudíž citlivý náklad jako DNA zůstane zachována (Rejman et al. 2008).

Posledním významným způsobem transportu nanočástic do buňky je makropinocytóza, taktéž uzpůsobená pro rozměrnější nanočástice a taktéž využívající aktin jako fagocytóza. Makropinocytózou je pohlcena extracelulární tekutina obsahující i nanočástice. K tomuto ději dochází zejména, pokud není možné využít jiný způsob endocytózy (Kuhn et al. 2014).

Aplikací specifických inhibitorů konkrétních typů endocytózy lze určit nebo vyvrátit vstupní mechanismus nanočástice do buňky.

### **Vliv velikosti nanočástice**

Je zřejmé, že tato vlastnost se významně podílí na schopnosti nanočástice procházet buněčnou membránou, což bylo ověřeno v teoretické studii využívající difúzní model. Nejrychlejší průnik membránou byl stanoven u nanočástic s poloměrem 27-30 nm (Gao et al. 2005). V jiné studii byl vypočten ideální poloměr nanočástice na 25 nm, což podporuje výše zmíněný výsledek (Yuan and Zhang 2010). Je nutné připomenout, že vypočítané rozměry nanočástic byly stanoveny v modelových podmínkách, za fyziologických podmínek se nanočástice mají tendenci shlukovat. Výsledkem je tvorba aglomerátů o neznámých rozměrech a tvarech, jež se samozřejmě podepíše na způsobu vniku do buňky (Albanese and Chan 2011).

### **Vliv tvaru nanočástice**

Tvar nanočástice hraje taktéž důležitou roli. Nanočástice mohou nabývat velmi různorodých tvarů, avšak pro biomedicínské účely jako je doprava léčiv do buňky jsou majoritně využívány nanočástice sférického tvaru (Park et al. 2009; 2008; Geng et al. 2007). V porovnání s nanočásticemi sférického tvaru, trubicové nanočástice (nanomateriál s vysokým poměrem stran a několika nm širokým kanálem) vykazují sníženou míru vychytání rakovinnými buňkami (Chithrani and Chan 2007; Chithrani et al. 2006). Nanočástice tyčinkovitého tvaru (jeden z rozměrů nanomateriálu převažuje, bez kanálu) naopak poukazují na vyšší míru pohlcování nanočástic rakovinnými buňkami v porovnání s nanočásticemi sférického tvaru (Park et al. 2009; 2008; Barua et al. 2013).

### **Vliv povrchu nanočástice**

Dalším nezanedbatelným faktorem je samotný povrch nanočástice. Je známo, že buněčná membrána má lehce negativní náboj (Bernfield et al. 1999), tudíž zákonitě bude určovat jaké nanočástice budou přednostně přitahovány. V simulační studii pozitivně nabitá nanočástice stimulovala adhezi k buněčné membráně i internalizaci do membrány (Li and Gu, 2010). Taktéž se náboj promítne i do způsobu vniku nanočástice do buňky (endocytické dráhy upřednostňované negativními a elektroneutrálními nanočásticemi oproti narušení membrány pozitivně nabitými nanočásticemi (Cho et al. 2009)). Narušení membrány způsobené pozitivně nabitými nanočásticemi tedy mají za následek i zvýšenou cytotoxicitu pro buňky (Li and Malmstadt 2013).

### **Vznik a vliv proteinové korony**

Pro použití nanočástic za fyziologických podmínek je důležité brát v úvahu vznik proteinové korony ihned po jejich aplikaci, což znamená obalení nanočástice všudypřítomnými proteiny (imunoglobuliny, lipoproteiny, ...). To se vztahuje i na in vitro pokusy používající medium se sérem (albumin) (Cedervall et al. 2007). Vlastnosti takové nanočástice se poté mohou radikálně změnit a ovlivnit tak například imunitní systém nebo vychytávání nanočástice buňkami (Lynch and Dawson 2008).

Nicméně bylo pozorováno, že i za bezsérových podmínek buňky nadále exportují proteiny do média (Albanese et al. 2014).

Proteinová korona je často znamením pro buňky imunitního systému k jejich pohlcení fagocytózou (Zhao and Stenzel 2018). Poločas cirkulace zlatých nanočástic

v krevním oběhu byl úspěšně prodloužen připojením molekuly polyethylenglykolu (PEG), zároveň nebyla pozorována akumulace v životně důležitých orgánech (kromě jater) po dobu 72 hodin (Niidome et al. 2006). Nanočástice s delším řetězcem PEG vykazovaly vyšší poločas cirkulace v krvi (Perrault et al. 2009; Gref et al. 2000).

Pro možnost podrobnějšího studia je nezbytné mít připravené nanočástice se stejnými vlastnostmi – uniformní, což je v praxi značný problém.

### **Detekce pH nanočásticemi**

Detekce pH nanočásticemi využívá princip měření intracelulární pH ratiometrickými sondami a přednosti nanočástic. Nanočástice vynikají schopností libovolné konjugace s různě specifickými značkami nebo barvami. Takto upravené nanočástice lze právě využít i k měření intracelulárního pH. Nanočástice založené na ratiometrické detekci pH mohou být rozčleněny do tří skupin. První skupinu představují pH sondy (senzory), kde nanočástice plní roli substrátu. Dále existují pH senzory s dvěma fluorofory, kdy aspoň jeden z nich má nanorozměry. Třetí skupinu pH senzorů lze charakterizovat jako nanočástice s vnitřní dualní emisí (Bigdeli et al. 2019).

Zástupcem první skupiny, na které bude demonstrován i princip studovaných nanočástic, mohou být karbonové tečky z důvodu malé velikosti a ověřené biokompatibility. Karbonové tečky byly prostřednictvím povrchových aminoskupin konjugovány s pH senzitivním FITC a pH nezávislým Rhodamin B isothiokyanátem (RBITC). Při zvýšení pH byla pozorována zvýšená fluorescence FITC při 515 nm. Takto značené karbonové tečky vykazovaly rozdíly ve fluorescenci v závislosti na pH, takto bylo charakterizováno pH HeLa buněk (Shi et al. 2012). Totožný princip byl aplikován i pro syntézu nově vyvinutých křemíkových nanočástic (SiNP), kterým se bude věnovat tato diplomová práce.

## 4 Materiály a metody

### 4.1 Buněčné kultury

Veškerá práce s buněčným materiálem probíhala za striktně sterilních podmínek ve Flowboxu (Biohazard box SafeFAST Classic, Shoeller Instruments).

#### Buněčné linie

V této práci byly použity dvě linie keratinocytů (HaCaT, A431) a jedna linie fibroblastů (NHDF). Linie keratinocytů HaCaT představovala fyziologické prostředí lidských kožních buněk ze zdravého dárce, zatímco linie keratinocytů A431 byla získána z epidermálních buněk pacienta s rakovinou kůže. Linie fibroblastů NHDF byla získána z dermálních fibroblastů zdravého dárce. Byla začleněna do experimentů zejména v případě mikroskopické části, a to z důvodu jejich velikosti, jež umožňovala preciznější zobrazení buněčných struktur.

#### Kultivační podmínky a pasážování

Buněčné linie byly kultivovány v plastových lahvích o rozměru 75 cm<sup>2</sup> (Techno Plastic) v jednotném modifikovaném základním médiu – Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco™). Kultivační médium dále obsahovalo 10 % fetálního bovinního séra (FBS, inaktivováno, filtrováno Gibco™), 2 mM (1 %) L-glutaminu (Gibco™) a antibiotika penicilin a streptomycin (10 000 U/ml penicilinu a 10 µg/ml streptomycinu = 1 % celkového objemu média). Buňky byly inkubovány v inkubátoru při 37 °C, s 5 % CO<sub>2</sub>.

Pokud není zmíněno jinak veškeré buněčné linie byly pasážovány identickým způsobem. Jelikož se ve všech případech jedná o adherentní buňky, pasážování buněk nejprve zahrnovalo oplach předeřhřátým roztokem 5 % kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA, Gibco™) ve fosfátovém pufru (PBS, Gibco™). Linie keratinocytů HaCaT a A431 vyžadovaly delší inkubaci (10 min) s tímto chelatačním roztokem než fibroblasty, jež stačilo pouze opláchnout. Poté se tekutina zcela odsála a k buňkám se následně se přidal 1 ml roztoku 0,1 % trypsinu v PBS/EDTA, jež se nechal působit 10 minut

v inkubátoru. Působení trypsinu bylo následně zastaveno přidáním 5 ml kultivačního média (DMEM + 10 % FBS). Z výsledného objemu 6 ml buněčné suspenze se odebralo 30  $\mu$ l pro vypočítání jejich koncentrace z Bürkerovy komůrky.

### **Experimentální podmínky/Organizace pokusů**

Za účelem nasazení buněk na experiment se buňky nechaly narůst do konfluence 60-90 %. V závěru pasážování bylo převedeno 30  $\mu$ l buněčné suspenze do Bürkerovy komůrky, takto byla dopočítána koncentrace buněk. V závislosti na experimentu byl do různých formátů kultivačních destiček nasazován standardní počet buněk keratinocytů i fibroblastů a to 10 000 buněk na  $\text{cm}^2$ . V odlišné koncentraci byly buňky vysazovány pouze ve zvláštních případech, jež budou dále popsány.

- Pro analýzu buněk na průtokovém cytometru a charakterizaci buněčné populace prostřednictvím její dynamiky růstu (doubling time) byly buňky nasazeny na 6-jamkové desky (TPP Techno Plastic Products™).
- Pro měření buněčné viability, cytotoxické testy a experimenty s pH senzitivní sondou SNARF-1 byly použity 96-jamkové destičky (TPP Techno Plastic Products™).
- Pro experimenty zahrnující mikroskopii byly využity 4-jamková sklíčka (Lab-Tek®) nebo tenká krycí sklíčka pro zobrazení živých buněk (Live Cell Imaging Coverglass, Eppendorf)

Veškeré experimenty (vyjma pokusů charakterizující dynamiku růstu buněčných linií) byly prováděny po 24 h od nasazení z důvodu úplného přisednutí buněk k podkladu. Každý experiment byl třikrát nezávisle zopakován.

## 4.2 Charakterizace buněk

### 4.2.1 Dynamika růstu populace buněčné linie

Jednou ze základních metod charakterizace buněčné populace je určení dynamiky jejího růstu. Toho bylo dosaženo stanovením počtu buněk v narůstajícím čase (doubling time, DT). Buňky A431, HaCaT, NHDF byly nasazeny na 6-jamkovou desku v koncentraci 10 000 buněk/cm<sup>2</sup>. V čase 4 h, 24 h a 48 h jsou buňky z jamek staženy pomocí trypsinu a spočítány v Bürkerově komůrce. Dynamika růstu byla vypočítána pomocí volně dostupného programu <https://www.doubling-time.com/compute.php?lang=en> (Doubling Time Computing, Roth V.).

### 4.2.2 Charakterizace buněčné linie NHDF fluorescenčním mikroskopem Olympus

Za účelem charakterizace buněčné linie NHDF byly vizualizovány některé buněčné struktury a organely. Tytéž postupy barvení živých i fixovaných buněk byly použity pro kolokalizaci SiNP a SNARF-1.

#### **Obecný postup fixace**

K fixaci byl využíván 3 % roztok glutaraldehydu (GA, Sigma-Aldrich) v PBS. Nejprve bylo odsáto médium, následoval 3x oplach 500 µl PBS. Poté bylo k buňkám přidáno 500 µl 3 % GA, inkubace 15 min ve tmě při RT. Po inkubaci byly buňky opláchnuty 3 x 500 µl PBS, sklíčko bylo zamontováno do montovacího média (Thermo Scientific™ Shandon™ Immu-Mount™). Preparáty byly ponechány v lednici k zaschnutí.

#### **Barvení**

Buňky byly po fixaci permeabilizovány 0,1 % roztokem Tritonu v PBS po dobu 20 min při RT (přikryto alobalem). Následoval 2x oplach 500 µl PBS. Poté bylo přidáno 500 µl konkrétního barvicího roztoku, následovala inkubace za podmínek uvedených v tabulce č. 1. Po inkubaci opět následovalo opláchnutí sklíčka 2x 500 µl PBS. Sklíčko bylo zalito do montovacího média, přikryto krycím sklíčkem a uloženo k zaschnutí do lednice. Vzorek byl po celou dobu manipulace a uskladnění držen ve tmě.

Název	Výrobce	Ředění	Inkubace při 37°C	Excitace (nm)	Emise (nm)
Phalloidin + Alexa Fluor 488	Invitrogen	1 µM	45 min	551	567
DAPI	Sigma	1 µM	15 min	340	488
MitoTracker RED CMXRos	Invitrogen	100 nM	30 min	579	599
Mitotracker Green	Invitrogen	100 nM	30 min	490	516
LysoTracker MHB207	VŠCHT, (Havlík et al. 2019)	250 nM	10 min	350-400	400-450

Tab. č. 1: Aplikované fluorescenční látky a podmínky jejich použití

Snímky byly pořízeny na inverzním fluorescenčním mikroskopu (Olympus IX71) barevnou kamerou (Olympus DP74) objektivem 40x a 100x (UPlanPI s použitím imerzního oleje Olympus).

- ❖ Kanál 2 (pro DAPI, LysoTracker MHB207) vlnové délky excitace 360 – 370 nm, vlnové délky emise 420-460 nm
- ❖ Kanál 3 (pro FITC, Mitotracker Green, 2-NBDG - zelená fluorescence) excitace 470-495 nm, emise 510-550 nm.
- ❖ Kanál 5 (pro RhoB, SNARF-1, Mitotracker Red CMXRos – červená fluorescence) excitace 510-550 nm, emise 570 nm.

#### 4.2.3 Stanovení buněčné životaschopnosti

Obecný postup:

Byl připraven 10 % roztok MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium)) do předeřátého kultivačního média. Na jednu jamku 96-jamkové desky bylo aplikováno 100 µl 10 % MTS, včetně blanku (pouze 10 % roztok MTS). Inkubace trvala 2 hodiny v 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Hodnoty absorbance byly změřeny na destičkovém spektrometru (Spark® multimode microplate reader, Tecan Trading AG) při nastavené vlnové délce 490 nm a při 655 nm, což byla hodnota pozadí, která se následně odečítala.

## MTS A431 a HaCaT

Pro studium buněčné viability vybraných buněčných linií byly vysety buňky A431 a HaCaT v koncentraci 10 000, 15 000 a 20 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Po 24 h bylo odsáto médium, bylo přidáno 100 µl 10 % MTS na jamku, byly vyčleněny jamky pro blank. Po uplynutí inkubace bylo provedeno měření na destičkovém spektrometru za zmíněných podmínek.

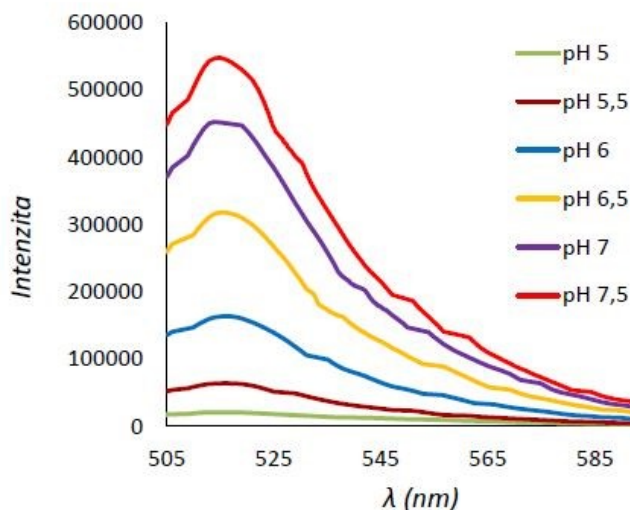
### 4.3 Charakterizace křemíkových nanočástic

Studované křemíkové nanočástice (SiNP) byly připravovány na Ústavu analytické chemie VŠCHT pod vedením *doc. RNDr. Ing. Pavla Řezanky, Ph.D.*. Při mém nástupu na diplomový projekt byly nanočástice připraveny právě končící studentkou Ing. Špačkovou. Nanočástice připravené v té době se vyznačovaly stabilní vazbou fluoroforů k nanočástici, vzorky byly sterilní, nanočástice netvořily shluky a vyskytovaly se dle testovacích mikroskopických snímků uvnitř buňky. To byly taktéž předpoklady pro další studium těchto nově vyvinutých fluorescenčních SiNP. Po rozšíření spolupráce a nastoupení nové studentky Ing. Anety Motyčkové do VŠCHT laboratoře se bohužel již nedařilo podle původního protokolu připravit identické nanočástice. Po dodání mnoha vzorků čerstvě připravených nanočástic, jež byly zároveň mým jediným dostupným materiálem, byla při prvních testovacích pokusech odhalena jejich nekvalita. Až po dvou letech byly nakonec dodány takové vzorky, jež alespoň částečně splňovaly naše původní požadavky. Těmito nanočásticemi byly SiNP z šarže F dodané v červnu 2020 (typ F-RF – s Rho B i FITC, typ F-R – pouze s Rho B). Všechny připravené a dodané nanočástice jsou chronologicky seřazeny do šarží A-F, znázorněno níže v tabulce č. 2.

šarže	datum převzetí
A	08.11.2018
B	22.03.2019
C	09.10.2019
D	12.12.2019
E	04.05.2020
F	16.06.2020

Tab. č. 2: Šarže nanočástic obdržných v průběhu diplomové práce.

Nově vyvinuté křemíkové nanočástice se sice lišily průměrem, avšak princip zůstával stejný. K detekci pH uvnitř buňky byly nanočástice modifikovány dvěma fluorofory. Na jejich povrchu byl připojen fluorescein isothiokyanát (FITC), jehož fluorescence se mění v závislosti na pH v rozmezí 5-7,5 (obr. č. 5). Dále byl na částici taktéž navázán na pH nezávislý fluorofor rhodaminB (Rho B), který se na rozdíl od FITC „nezháší“ a v hodnotách od pH 4-10 je jeho emisní fluorescence stabilní. Proto byl zvolen k vazbě na nanočástici za účelem její lokalizace.



Obr. č. 5: Fluorescenční spektra měřená ve vodném roztoku FITC při pH 5-7,5. Při excitaci 495 nm (převzato z diplomové práce Motyčková, 2017).

Samotné křemíkové nanočástice byly v laboratořích VŠCHT syntetizovány metodou alkalické hydrolyzy tetraethoxysilanu, tak aby obsahovaly aminopropylové skupiny nutné pro vazby s fluorofory. Následně byly nanočástice modifikovány fluorescenční látkou FITC o různých koncentracích (1,7-0,005 mmol/l), byly testovány různé koncentrace, aby byl zajištěn dostatek vazebných aminoskupin pro vazbu Rhodaminu B. K další modifikaci byly vybrány SiNH<sub>2</sub> s fluoroforem FITC o koncentraci 0,03 mmol/l. Nanočástice s navázaným FITC i Rho B byly proměřeny na fluorescenčním spektrometru, opět byly vzorky analyzovány výše zmíněnými metodami.

Byla provedena obrazová analýza snímků nanočástic pořízených na TEM – transmisním elektronovém mikroskopu (graf s obrázkem č. 6). U každého typu nanočástic byl určen jejich průměr a polydisperzní index (PI), který charakterizuje disperzitu částic (Tab. č. 3). Pokud se hodnota PI blíží jedné, znamená to, že nanočástice se budou více shlukovat a tvořit aglomeráty, což je pro jejich vizualizaci nežádoucí. Hodnota PI byla u nově dodaných nanočástic nižší než 0,1, proto mohou být považovány za monodisperzní. V tabulce č. 2 jsou specifikovány všechny obdržené šarže, dále se budu věnovat pouze poslední šarži F, která jediná splňovala parametry (Tab. č. 4, graf č. 6).

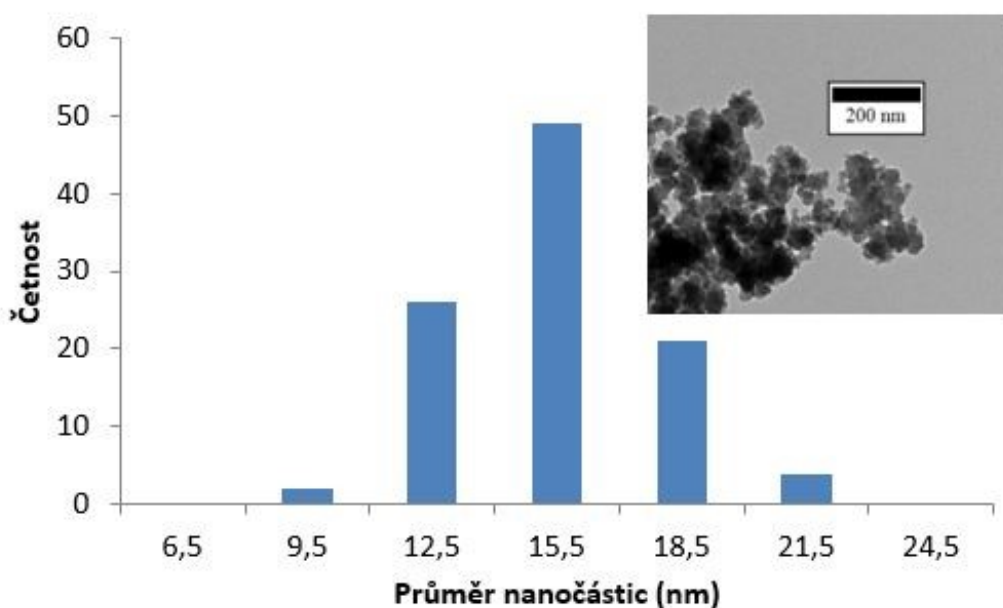
Typ nanočástic	Průměr nanočástic (nm)	Polydisperzní index
<b>A</b>	247 ± 17	0,0047
<b>B</b>	43,9 ± 3,5	0,0064
<b>C1</b>	10,2 ± 1,2	0,0138
<b>C2</b>	12,0 ± 2,1	0,0306
<b>D</b>	147 ± 12	-
<b>E1</b>	14,2 ± 2,2	0,0249
<b>E2</b>	8,6 ± 1,6	0,0354
<b>F-R</b>	14,2 ± 2,2	0,0249

Tab. č.3: Průměr nanočástic jednotlivých šarží spolu s výběrovou směrodatnou odchylkou a polydisperzní index pro jednotlivé typy nanočástic. Všechny šarže měřeny po navázání Rho B i FITC, u šarže D byl fluorescein uvnitř, dostupný údaj pouze o zeta potenciálu, u typu E2 a F-R změřen rozměr nanočástice pouze s Rho B) (převzato z Špačková et al. 2019).

U připravených nanočástic z šarže F-RF byly změřeny maximální intenzity v emisním spektru pro obě fluorescenční látky, viz tabulka č. 3. Graf č. 6 znázorňuje četnost naměřených průměrů nanočástic s přiloženým snímkem z TEM.

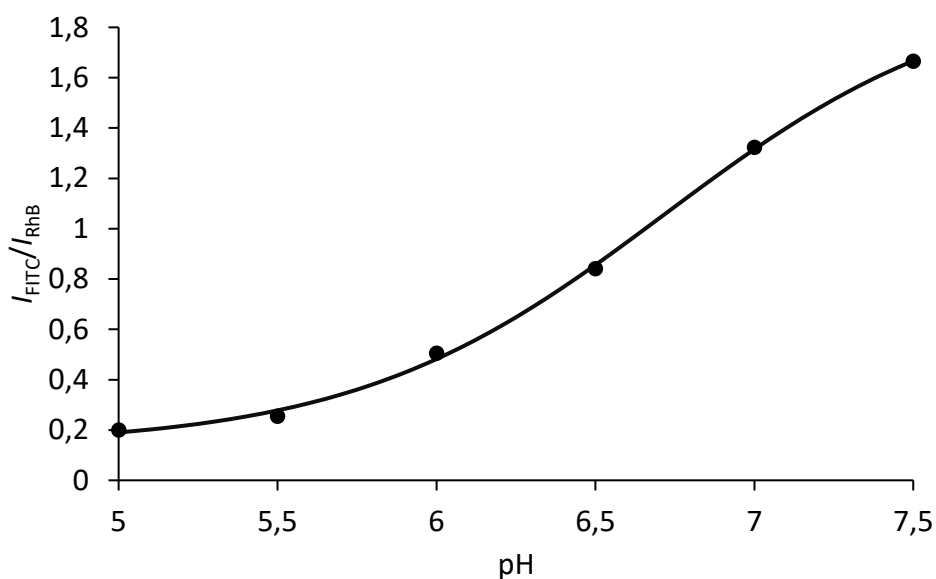
Vzorek	FITC			Rhodamin B	
	koncentrace FITC (mmol/l)	ředění	max. intenzita	ředění	max. intenzita
F-RF	nemodifikováno pomocí FITC			640×	$42,2 \cdot 10^3$
F-RF	0,03	31,25×	$51,6 \cdot 10^3$	125×	$39,0 \cdot 10^3$

Tab. č. 4: Hodnoty maximální intenzity v emisních spektrech pro FITC (při 516 nm) a pro rhodamin B (při 581 nm) u jednotlivých připravených nanočástic. Taktéž koncentrace FITC použitého při přípravě a ředění suspenze nanočástic pro měření emisních spekter FITC a rhodaminu B (převzato z diplomové práce - Špačková et al. 2019).



Graf č. 6: Histogram velikostí nanočástic typu F-RF naměřených pomocí snímků z TEM (převzato z Špačková et al. 2019).

Dále byly po inkubaci v pufrách o hodnotách pH 5-7,5 proměřeny emisní spektra této nanočástice na fluorescenčním spektrometru. Z naměřených spekter byly odečteny hodnoty maximální intenzity pro obě fluorescenční látky. Jejich poměr hodnot byl vyneseno v závislosti na pH do grafu a proloženo sigmoidální funkcí. Z grafu č. 7 je patrné, že s rostoucí hodnotou pH také roste poměr maximální intenzity FITC a rhodaminu B.



Graf č. 7: Závislost poměru maximálních intenzit FITC a rhodaminu B v jejich emisních spektrech na pH pufru pro nanočástice typu R-RF (převzato z Špačková et al. 2019).

Za předpokladu, že SiNP vniknou dovnitř buněk, bude možné analyzovat fluorescence FITC v programu Imaris. Při shodném nastavení pokusu i snímání fotek bylo zamýšleno vyhodnotit změny fluorescence FITC v závislosti na pH. Analýzou obrazu by poté bylo možné vypočítat vnitrobuněčné pH v různých buněčných liniích a vzájemně je porovnat.

#### 4.3.1 Testování možné cytotoxicity rozdílných koncentrací SiNP

Pro stanovení buněčné viability buněk A431 a HaCaT po inkubaci s SiNP bylo nasazeno 10 000 buněk/cm<sup>2</sup> na 96-jamkovou desku. Před ředěním a následnou aplikací k buňkám bylo nutné vzorky SiNP sonikovat 45 min v ledu a poté vortexovat. Následovalo ředění SiNP do DMEM média s 5 % FBS (v koncentracích 25 µg/ml, 50 µg/ml a 100 µg/ml). Po 24 hod od nasazení byly buňky opláchnuty 100 µl PBS, poté bylo přidáno 100 µl připraveného roztoku SiNP v různých koncentracích. Kontrola obsahovala buňky ve 100 µl DMEM média s 5 % FBS. Naředěné roztoky SiNP byly přidány i do prázdných jamek jako kontrola, že nanočástice nereagují s MTS roztokem. Následovala inkubace 24 hod při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Poté byly buňky i jamky pouze s SiNP opláchnuty 100 µl PBS. Bylo přidáno 100 µl 10 % roztoku MTS v kultivačním médiu DMEM s 10 % FBS. Inkubace trvala 2 hod při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po uplynutí

inkubace bylo provedeno měření na destičkovém spektrometru za výše uvedených podmínek.

#### 4.3.2 Proliferační test CyQuant

Nejprve byl připraven 1X HBSS pufr zředěním 2,2 ml 5X HBSS pufru (Komponenta C) do 8,8 ml MilliQ vody (celkové množství 11 ml). Barvicí roztok byl připraven smíšením 11 ml 1X HBSS pufru s 22  $\mu$ l CyQUANT® NF barvicí komponentou (Komponenta A). Po analýze buněčné viability pomocí MTS testu bylo z buněk odsáto médium a do stejných jamek bylo přidáno 50  $\mu$ l barvicího roztoku CyQUANT. Po 1 hodině inkubace ve tmě při 37 °C byla destička analyzována pomocí destičkového spektrometru (Spark® multimode microplate reader, Tecan Trading AG) při vlnových délkách excitace 485 nm a emise 530 nm. Metoda byla zavedena pro normalizaci buněk po MTS testu, podílem hodnot absolutní absorbance při MTS testu a počtem buněk barvených CyQuant se vyjádřila normalizovaná absorbance, která se následně porovnávala s kontrolou (100 %) a vyjádřila v procentech.

#### 4.6 Vizualizace SiNP fluorescenčním mikroskopem Olympus

Pro lokalizaci SiNP v rámci buněčného systému bylo využito fluorescenční mikroskopie. Buňky A431 a HaCat byly vysety na 4-komůrkové sklíčko v koncentraci 10 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Po 24 h byly buňky opláchnuty 500  $\mu$ l PBS. Vzorky SiNP byly před aplikací sonikovány 45 min na ledu, vortexovány a naředěny do DMEM s 5 % FBS (v koncentracích 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml a 100  $\mu$ g/ml). Po oplachu byly přidány SiNP v různých koncentracích k buňkám v množství 500  $\mu$ l, ke kontrole bylo přidáno pouze 500  $\mu$ l DMEM s 5 % FBS. Následovala inkubace po dobu 15 min při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Pro poslední šarži nanočástic (šarže F) bylo zařazeno během inkubace buněk s nanočásticemi barvení buněčných jader DAPI (podle podmínek v tab. č. 3), jež sloužilo k lokalizaci buněk. Po tomto simultánním barvení byl přidán 1  $\mu$ l 0,01 % roztok Tritonu (v PBS) za účelem podpořit vstup nanočástic do buněk, inkubace s Tritonem trvala 1 min. Po inkubaci byly buňky standardně opláchnuty 500  $\mu$ l PBS, bylo přidáno 500  $\mu$ l DMEM média. Sklíčko s živými buňkami bylo foceno na světelném mikroskopu (Olympus IX71)

s kamerou (Olympus DP74, objektiv 40x) v kanálu 3 pro FITC a 5 pro Rhodamin B (viz níže).

Po nasnímání živých buněk bylo sklíčko zafixováno. Nejprve bylo odsáto médium, pak následoval oplach 500  $\mu$ l PBS. K fixaci byl použit 3 % roztok glutaraldehydu v PBS (GA, Sigma-Aldrich) v množství 500  $\mu$ l, inkubováno 20 min, ve tmě při RT. Po inkubaci byly buňky opláchnuty 500  $\mu$ l PBS a sklíčko bylo zamontováno do montovacího média (Thermo Scientific™ Shandon™ Immu-Mount™). Preparáty byly uchovávány při 4°C.

Snímky byly pořízeny na inverzním fluorescenčním mikroskopu (Olympus IX71) barevnou kamerou (Olympus DP74) a objektivem 40x a 100x (UPlanPI s použitím imerzního oleje Olympus). Snímky byly foceny v programu cellSens Standard (Olympus).

- ❖ Kanál 2 (pro DAPI – modrá fluorescence) excitace 360-370 nm, vlnové délky emise 420-460 nm
- ❖ Kanál 3 (pro FITC - zelená fluorescence) excitace 470-495 nm, emise 510-550 nm
- ❖ Kanál 5 (pro Rho B - červená fluorescence) excitace 510-550 nm, emise 570 nm

### **Agarový test možné kontaminace nanočástic**

Byly připraveny 12-jamkové destičky s nalitým agarem. Agar (Bacto Agar) byl připraven v koncentraci 3,5 % (smícháním 3,5 g na 100 ml vody, rozpuštěn autoklávováním). Pro test možné kontaminace byly použity dva typy nanočástic z šarže E (typ E1 a E2 -rozdílné rozměry, oba typy dodané v destilované vodě). Pro srovnání byly použity poslední dodané nanočástice typu F (typ F-RF - Rho B i FITC a F-R – pouze s Rho B dodané v metanolu, typ E-RF s MilliQ vodě). Ze čtyř připravených roztoků nanočástic bylo odebráno kličkou identické množství a rozetřeno po plotně agaru. Po 48 hod inkubaci v inkubátoru při 37 °C byly jamky vyfoceny.

## 4.7 Lokalizace SiNP pomocí konfokální mikroskopie

Skenovací konfokální mikroskop využívá jako zdroj světla laser, který je přes systém clonek zaměřován na vzorek. Vzorek je dále skenován bod po bodu. Tento druh mikroskopie umožňuje zaostření na jeden bod, pro celkovou vizualizaci je nutné složit všechny snímky a zároveň je tak možné odfiltrovat signál vycházející nad a pod rovinou sledovaného vzorku. Výhodou je snímání sérií optických řezů a jejich následné složení do 3D modelu.

Snímky byly pořízeny na skenovacím konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems) s použitím digitální CCD kamery (Leica DFC365 FX) a objektivu při zvětšení 63 (HC PL APO CS2 63x / 1.40 OIL objective) na Klinice dětského lékařství, I.LF UK a VFN.

### Vizualizace SiNP typu F-RF pomocí konfokální mikroskopie

Buňky linie A431 a HaCaT byly nasazeny v koncentraci 10 000 buněk/ cm<sup>2</sup> na 4-jamkové sklíčko (Cell Imaging Coverglass, Eppendorf). Po 24 h byly buňky opláchnuty 500  $\mu$ l PBS. Vzorky SiNP byly před aplikací sonikovány 45 min na ledu, vortexovány a naředěny do DMEM s 5 % FBS (koncentrace 100  $\mu$ g/ml). Po oplachu byly přidány SiNP k buňkám v množství 500  $\mu$ l, ke kontrole bylo přidáno pouze 500  $\mu$ l DMEM s 5 % FBS. Následovala inkubace po dobu 15 min při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Během inkubace buněk s nanočásticemi bylo po 5 min přidáno do každé jamky DAPI (podle podmínek v tab. č. 1), jež sloužilo k lokalizaci buněk. Po tomto simultánním barvení byl přidán 1  $\mu$ l 0,01 % roztok Tritonu (v PBS) za účelem podpořit vstup nanočástic do buněk, inkubace s Tritonem trvala 1 min. Po inkubaci byly buňky standardně opláchnuty 500  $\mu$ l PBS. Následovala fixace, kontrola byla dodatečně barvena Phalloidin + Alexa Fluor 488 podle podmínek v tabulce č. 1. Fluorescence Phalloidin + Alexa Fluor 488 byla snímána za stejného nastavení detektoru jako pro FITC. Po 48 hod zaschnutí preparátu v lednici byly pořízeny snímky při zvětšení 63 (HC PL APO CS2 63x / 1.40 OIL objektiv), excitované při 405 nm a dále podle nastavení níže:

	Detektor	Emise (nm)	Gain
DAPI	PMT1	435-478	600
Rho B	PMT2	600-721	450
FITC (+ Phalloidin + AF 488)	HyD 3	505-550	50

Tab. č. 5: Nastavení detektorů pro kolokalizaci SiNP typu F-RF

#### 4.8 Lokalizace SiNP pomocí super-rezoluční mikroskopie (STED - Stimulated Emission Depletion)

Buňky linie A431 a HaCaT byly nasazeny v koncentraci 10 000 buněk/ cm<sup>2</sup> na 4-jamkové skličko (Cell Imaging Coverglass, Eppendorf). Po 24 h byly buňky opláchnuty 500 µl PBS. Vzorky SiNP byly před aplikací sonikovány 45 min na ledu, vortexovány a naředěny do DMEM s 5 % FBS (100 µg/ml). Po oplachu byly přidány SiNP k buňkám v množství 500 µl, ke kontrole bylo přidáno pouze 500 µl DMEM s 5 % FBS. Následovala inkubace po dobu 15 min při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Během inkubace buněk s nanočásticemi bylo po 5 min přidáno do každé jamky DAPI (podle podmínek v tab. č. 1), jež sloužilo k lokalizaci buněk. Po tomto simultánním barvení byl přidán 1 µl 0,01 % roztok Tritonu (v PBS) za účelem podpořit vstup nanočástic do buněk, inkubace s Tritonem trvala 1 min. Po inkubaci byly buňky standardně opláchnuty 500 µl PBS. Následovala fixace a zaschnutí preparátu v lednici po dobu 48 hod.

Snímky byly pořízeny na zapůjčeném STED mikroskopu od firmy Aberrior Instruments, typ STEDYCON na Matematicko-fyzikální fakultě Přírodovědecké fakulty UK v laboratoři Mgr. Anny Fučíkové, Ph.D. Bylo použito zvětšení 100x, detektor pro RhoB detektor 650-700 nm, pro snímání FITC detektor 575-625 nm, znázorněno v tabulce č. 6.

	Excitace (nm)	Emise (nm)	Gain
DAPI	405	461	33 %
Rho B	561	650-700	50 %
FITC	488	575-625	50 %

Tab. č. 6: Nastavení detektorů pro kolokalizaci SiNP typu F-RF

## 4.9 Stanovení intracelulárního pH pomocí pH indikátoru SNARF-1

Byl připraven roztok pH indikátoru SNARF-1 v DMEM médiu bez FBS o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . FBS bylo vynecháno z důvodu možné interakce esteráz obsažených v FBS s indikátorem. Pro další eliminaci buněčných esteráz byl zařazen oplach buněk PBS před aplikací roztoku SNARF-1. Po 24hod od nasazení buněk byl přidán roztok SNARF-1 (množství uvedené níže pro každou metodu), inkubace s buňkami trvala 30 min při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po uplynutí inkubace byl roztok SNARF-1 odsán a objem byl doplněn samotným DMEM médiem.

- V případě měření na spektrometru bylo přidáváno 100  $\mu\text{l}$  barvicího roztoku na 1 jamku 96-jamkové desky o rozloze 0,334 cm<sup>2</sup>.
- V případě analýzy průtokovým cytometrem byl přidáván 1ml barvicího roztoku na 1 jamku 6-jamkové desky o rozloze 9,026 cm<sup>2</sup>.
- Pro vizualizaci indikátoru v buňce metodou fluorescenční mikroskopie bylo přidáváno 500  $\mu\text{l}$  barvicího roztoku na 1 jamku 4-jamkového sklíčka o rozloze 1,7 cm<sup>2</sup>.

### 4.9.1 Kalibrace SNARF-1

K dopočítání hodnot pH bylo nutné nejdříve SNARF-1 kalibrovat v roztocích o různých hodnotách pH za přítomnosti K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> ionoforu Nigericin (Sigma-Aldrich). Smíšením kyselého pufru A a zásaditého pufru B v odlišných poměrech byly připraveny pufrы o hodnotách pH: 6,5; 7; 8.

Byly nasazeny buňky linie HaCaT a A431 v koncentraci 10 000 buněk na cm<sup>2</sup>, po 24 hod byly opláchnuty 100  $\mu\text{l}$  PBS. Připravený 10  $\mu\text{M}$  roztok SNARF-1 (v DMEM médiu bez FBS) byl poté přidán v množství 100 $\mu\text{l}$  na jamku. Po uplynutí 30 min inkubace při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru byly buňky opláchnuty 100  $\mu\text{l}$  PBS. Do příslušných jamek byly přidány pufrы o hodnotě pH 6,5; 7; 8 v množství 100  $\mu\text{l}$  na jamku, zároveň byl přidán i ionofor Nigericin (2  $\mu\text{l}$  na jamku, 1 mg/ml v MillQ vodě). Inkubace trvala 30 min při RT ve tmě. Kontrolní buňky byly ponechány v DMEM médiu.

Experimenty s pH indikátorem SNARF-1 zahrnovaly tři metody

1. Detekce SNARF-1 metodou fluorescenčním spektroskopie
2. Detekce SNARF-1 metodou průtokové cytometrie
3. Vizualizace SNARF-1 pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus

#### *4.9.2 Detekce SNARF-1 metodou fluorescenčním spektroskopie*

Buňky linie HaCaT a A431 byly nasazeny na 96-jamkovou destičku v koncentraci 10 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Po 24 hod bylo odsáto kultivační médium, následoval oplach 100 µl PBS. Byl připraven roztok SNARF-1 v DMEM médiu bez FBS o koncentraci 10 µM. K buňkám bylo přidáno 100 µl roztoku SNARF-1 a buňky byly inkubovány 30 min při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Buňky byly před změřením opláchnuty a ponechány v PBS. Analýza byla provedena na destičkovém spektrometru Tecan (Spark<sup>®</sup> multimode microplate reader, Tecan Trading AG) v režimu měření intenzity fluorescence při nastavené vlnové délce excitace 488 nm a emise 580 nm a 640 nm.

#### *4.9.3 Detekce SNARF-1 metodou průtokové cytometrie*

Buňky A431 a HaCaT byly nasazeny v koncentraci 10 000 buněk/cm<sup>2</sup> na 6-jamkové desky. V den měření byl připraven roztok SNARF-1 v DMEM médiu bez FBS o koncentraci 10 µM. Po 24 hod od nasazení byly buňky opláchnuty 1 ml PBS. K buňkám byl přidán 1ml připraveného roztoku SNARF-1. Inkubace trvala 30 min při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Následovalo převedení buněk včetně nebarvené kontroly do zkumavek určených pro analýzu v průtokovém cytometru (FACS - Fluorescent Activated Cell Sorting, BD FACSCanto<sup>™</sup>, BD Biosciences). Buňky byly opláchnuty a inkubovány 10 min v 1 ml roztoku EDTA při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Následovalo odsátí roztoku EDTA a přidání 300 µl předehřátého 0,1% roztoku trypsinu (v PBS/EDTA), následovala inkubace 10 min při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Poté bylo přidáno 700 µl kultivačního média DMEM + 10 % FBS. Buněčná suspenze byla převedena do označených zkumavek.

Následovala centrifugace při 300 g, v RT po dobu 5 min. Od pelety byl odsán supernatant, bylo přidáno 200 µl PBS, poté byla peleta homogenizována. Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru v programu FACS Diva (BD FACSDiva™, BD Biosciences) v kanálu BD3\*585\_42\*PE-A pro první emisní maximum při 580 nm a v kanálu BB2\*670\_LP\*PerCP-A pro druhé emisní maximum při 640 nm, znázorněno v tabulce č. 7. Data byla zpracována v programu FlowJo (FlowJo, LLC), byla určena průměrná hodnota intenzity fluorescence - MFI (z angl. *Median Fluorescence Intensity*).

Název kanálu	excitace (nm)	emise (nm)
PerCP	488	670
PE	488	585 ± 21

Tab. č. 7: Nastavení kanálů pro snímání SNARF-1 metodou průtokové cytometrie

#### 4.10 Vizualizace SNARF-1 fluorescenčním mikroskopem Olympus

Linie buněk HaCaT a A431 byly vysazeny na 4-jamkové sklíčko v koncentraci 10 000 b/cm<sup>2</sup> na 24 hodin. Byl nařazen SNARF-1 do DMEM média bez FBS v koncentraci 10 µM nebo 5 µM. Z předpěstovaných buněk bylo odsáto kulturační médium, následoval oplach 500 µl PBS. Poté bylo přidáno 500 ul připraveného roztoku SNARF-1, buňky byly inkubovány 30 min při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> inkubátoru. Následně byl roztok odsán, buňky byly opláchnuty v PBS a foceny živé v 10 % FBS DMEM médiu. Snímky byly pořizovány na fluorescenčním mikroskopu (Olympus IX71) s kamerou (Olympus DP74, objektiv 40x) v kanálu 5 (excitace 510 – 550 nm/emise 570 nm).

Po fixaci buněk linie HaCaT inkubovaných s pH indikátorem SNARF-1 v koncentraci 5 µM a 10 µM byla buněčná jádra dodatečně barvena DAPI (Sigma, excitace při 340 nm, emise při 488 nm). Pro lokalizaci SNARF-1 v buňce byl následně aktin značen pomocí Phalloidin + AF 488 (Invitrogen, excitace při 551, emise při 567 nm). Fixace a barvení buněk probíhalo podle obecného postupu fixace a barvení dále podle podmínek uvedených v tab. č. 1.

K vizualizaci buněčných lysozomů v živých buňkách byl aplikován LysoTracker MHB207 při optimálních vlnových délkách excitace 350-400 nm a emise 400-450 nm, který byl připraven kolegy z VŠCHT (Havlík et al. 2019). Byl připraven barvicí roztok LysoTracker MHB207 (koncentrace 250 nM v 10 % FBS DMEM médiu). Po 20 min

inkubaci buněk se SNARF-1 byly buňky opláchnuty 500  $\mu$ l PBS a bylo přidáno 500  $\mu$ l barvicího roztoku LysoTracker MHB207. Po 10 min inkubaci byly buňky opláchnuty 500  $\mu$ l PBS a vyfoceny na fluorescenčním mikroskopu v následujících kanálech:

- ❖ Kanál 2 (pro DAPI, LysoTracker MHB207 – modrá fluorescence) vlnové délky excitace 360-370 nm, vlnové délky emise 420-460 nm
- ❖ Kanál 3 (Phalloidin + AF 488 - zelená fluorescence) vlnové délky excitace 470-495 nm, vlnové délky emise 510-550 nm.
- ❖ Kanál 5 (SNARF-1– červená fluorescence) vlnové délky excitace 510-550 nm, vlnové délky emise 570 nm.

Po vyfocení živých buněk bylo sklíčko zafixováno. K fixaci byl použit 3 % roztok glutaraldehydu (GA, Sigma-Aldrich) v MilliQ vodě. Nejprve bylo odsáto médium, následoval oplach 500  $\mu$ l PBS. Následně se k buňkám přidalo 500  $\mu$ l 3 % GA na 20 min inkubace v temnu (přikryto alobalem) a při RT. Po inkubaci byly buňky opláchnuty 500  $\mu$ l PBS a sklíčko bylo zamontováno do montovacího média (Thermo Scientific™ Shandon™ Immu-Mount™). Preparáty byly uchovávány při 4 °C.

Pro preciznější kolokalizaci SNARF-1 s různými buněčnými organelami byly zafixované buňky nasnímány na konfokálním fluorescenčním mikroskopu Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems). V těchto pokusech byl buněčný aktin vizualizován Phalloidinem konjugovaným s fluorescenční značkou Alexa Fluor 488 (Invitrogen™ Alexa Fluor™ 488 Phalloidin), jádro bylo značeno DAPI (Sigma). Metoda bude podrobněji popsána v samostatné kapitole Mikroskopie.

#### **4.11 Lokalizace SNARF-1 konfokálním mikroskopem**

Buňky HaCaT a A431 byly nasazeny v koncentraci 15 000 buněk/cm<sup>2</sup> na 4-jamkové sklíčko (Cell Imaging Coverglass, Eppendorf). Po 24 hod byly buňky inkubovány 30 min s 10  $\mu$ M SNARF-1 podle výše uvedeného postupu, 10 min před koncem inkubace byl přidán LysoTracker MHB 207 (podle podmínek v tab. č. 1). Po fixaci a permeabilizaci vzorku následovalo DAPI (Sigma) za podmínek uvedených v tabulce č. 8. Po 48 hod zaschnutí preparátu v lednici byly pořízeny snímky při zvětšení 63 (HC PL APO CS2 63x / 1.40 OIL objektiv), excitované při 405 nm a dále podle nastavení níže:

	Detektor	Emise (nm)	Gain
DAPI	PMT1	388-397	550
LysoTracker MHB207	PMT2	440-470	700
SNARF-1 580nm	HyD 3	570-590	50
SNARF-1 640nm	HyD 4	630-650	50

Tab. č. 8: Nastavení detektorů pro kolokalizaci SNARF-1.

#### 4.12 Stanovení buněčné spotřeby glukózy použitím jejího analogu 2-NBDG

Buňky A431 a HaCaT byly nasazeny na 6-jamkové destičky v koncentraci 10 000 buněk na cm<sup>2</sup>. Před aplikací byl připraven 10 μM roztok 2-NBDG do speciálního DMEM média, které neobsahovalo hydrogenuhličitan sodný, glukózu, glutamin ani pyruvát sodný (Agilent Seahorse XF DMEM Medium pH 7.4, © Agilent Technologies). Po 24 hod od nasazení byly buňky opláchnuty 1 ml PBS a postupně docházelo k přidání 1 ml 10 μM roztoku 2-NBDG - v čase 0 (celková inkubace 45 min), po 15 min (celková inkubace 30 min) a po dalších 15 min (celková inkubace 15 min) se přidal roztok 2-NBDG. Experiment byl proveden v duplikátu a byla zahrnuta i nebarvená kontrola. Po uplynutí inkubace byly všechny jamky vyfoceny na fluorescenčním mikroskopu (Olympus IX71) s kamerou (Olympus DP74, objektiv 40x) v kanálu pro FITC (rozsah vlnových délek excitace 470-495 nm a emise 510-550 nm).

Následovalo převedení buněk z desky do zkumavek. Po odsátí média byly buňky inkubovány 10 min v 1 ml předeštěného 5 % roztoku EDTA v PBS. Poté následovalo odsátí, přidání 300 μl 0,1 % roztoku trypsinu (v PBS/EDTA). Po 10 min inkubaci bylo působení trypsinu zastaveno přidáním 700 μl kultivačního média s FBS. Buněčná suspenze byla převedena do označených zkumavek.

Následovalo stočení buněk v centrifuze při 300 g, 5 min při pokojové teplotě (room temperature, RT). Od pelety byl odsán supernatant, peleta byla resuspendována v 200  $\mu$ l PBS. Analýza byla prováděna na průtokovém cytometru (FACS - Fluorescent Activated Cell Sorting, BD FACSCanto™ Flow Cytometer, BD Biosciences-US) pomocí softwaru FACSDiva (BD FACSDiva™ Software, BD Biosciences-US). Bylo měřeno 10 000 událostí z každé zkumavky. Byl použit kanál BE4\*530\_30\*FITC-A, popsáno v tabulce č. 9. Pro vyhodnocení dat byl použit program FlowJo (FlowJo, LLC), byla určena průměrná hodnota intenzity fluorescence - MFI (median fluorescence intensity).

Název kanálu	excitace (nm)	emise (nm)
FITC	488	530 $\pm$ 15

Tab. č. 9: Nastavení kanálu pro snímání 2-NBDG metodou průtokové cytometrie

#### 4.13 Charakterizace buněčného metabolismu metodou SeaHorse

Den před měřením bylo nasazeno 10 000 buněk linie HaCaT a A431 na  $\text{cm}^2$  do tří jamek ve speciální mikrodestičce pro tyto analýzy. Pro samotné měření bylo použito speciální SeaHorse médium s nízkou pufrací kapacitou a přesně definovanými složkami. V kazetě obsažené v námi používaném kitu (Agilent SeaHorse XFP, Real Time ATP Rate Assay kit) byly obsaženy 3 různé látky (modulátory: 1,5  $\mu$ M oligomycinu, a 0,5  $\mu$ M směs rotenonu a antimycinu A), které byly automaticky přidávány během měření. Po vložení kazety do analyzátoru následovala kalibrace optických senzorů. Následně byla vložena destička s nasazenými buňkami. Nejdříve byly změřeny výchozí hodnoty OCR (oxygen consumption rate) a ECAR (extracellular acidification rate), poté byla spuštěna analýza za působení inhibitorů, stimulantů, substrátů a dalších látek z kazety pomocí injekčního systému.

Analýza v reálném čase je možná díky dočasnému vytvoření mikroprostoru s 2-7  $\mu$ l média, které se oddělí nad monovrstvou buněk. Injikované modulátory byly přidávány do média v každé jamce. Po mírném promíchání se hodnoty OCR a ECAR změní pevnou próbou těsně nad monovrstvou buněk. Po měření se próby zvednou, což umožní

promíchání malého objemu v dočasné mikrokomůrce s velkým objemem mimo ni. Tím se mohou vrátit hodnoty OCR a ECAR do výchozího bodu (baseline).

Hodnoty OCR byly měřeny v jednotkách pmol/min, hodnoty ECAR v mpH/min. Pro udržení běžné buněčné fyziologie je udržována teplota buněčného prostředí na 37 °C pomocí systému kontroly teploty.

#### **4.13 Statistické vyhodnocení**

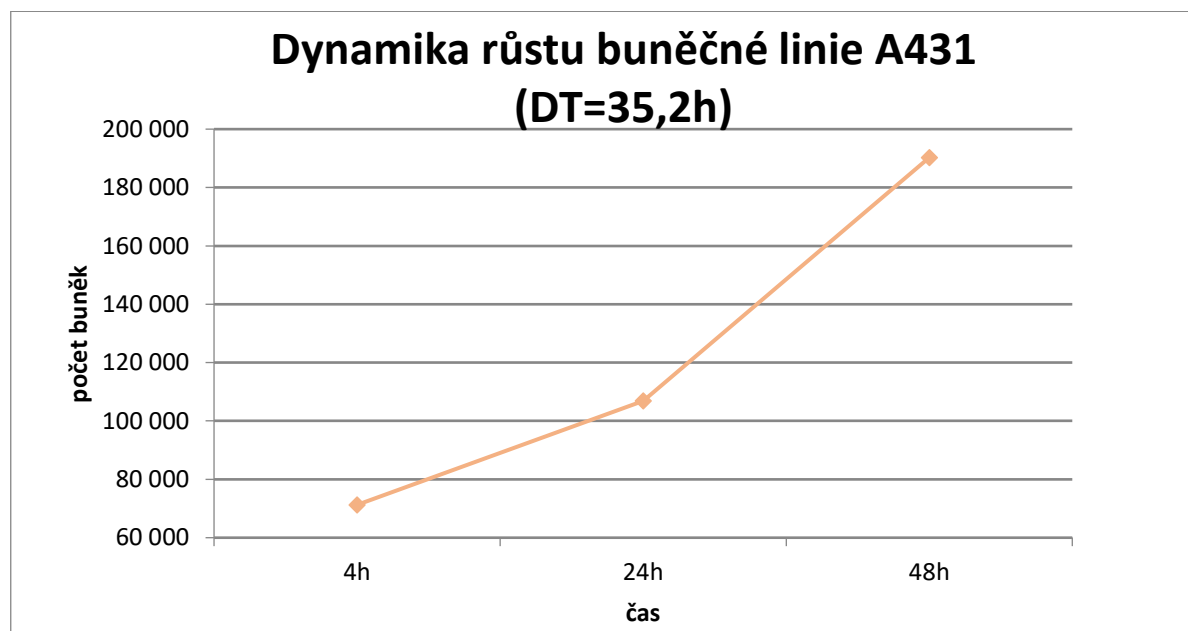
Prezentované výsledky pocházejí minimálně ze tří nezávislých opakování. Výsledky jsou vyjádřeny průměrnou hodnotou včetně směrodatné odchylky. Odlehlé a extrémní hodnoty byly vyloučeny po zobrazení krabicových grafů. Následně byla provedena neparametrická statistika porovnáním testovaných proměnných oproti kontrole (Wilcoxonův párový test). Navzájem byly porovnány získané hodnoty jednofaktorovou ANOVOU. Statisticky významné (signifikantní) hodnoty byly ty, jejichž p-hodnota se pohybovala pod 0,05 (\*) nebo pod 0,01 (\*\*).

## 5 Výsledky

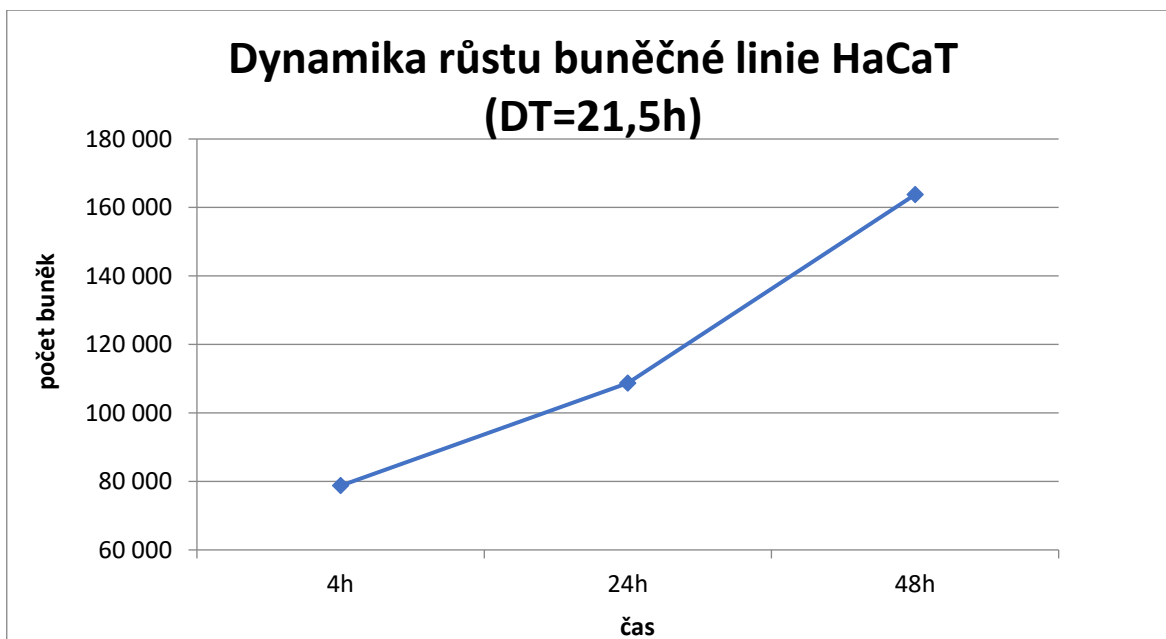
### 5.1 Charakterizace buněk

#### 5.1.1 Dynamika růstu populace buněčné linie

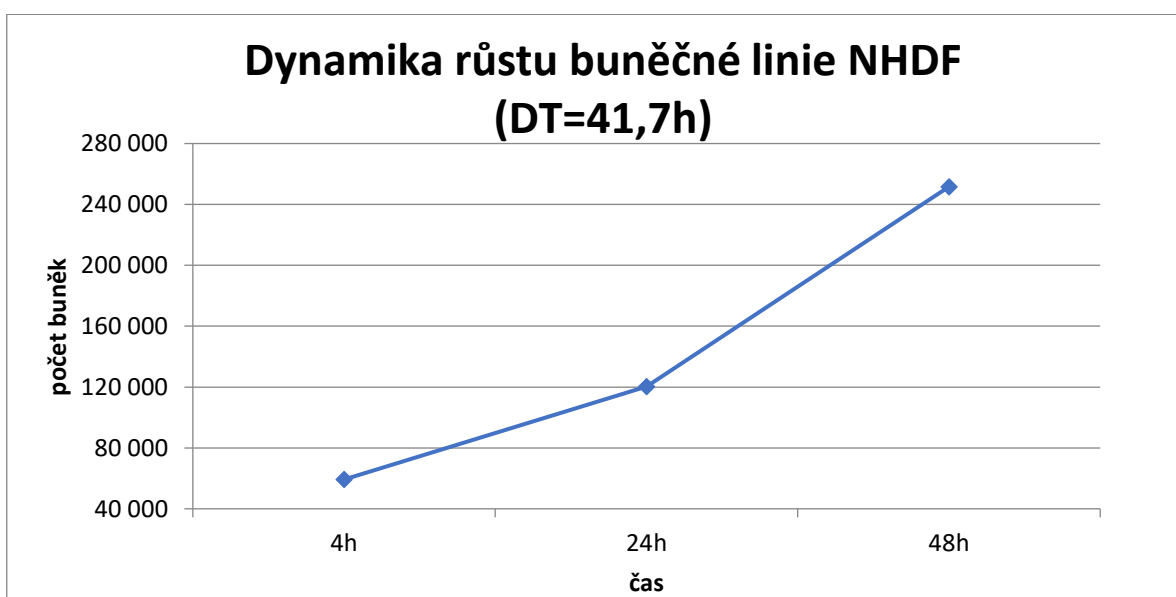
Buněčné linie byly charakterizovány na základě dynamiky růstu jejich populace. Pro výpočet dynamiky růstu buněčné populace byl sledován počet buněk v narůstajícím čase (doubling time, DT – doba zdvojení). Doubling time byl stanoven u všech použitých buněčných linií nasazených ve stejné koncentraci (10 000 buněk/cm<sup>2</sup>) (Graf.č. 7, 8, 9). Dynamika růstu byla vypočítána pomocí volně dostupného programu <https://www.doubling-time.com/compute.php?lang=en> (Doubling Time Computing, Roth V.). Výsledná hodnota DT vychází ze tří nezávislých experimentů. Pro buněčnou linii A431 byl stanoven DT 35,2 h, znázorněno na grafu v č. 8. Pro buněčnou linii HaCaT byl stanoven DT 21,5 h, znázorněno na grafu v č. 9. Pro buněčnou linii NHDF byl stanoven DT 41,7 h, znázorněno na grafu v č. 10.



Graf č. 8.: Dynamika růstu buněčné linie A431 v čase 4 h, 24 h, 48 h. Reprezentativní znázornění jednoho ze tří nezávislých pokusů. Průměrný DT byl stanoven na 35,2h.



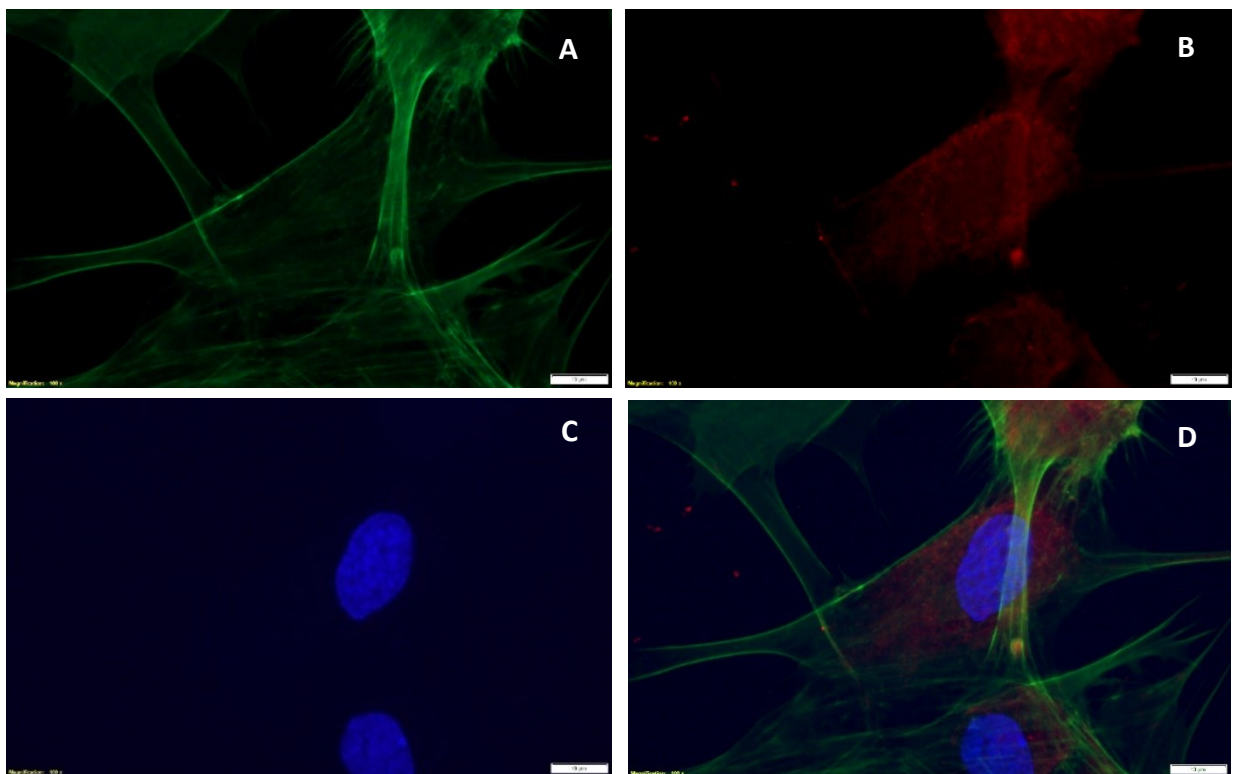
Graf č. 9: Dynamika růstu buněčné linie HaCaT v čase 4 h, 24 h, 48 h. Reprezentativní znázornění jednoho ze tří nezávislých pokusů. Průměrný DT byl stanoven na 21,5h.



Graf č. 10: Dynamika růstu buněčné linie NHDF v čase 4 h, 24 h, 48 h. Reprezentativní znázornění jednoho ze tří nezávislých pokusů. Průměrný DT byl stanoven na 41,7h.

### 5.1.2 Charakterizace buněčné linie NHDF fluorescenčním mikroskopem Olympus

Charakterizace buněčné linie NHDF byla zaměřena na vizualizaci buněčných struktur fluorescenčními látkami, jelikož tato linie byla využívána zejména v experimentální části zahrnující fluorescenční mikroskopii. Důvodem jsou rozměry jednotlivých buněk, a tedy i jednodušší rozlišitelnost jednotlivých buněčných kompartmentů. Na obrázku č. 11 je na snímku A aktin obarven zeleně Phalloidin + AF 488, na snímku B jsou mitochondrie obarveny MitoTrackerem RED CMXRos, na snímku C jsou jádra obarvena modře DAPI, snímek D je složen ze všech tří kanálů.

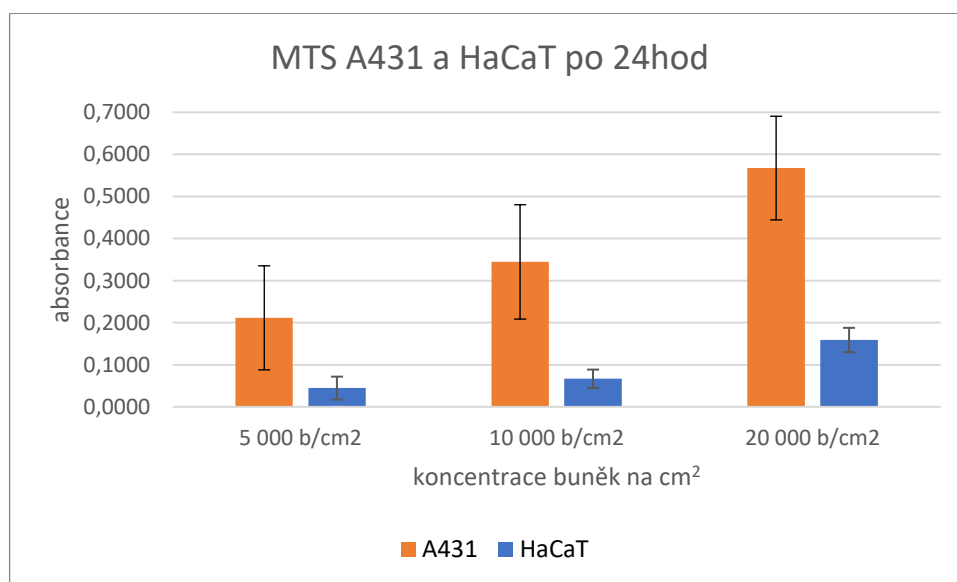


Obr. č. 11: Charakterizace buněčných struktur buněčné linie fibroblastů NHDF. Aktin obarven zeleně Phalloidin+AF488, mitochondrie barveny červeně MitoTrackerem RED CMXRos, jádra obarvena modře DAPI. Foceno objektivem 100x s použitím imerzního oleje (Olympus), bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.3 Stanovení buněčné životaschopnosti

Pro analýzu životaschopnosti buněk byl použit kolorimetrický test CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS, Promega Corporation), z výsledku tohoto testu lze odvodit případnou cytotoxicitu.

Metoda spočívá v kolorimetrické konverzi žlutě zbarveného roztoku MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium)) na fialově zbarvený formazan pomocí NADPH-dependentních dehydrogenáz a to pouze metabolicky aktivními buňkami. Buněčné linie HaCaT a A431 byly nasazeny ve třech různých koncentracích (10 000, 15 000 a 20 000 buněk/cm<sup>2</sup>). Změřením absorbance po 24 hod poukazuje na metabolicky aktivnější buňky linie A431 oproti buňkám linie HaCaT, jak znázorňuje graf č.12.



Graf č. 12: Absolutní hodnoty absorbance buněčné linie A431 v porovnání s buněčnou linií HaCaT. Buňky byly nasazeny ve třech různých koncentracích, kultivovány po dobu 24 h. Prezentované hodnoty jsou výsledkem tří nezávislých měření. Chybová úsečka představuje směrodatnou odchylku.

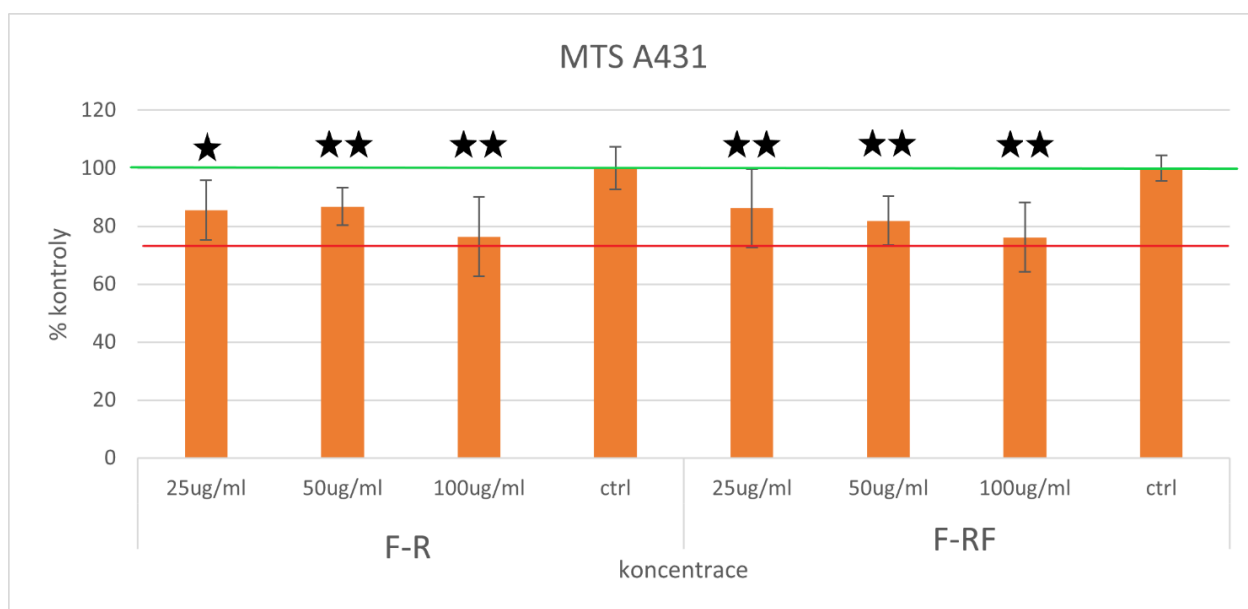
## 5.2 Charakterizace křemíkových nanočástic

### 5.2.1 Testování možné cytotoxicity rozdílných koncentrací SiNP

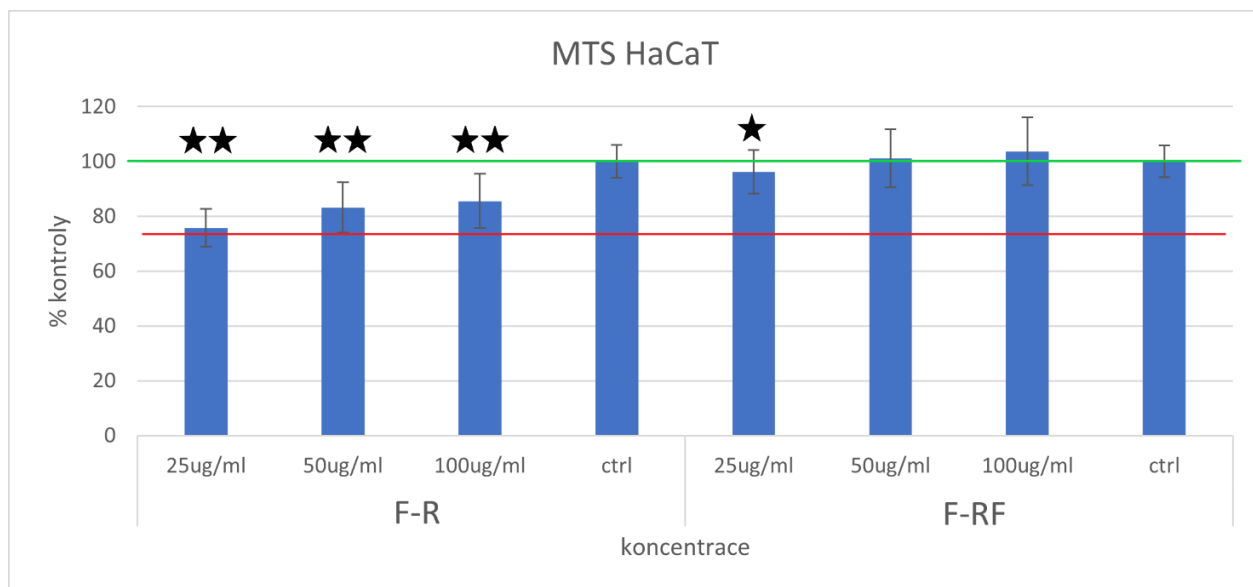
Před sofistikovanějšími experimenty s nanočásticemi je nejdříve nutné analyzovat jejich možnou cytotoxicitu. Cytotoxickými testy prošel každý nově syntetizovaný vzorek nanočástic. Pro stanovení cytotoxicity lze taktéž použít test buněčné životaschopnosti (MTS), znázorněno na grafu č. 13 a 14. Zobrazeny jsou pouze výsledky pro poslední šarži dodaných nanočástic (šarže F), které mohly být dále použity i pro další metody.

V literatuře zabývající se interakcemi buněk s nanočásticemi se považuje snížení životaschopnosti buněk pod 75 % částicemi neopůsobené kontroly již za cytotoxický efekt (Flahaut et al. 2006).

Pod hranicí 75 % životaschopnosti buněk se pohybují buňky A431 inkubované s nejvyšší použitou koncentrací nanočástic (100ul/ml), jak je patrné z grafu č. 13. U buněčné linie HaCaT ani nejvyšší použitá koncentrace nanočástic nezpůsobila pokles pod hranici cytotoxicity, znázorněno na grafu č. 14. Nejvíce se blížila hodnota 76 % z nejnižší koncentrace nanočástic typu F-R. Dalším zajímavým zjištěním je, že vyšší koncentrace nanočástic F-RF působily zřejmě pro buňky HaCaT stimulačně, jelikož dosahují vyšších hodnot MTS testu než kontrolní neopůsobené buňky.



Graf. č. 13: Metabolická aktivita buněk A431 po inkubaci s SiNP (typ F-R - pouze s Rho B, typ F-RF - s RhoB i FITC). Zelená čára značí 100 % (kontroly), červená čára 75 % (hranici životaschopnosti). Prezentované hodnoty jsou výsledkem tří nezávislých měření. Chybová úsečka představuje směrodatnou odchylku. Červená čára značí 100 % (kontroly). Signifikantnost změny oproti kontrole je znázorněna na úrovni  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

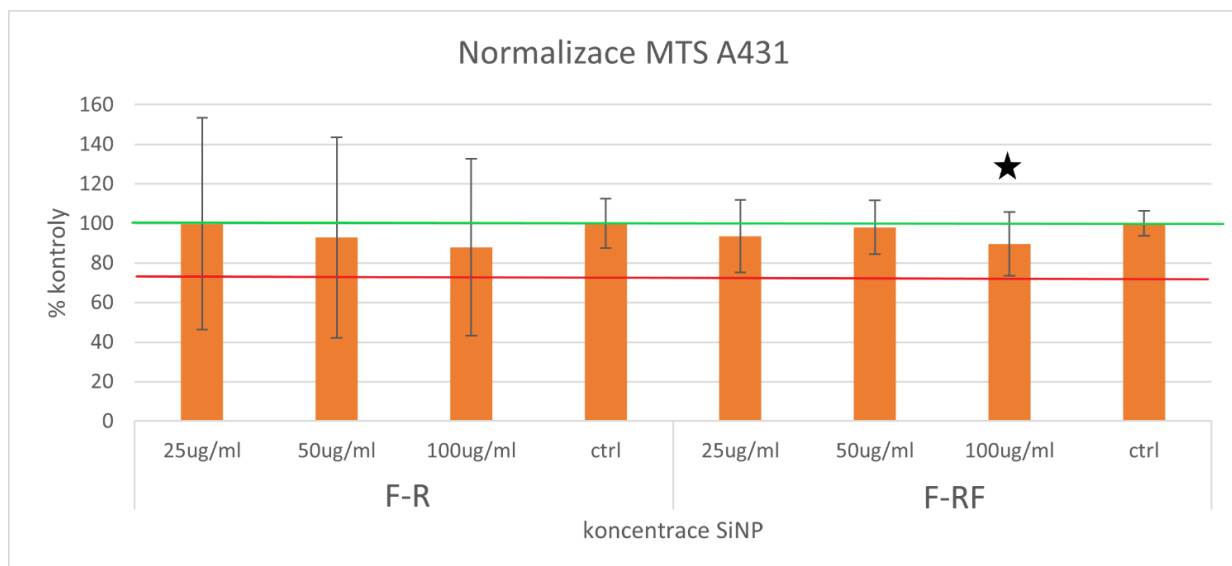


Graf. č. 14: Metabolická aktivita buněk HaCaT po inkubaci s SiNP (typ F-R - pouze s **Rho B**, typ F-RF - s **RhoB** i **FITC**). Zelená čára značí 100 % (kontroly), červená čára 75 % (hranici životaschopnosti). Prezentované hodnoty jsou výsledkem tří nezávislých měření. Chybová úsečka představuje směrodatnou odchylku. Signifikantnost změny oproti kontrole je znázorněna na úrovni  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

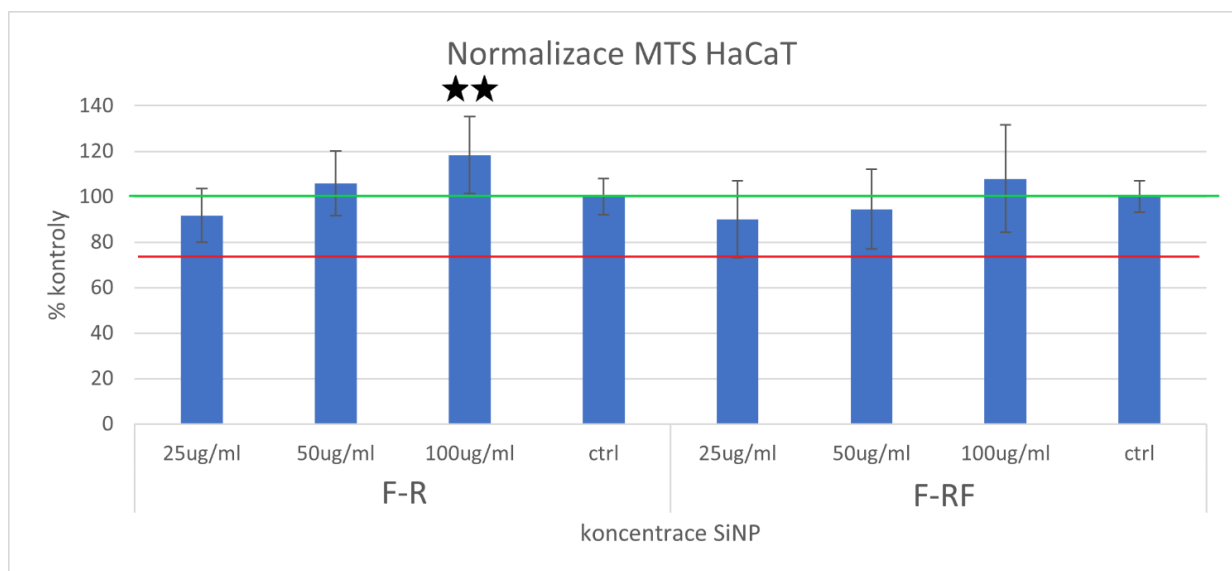
### 5.2.2 Proliferační test CyQuant

CyQuant proliferační test (CyQUANT Cell Proliferation Assays, Invitrogen) byl využit ke kvantifikaci buněk prostřednictvím vazby fluorescenční látky na buněčnou DNA. Celkové množství DNA by mělo být v přímé úměře s počtem buněk v populaci. Porovnávány byly buňky A431 a HaCaT inkubované s křemíkovými nanočásticemi oproti nanočásticemi neopůsobené kontrole, měření byl provedeno ihned po MTS testu.

Hodnoty absorbance získané z MTS testu jsou výsledkem metabolické aktivity celé populace, normalizací hodnot na výsledky fluorescence z jader byly získány hodnoty metabolické aktivity jednotlivých buněk (graf č. 15 a č. 16). I přes nejvyšší koncentraci přidávaných nanočástic nebyl pozorován cytotoxický efekt u buněk A431, ani u buněk HaCaT. V případě buněk HaCaT působily koncentrace 50  $\mu\text{g/ml}$  a 100  $\mu\text{g/ml}$  nanočástic typu F-R stimulačně, jelikož životaschopnost buněk přesáhla hranici 100 % kontroly. Taktéž tomu bylo u nanočástic typu F-RF v nejvyšší koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  u totožných buněk.



Graf. č. 15: Normalizovaná metabolická aktivita buněk A431 po inkubaci s SiNP (typ F-R - pouze s **Rho B**, typ F-RF - s **RhoB** i **FITC**). Zelená čára značí 100 % (kontroly), červená čára 75 % (hranici životaschopnosti). Prezentované hodnoty jsou výsledkem tří nezávislých měření. Chybová úsečka představuje směrodatnou odchylku. Signifikantnost změny oproti kontrole je znázorněna na úrovni  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).



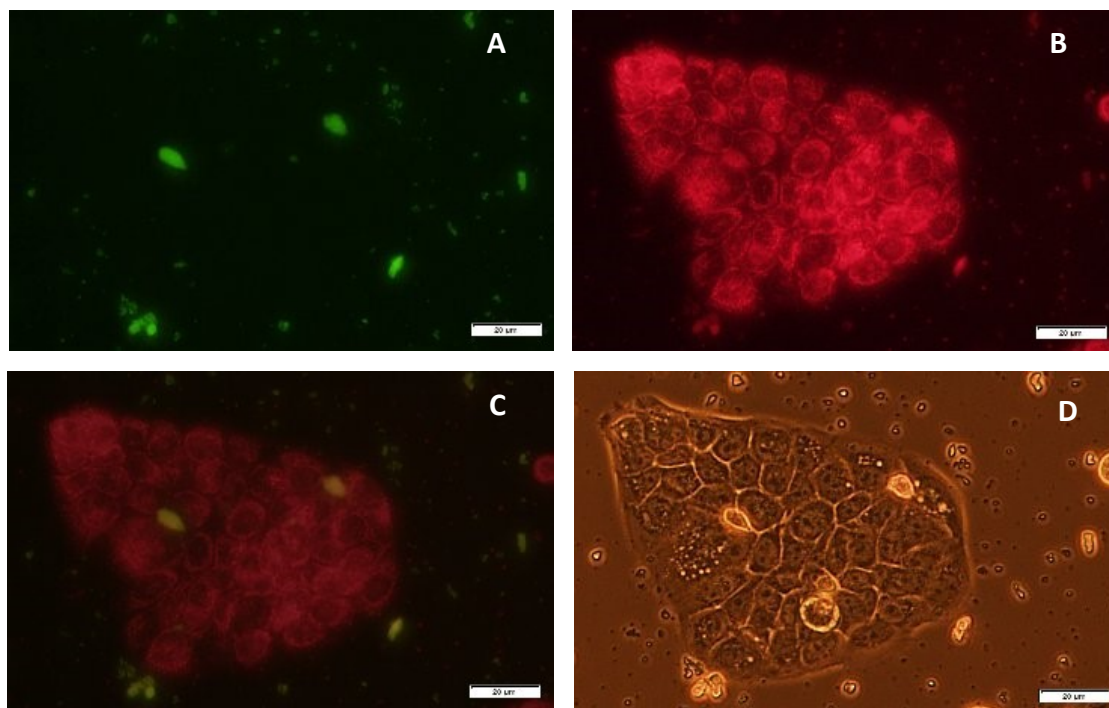
Graf. č. 16: Normalizovaná metabolická aktivita buněk HaCaT po inkubaci s SiNP (typ F-R - pouze s **Rho B**, typ F-RF - s **RhoB** i **FITC**). Zelená čára značí 100 % (kontroly), červená čára 75 % (hranici životaschopnosti). Prezentované hodnoty jsou výsledkem tří nezávislých měření. Chybová úsečka představuje směrodatnou odchylku. Signifikantnost změny oproti kontrole je znázorněna na úrovni  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

### 5.3 Vizualizace SiNP pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus

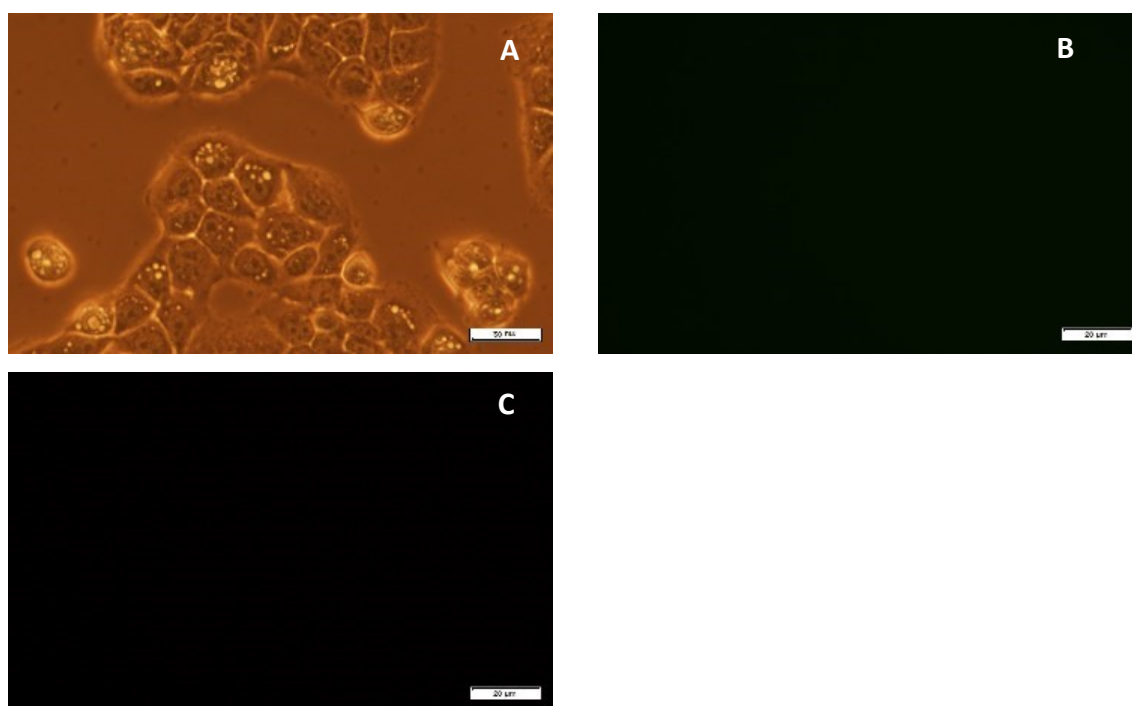
Výsledky cytotoxických testů potvrdily, že nanočástice významně neovlivňují životaschopnost buněk. Poté bylo možné přistoupit k další části jejich charakterizace. Pomocí fluorescenčního mikroskopie byla sledována lokalizace a fluorescence nanočástic. Každý vzorek nově vyvinutých nanočástic byl tedy po úspěšných testech cytotoxicity přidán k živým buňkám a sledován nejdříve pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus. Tímto způsobem bylo testováno všech 6 šarží vzorků nanočástic dodaných od listopadu 2018 až do června 2020, jak bylo popsáno v Tabulce č. 2 v sekci Materiály a metody.

Dodávané nanočástice byly syntetizovány tak, aby každá nanočástice obsahovala jak červeně zářící Rho B i zeleně zářící FITC, výjimky jsou zmíněny v textu. Experimenty zahrnovaly buněčné linie A431, HaCaT nebo NHDF (nasazeny v koncentraci 10 000 buněk/cm<sup>2</sup>), které byly inkubovány s nanočásticemi v koncentracích 25, 50, 100 µg/ml po dobu 15 min. Přidávané nanočástice byly ředěny do DMEM média s 5 % FBS z důvodu eliminovat možné interakce nanočástic s proteiny obsaženými v séru, zároveň bylo cílem udržet buňky v podobných kultivačních podmínkách.

Byly testovány nanočástice z šarže A, obdržené v listopadu 2018. Na obrázku č. 17 jsou znázorněny živé buňky HaCaT s SiNP v koncentraci 25 µg/ml. Na snímku A jsou patrné zeleně zářící shluky FITC navázaného na nanočásticích, na snímku B lze detekovat červený signál v oblasti cytoplazmy buněk, snímek C je složen obrázkem z těchto dvou kanálů. Ze složeného snímku C lze usuzovat, že Rho B se oddělil od nanočástice a vnikl do buněk, nanočástice s navázaným FITC zůstaly v médiu, kde tvoří shluky. Aglomeráty nanočástic lze pozorovat i na snímku D z průchozího světla. Na obrázku č. 18 je snímek kontrolní jamky s buňkami HaCaT neopůsobenými nanočásticemi. Fluorescence neopůsobených buněk není pozorována.

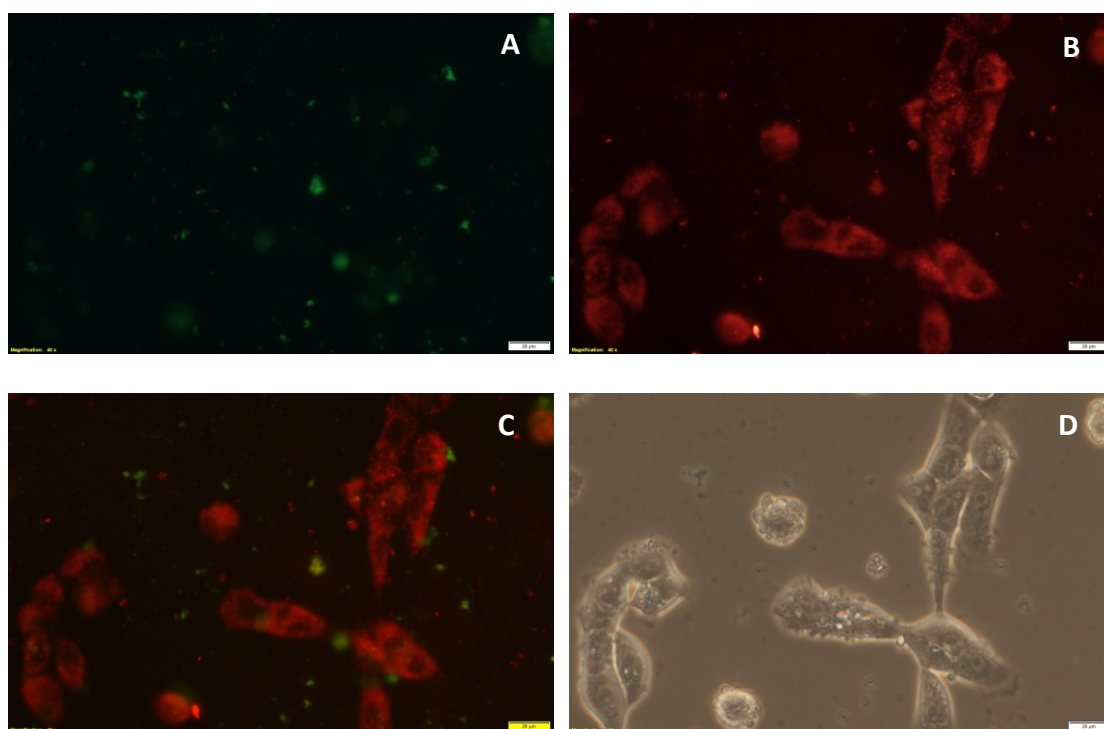


Obr. č. 17: Detekce SiNP v koncentraci 25 µg/ml ředěných do 5% FBS (první dodané 8.11.2018) v živých buňkách linie HaCaT. Foceno objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: složení snímku A a B, snímek D: buňky v průchozím světle. Expoziční čas pro průchozí světlo (bright field BR) - 31ms, pro kanál 3 (snímání fluorescence FITC) – 200ms, pro kanál 5 (snímání fluorescence Rho B) - 25 ms.

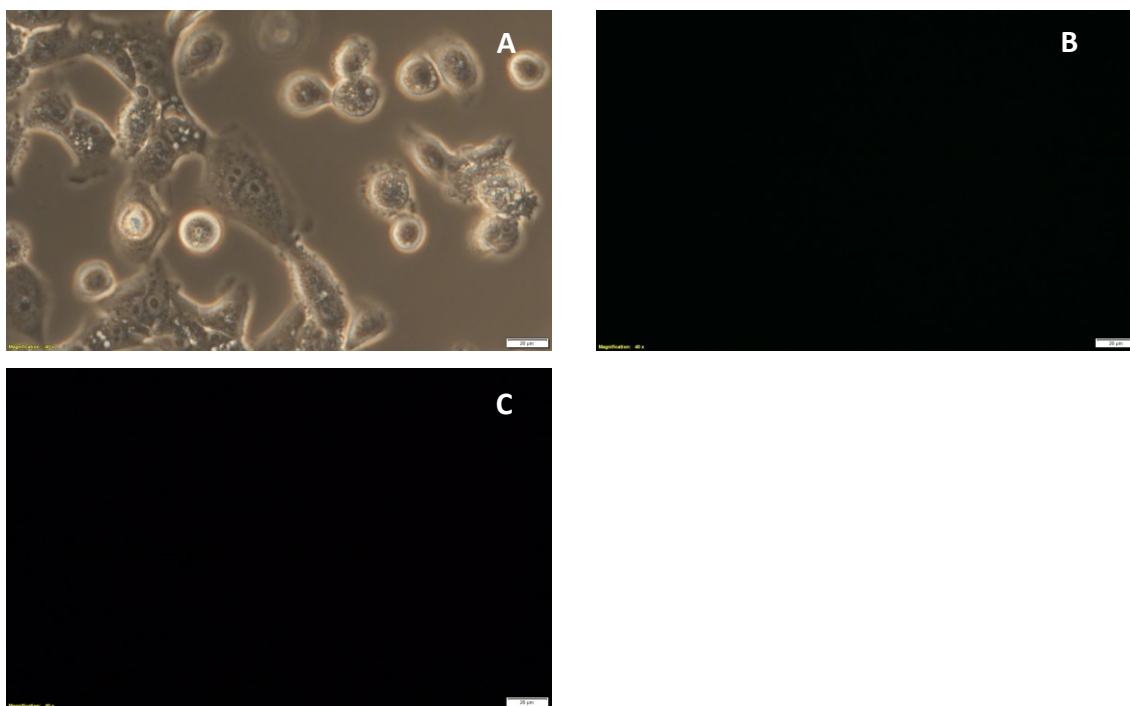


Obr. č. 18: Snímky NP neopůsobené kontroly - živých buněk HaCaT v 5 % FBS. Snímek A: buňky v průchozím světle, snímek B: fluorescence FITC, snímek C: fluorescence Rhodaminu B. Foceno objektivem 40x. Expoziční čas pro průchozí světlo (bright field BR) - 31ms, pro kanál 3 (snímání fluorescence FITC) – 200ms, pro kanál 5 (snímání fluorescence Rho B) - 25 ms.

V březnu 2019 byl dodán nový vzorek nanočástic - šarže B. Na obrázku č. 19 jsou znázorněny živé buňky A431 s SiNP v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ , které byly ředěny do média zcela bez séra. Sérum obsažené v médiu mohlo nanočástice shlukovat se sérovými proteiny a tím je vychytávat mimo buňku. Na snímku A je možné pozorovat zeleně zářící shluky FITC navázaného na nanočásticích, na snímku B lze detekovat červený signál v oblasti cytoplazmy buněk, snímek C je složen obrázek z těchto dvou kanálů. Ze složeného snímku C lze usuzovat, že Rho B je zřejmě opět v buňce nezávisle na nanočástici. Nanočástice s navázaným FITC zůstaly v médiu, kde tvoří shluky, nepřítomnost séra nepodpořila vnik nanočástic do buňky, ani nezamezil shlukování nanočástic. Na snímku D zobrazující živé buňky v průchozím světle lze pozorovat apoptotická tělíska tvořící se na membráně buněk, zřejmě z důvodu nevyhovujících bezsérových podmínek. Na obrázku č. 20 je snímek kontrolní jamky s buňkami A431 neopůsobenými nanočásticemi. Fluorescence neopůsobených buněk není pozorována.

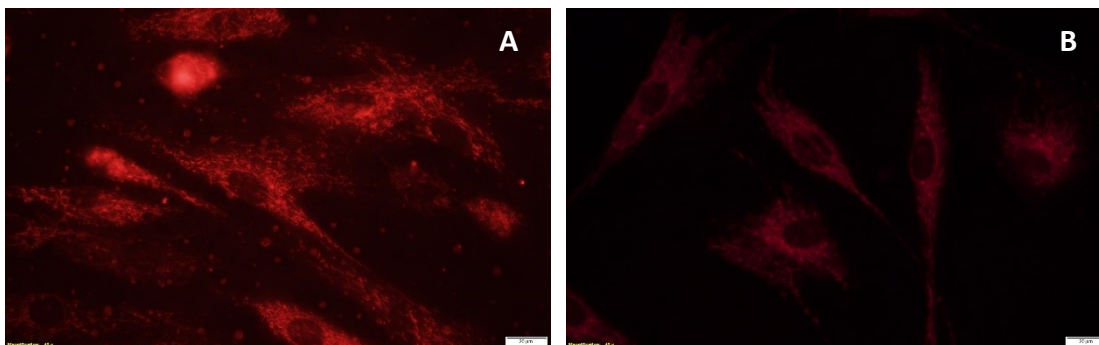


Obr. č. 19: Detekce SiNP v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  ředěných do samotného média DMEM (šarže B) v živých buňkách linie A431. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: složení snímku A a B, snímek D: buňky v průchozím světle. Foceno objektivem 40x. Expoziční čas pro kanál 3 (snímání fluorescence FITC) – 200ms, pro kanál 5 (snímání fluorescence Rho B) - 25 ms pro průchozí světlo (bright field BR) - 31ms.



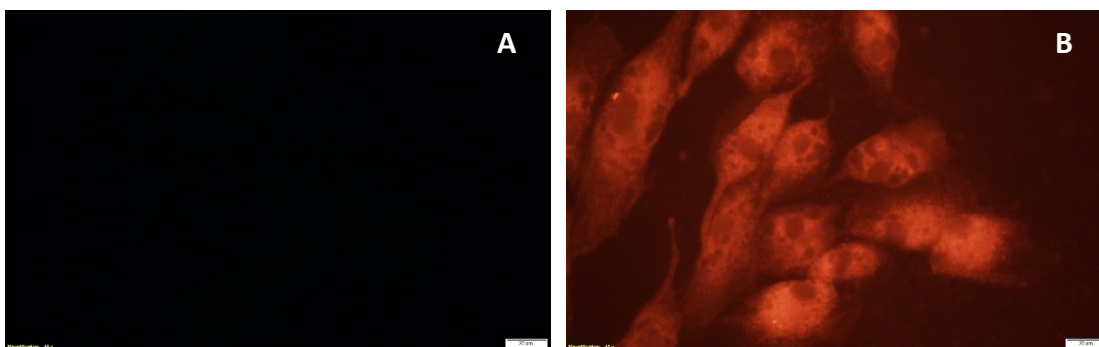
Obr. č. 20: Snímky NP neopůsobené kontroly - živých buněk A431 v DMEM médiu. Snímek A: buňky v průchozím světle, snímek B: fluorescence FITC, snímek C: fluorescence Rhodaminu B. Foceno objektivem 40x.. Expoziční čas pro průchozí světlo (bright field BR) - 31ms, pro kanál 3 (snímání fluorescence FITC) – 200ms, pro kanál 5 (snímání fluorescence Rho B) - 25 ms.

Byly připraveny a dodány nové nanočástice (šarže C) 9.10.2019. Z důvodu předchozího oddělení Rho B do cytoplasmy, byl snímek s nanočásticemi porovnán se snímek větších buněk NHDF s obarvenými mitochondriemi MitoTracker RED. Obrázek č. 21 tedy zobrazuje živé buňky NHDF, snímek A je z kanálu snímající pouze Rho B (z nanočástic šarže C – koncentrace 100  $\mu\text{g/ml}$ ) v porovnání se snímek B, kde jsou znázorněny pouze barvené mitochondrie MitoTracker RED. Lze usuzovat na lokalizaci Rho B v mitochondriích.



Obr. č. 21: Na snímku A je zobrazen pouze červený Rho B oddělený od nanočástic šarže C uvnitř živých buněk NHDF. Pro porovnání na snímku B jsou vyfoceny živé mitochondrie buněk NHDF barvené MitoTracker RED. Foceno objektivem 40x. Expoziční čas pro kanál 5 (snímání fluorescence Rho B) - 100 ms. Bílá úsečka vpravo dole znázorňuje rozměr 20 µm.

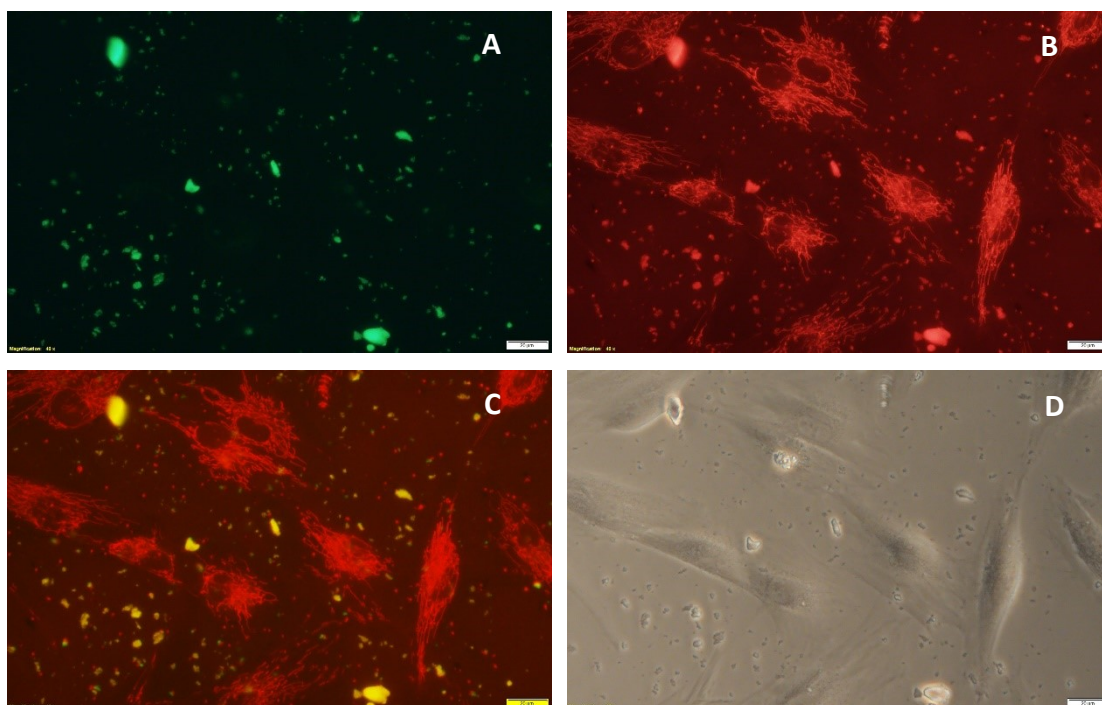
Obrázek č. 22 znázorňuje kontrolní jamku s buňkami linie NHDF, ke kterým byl přidán supernatant odebraný po centrifugaci nanočástic šarže C (obdrženy v říjnu 2019). Na snímku A nedetekujeme žádný zelený signál z FITC. Na snímku B je detekován červený signál uvnitř buněk. Rho B se zřejmě oddělil do supernatantu z nanočástic, které zůstaly v peletu na dně centrifugační zkumavky. Lze předpokládat, že zdodaných nanočástic dochází k uvolnění Rho B a tudíž není možné jeho signálem lokalizovat nanočástici v buňce.



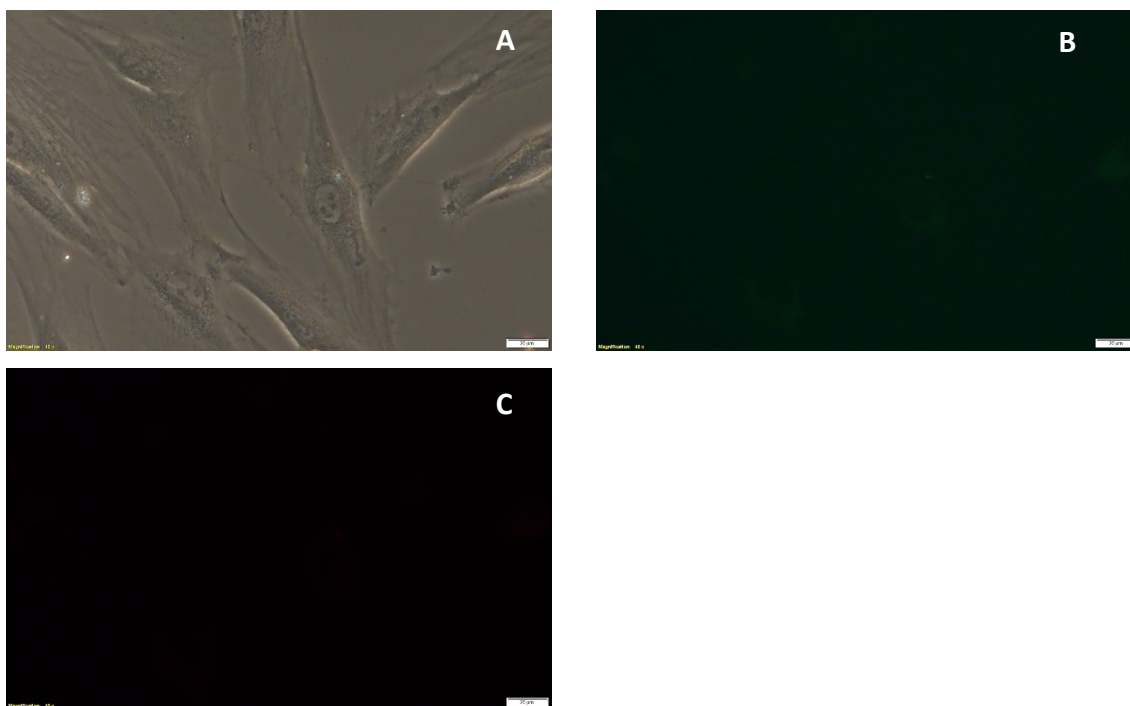
Obr. č. 22: Snímky kontroly – živých buněk NHDF po přidání supernatantu odebraného z roztoku nanočástic po jejich centrifugaci (dodané 9.10.2019). Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B. Foceno objektivem 40x. Expoziční čas pro kanál 3 (snímání fluorescence FITC) – 100ms, pro kanál 5 (snímání fluorescence Rho B) - 100 ms. Bílá úsečka vpravo dole znázorňuje rozměr 20 µm.

Kvůli nedostatku šarže C byly nasyntetizovány a dodány nové nanočástice (šarže D) v prosinci 2019. Na obrázku č. 23 jsou zobrazeny buňky linie NHDF s nově dodanými nanočásticemi v koncentraci 100 µg/ml. Na snímku A lze pozorovat shluky zeleně zářícího FITC navázaného na nanočástici. Na snímku B lze pozorovat červený signál mimo, ale zejména uvnitř buněk. Rozptření červeného signálu uvnitř buňky

připomíná mitochondriální struktury. Složení těchto dvou kanálů je znázorněno na snímku C. Složený snímek C dokazuje shodný problém jako u nanočástic z podzimu 2019 (šarže C). Červený signál Rho B se nepřekrývá se zeleným, tudíž na nanočástici nejsou přítomné oba fluorofory. Rho B se oddělil od nanočástice a vnikl do buněk, pravděpodobně do mitochondrií. Nanočástice s navázaným FITC zůstaly v médiu, kde tvoří shluky. Z obrázku nelze usuzovat na lokalizaci nanočástice uvnitř buňky. Aglomeráty nanočástic lze taktéž pozorovat vpravo dole na obrázku z průchozího světla. Na obrázku č. 24 je snímek kontrolní jamky s buňkami NHDF neopůsobenými nanočásticemi. Fluorescence neopůsobených buněk není pozorována.

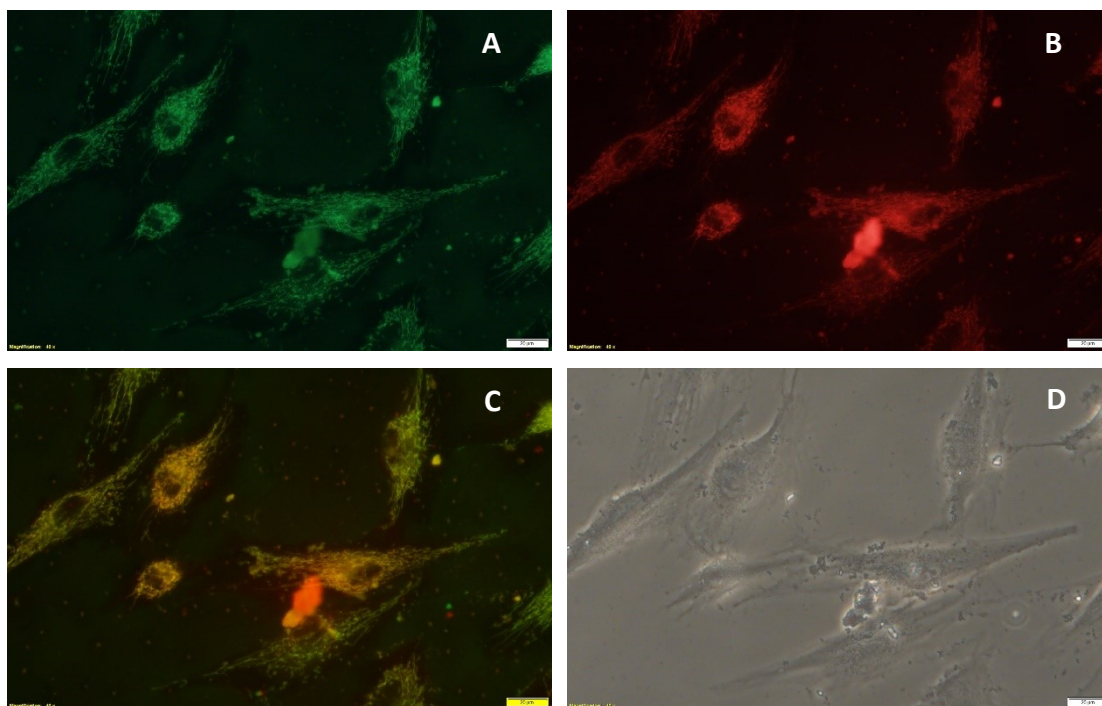


Obr. č. 23: Detekce SiNP v koncentraci 100 µg/ml ředěných do 5 % FBS (dodaných 12.12.2019) v živých buňkách linie NHDF. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B, snímek C: složení snímku A a B, snímek D: buňky v průchozím světle. Foceno objektivem 40x. Expoziční čas pro průchozí světlo (bright field BR) - 115ms, pro kanál 3 (snímání fluorescence FITC) – 200ms, pro kanál 5 (snímání fluorescence Rho B) - 100 ms. Bílá úsečka vpravo dole znázorňuje rozměr 20 µm.

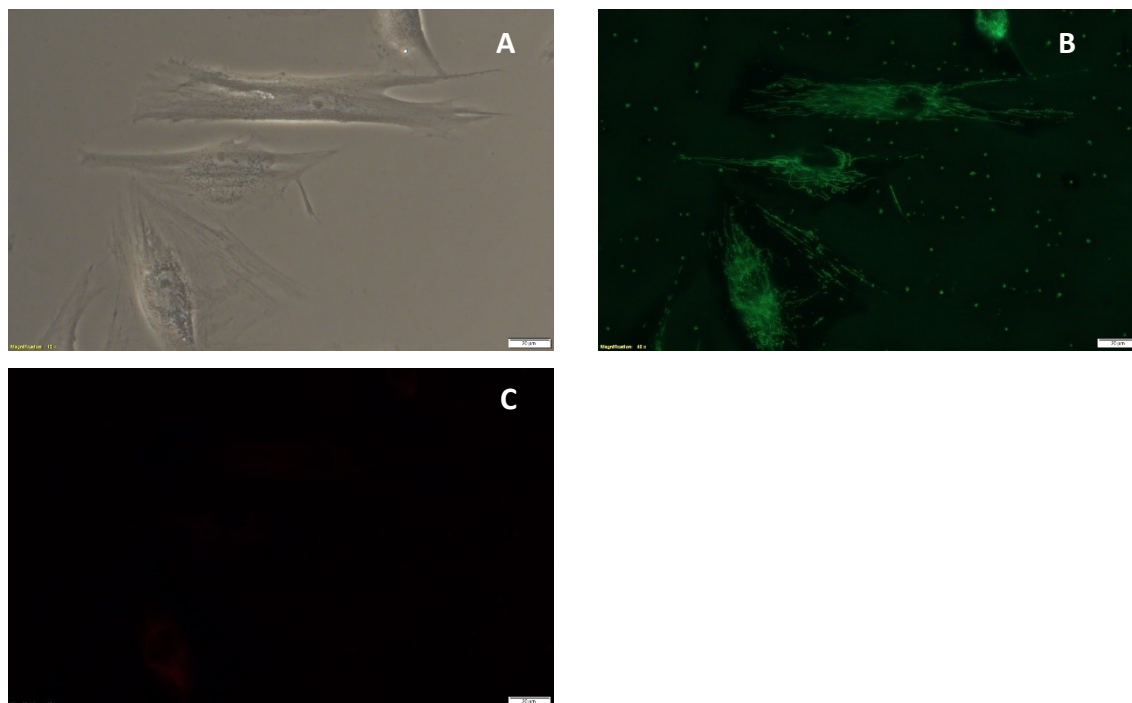


Obr. č. 24: Snímky NP neopůsobené kontroly - živých buněk NHDF v 5 % FBS. Snímek A: buňky v průchozím světle, snímek B: fluorescence FITC, snímek C: fluorescence Rhodaminu B. Foceno objektivem 40x. Expoziční čas pro průchozí světlo (bright field BR) - 115ms, pro kanál 3 (snímání fluorescence FITC) – 200ms, pro kanál 5 (snímání fluorescence Rho B) - 100 ms. Bílá úsečka vpravo dole znázorňuje rozměr 20  $\mu\text{m}$ .

Z důvodu možné lokalizace Rho B v mitochondriích, bylo nutné vizualizovat buněčné mitochondrie MitoTrackerem Green, jež měl potvrdit nebo vyvrátit toto tvrzení. Obrázek č. 25 zobrazuje buňky linie NHDF barvené MitoTrackerem Green a inkubované s nanočásticemi z šarže B v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  (obdrženy v březnu 2019). Na snímku A jsou zeleně obarvené mitochondrie, mimo buňku jsou patrné shluky zeleně zářícího FITC navázaného na nanočástici. Na snímku B je detekován červený signál koncentrovaný uvnitř buněk, rozprostření signálu se velmi podobá obrázku s barvenými mitochondriemi. Složený obrázek C z těchto dvou kanálů potvrzuje lokalizaci Rho B uvnitř mitochondrií nezávisle na nanočástici s FITC. Větší aglomeráty nanočástic s navázaným FITC zůstaly v médiu, kde tvoří shluky. Aglomeráty nanočástic lze taktéž pozorovat na snímku D z průchozího světla. Na obrázku č. 26 je snímek kontrolní jamky s buňkami NHDF barvenými MitoTrackerem Green neopůsobenými nanočásticemi. Lze pozorovat zeleně barvené mitochondrie.

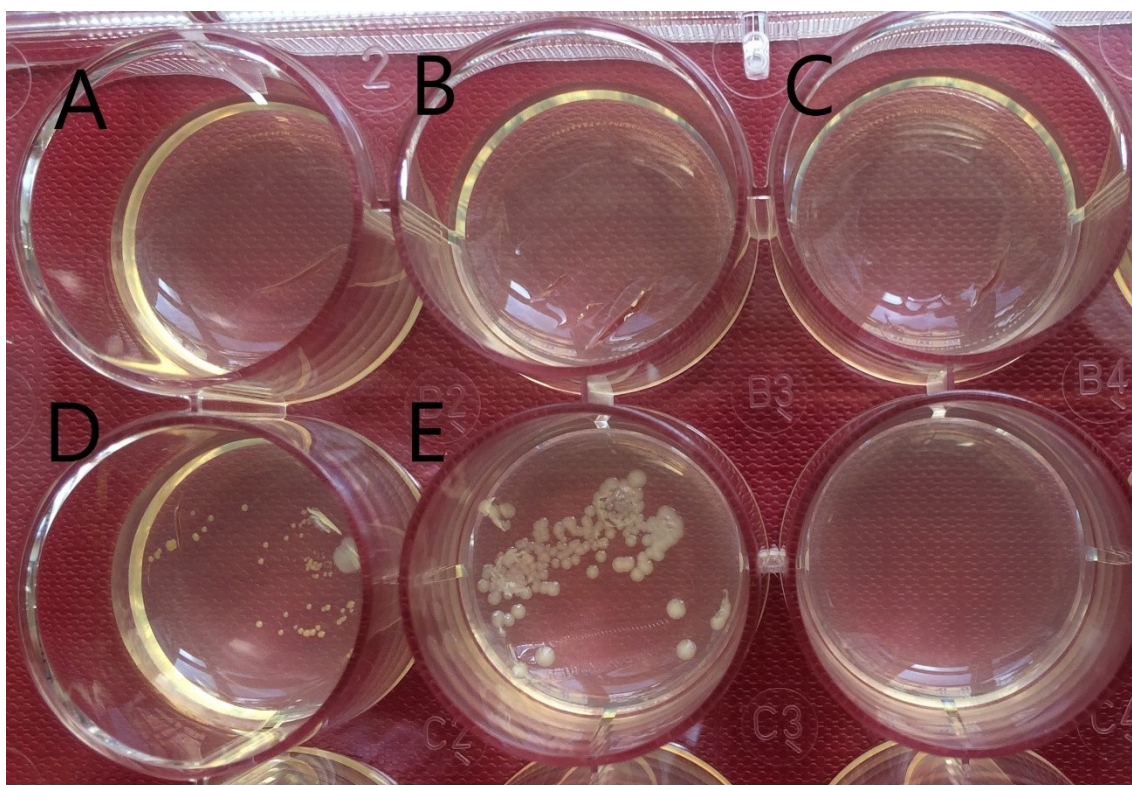


Obr. č. 25: Detekce SiNP v koncentraci 100 µg/ml ředěných do 5 % FBS (dodaných 12.12.2019) v buňkách linie NHDF po fixaci. Kolokalizace s mitochondriemi barvenými MitoTrackerem Green. Foceno objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence MitoTracker Green značených mitochondrií, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B, snímek C: složení snímku A a B, snímek D: buňky v průchozím světle. Expoziční čas pro průchozí světlo (bright field BR) - 115ms, pro kanál 3 (snímání fluorescence MitoTracker Green) - 200ms, pro kanál 5 (snímání fluorescence Rho B) - 100 ms. Bílá úsečka vpravo dole znázorňuje rozměr 20 µm.



Obr. č. 26: Snímky kontroly - fixovaných buněk NHDF v 5 % FBS s obarvenými mitochondriemi MitoTrackerem Green. Snímek A: buňky v průchozím světle, snímek B: fluorescence MitoTracker Green značených mitochondrií, snímek C: fluorescence Rhodaminu B. Foceno objektivem 40x. Expoziční čas pro průchozí světlo (bright field BR) - 115ms, pro kanál 3 (snímání fluorescence MitoTracker Green) - 200ms, pro kanál 5 (snímání fluorescence Rho B) - 100 ms. Bílá úsečka vpravo dole znázorňuje rozměr 20 µm.

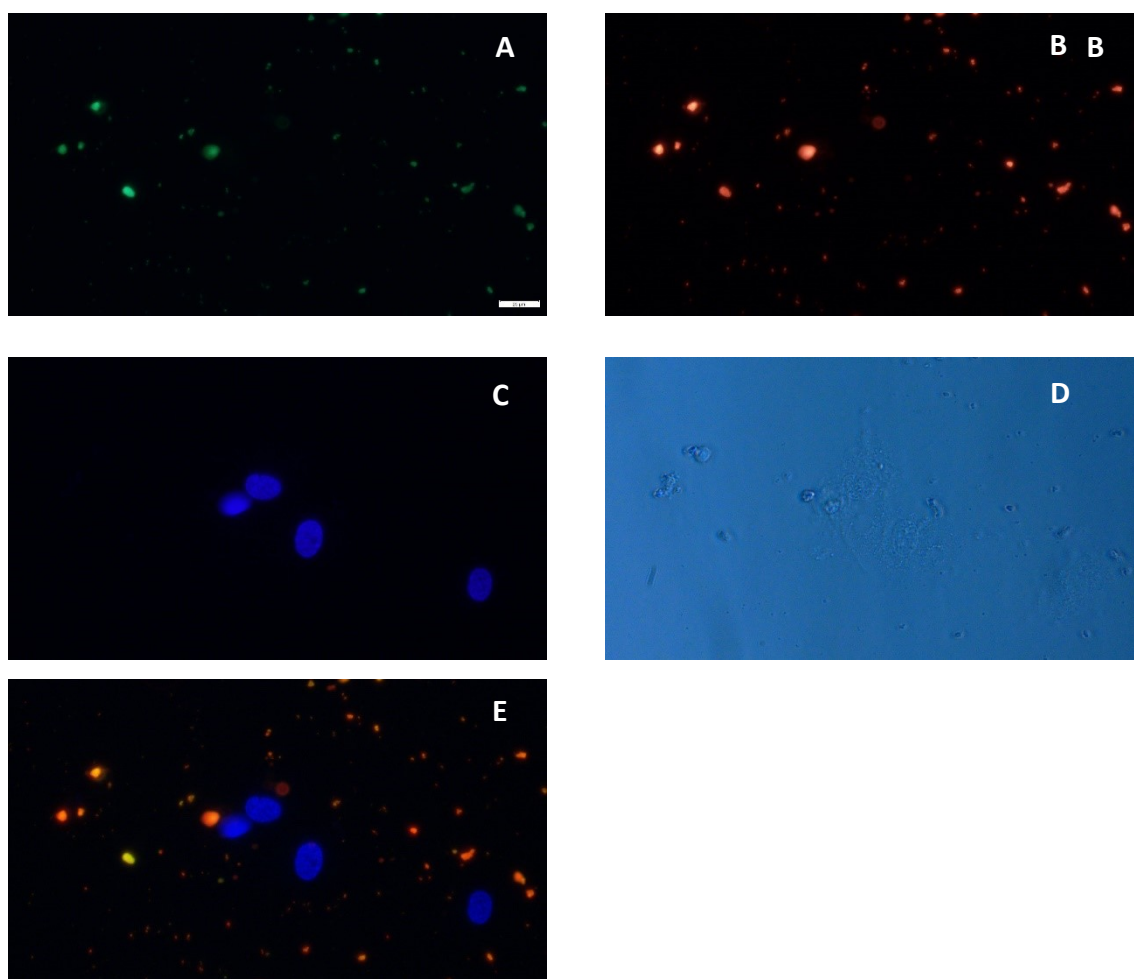
V květnu 2020 byl opět připraven a dodán nový vzorek nanočástic - šarže E. Tento i předchozí vzorky byly dodávány v destilované vodě. Z obavy o sterilitu vzorku byl proveden test možné kontaminace. Výsledek agarového testu potvrzuje kontaminaci vzorku a je zobrazen na obrázku č. 27. Bylo tedy nutné připravit nový vzorek nanočástic, který byl dodán v červnu 2020 (šarže F - typ F-RF s RhoB i s FITC v metanolu a MilliQ, typ F-R pouze s RhoB v MilliQ) agarový test na možnou kontaminaci byl negativní (obrázek č. 27). Změnou rozpouštědla (z MilliQ na metanol) byl tedy splněn požadavek na čistotu dodávaných vzorků, jež se dlouhou dobu nedařilo zajistit.



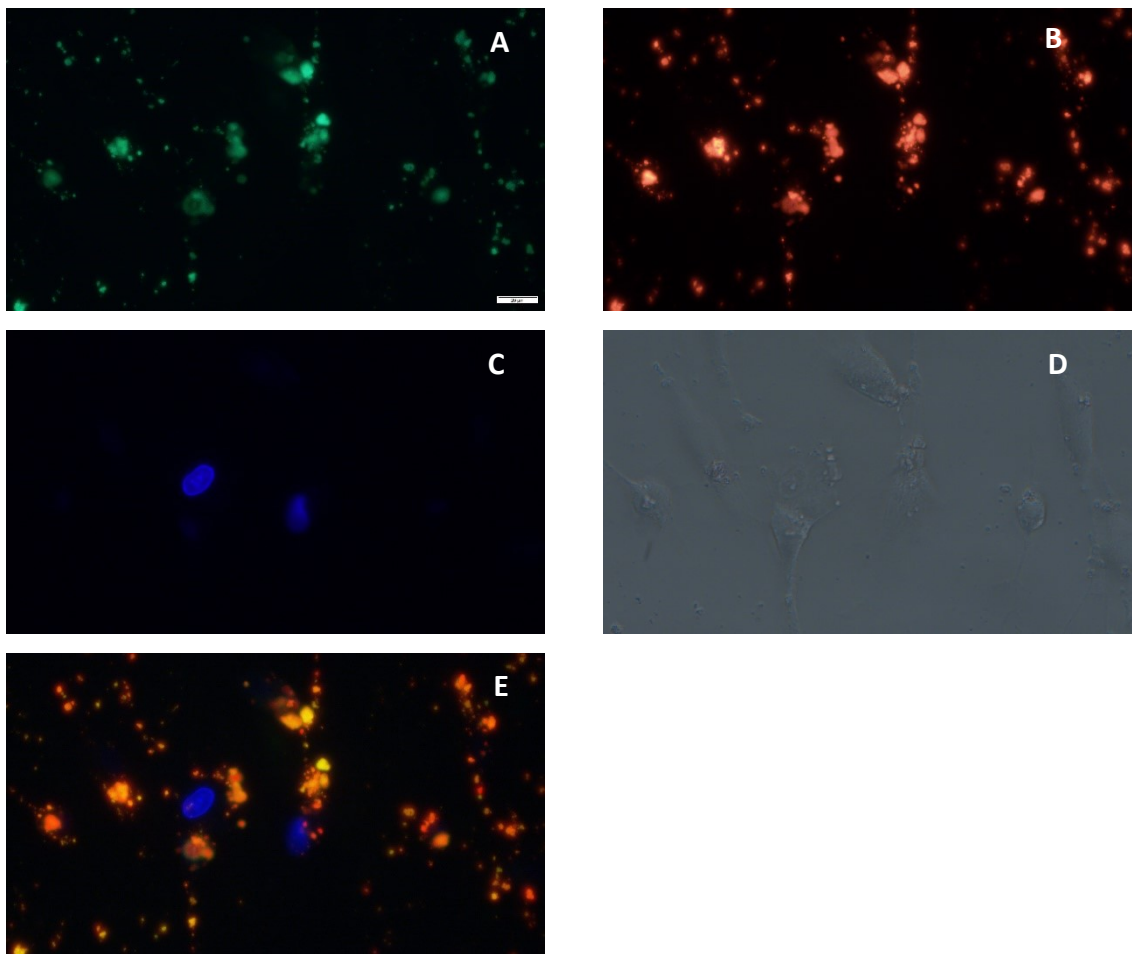
Obr. č. 27: A) F-RF v metanolu B) F-RF v MilliQ C) F-R v MilliQ šarže F dodaná 16.6.2020 D) E1 E) E2 šarže E dodaná 4.5.2020

Na obrázcích č. 28, 29 a 30 jsou zobrazeny živé buňky linie NHDF. Byly k nim přidány nanočástice typu F-RF v methanolu v koncentracích 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  (obdrženy v červnu 2020). Na snímku A je pozorovatelný signál zeleně zářícího FITC navázaného na nanočástici. Na snímku B lze pozorovat červený signál Rho B, taktéž navázaného na nanočástici. Na snímku C jsou patrná jádra barvená DAPI. Snímek D zobrazuje buňky v průchozím světle. Složený snímek E ze všech tří fluorescenčních kanálů je znázorněn

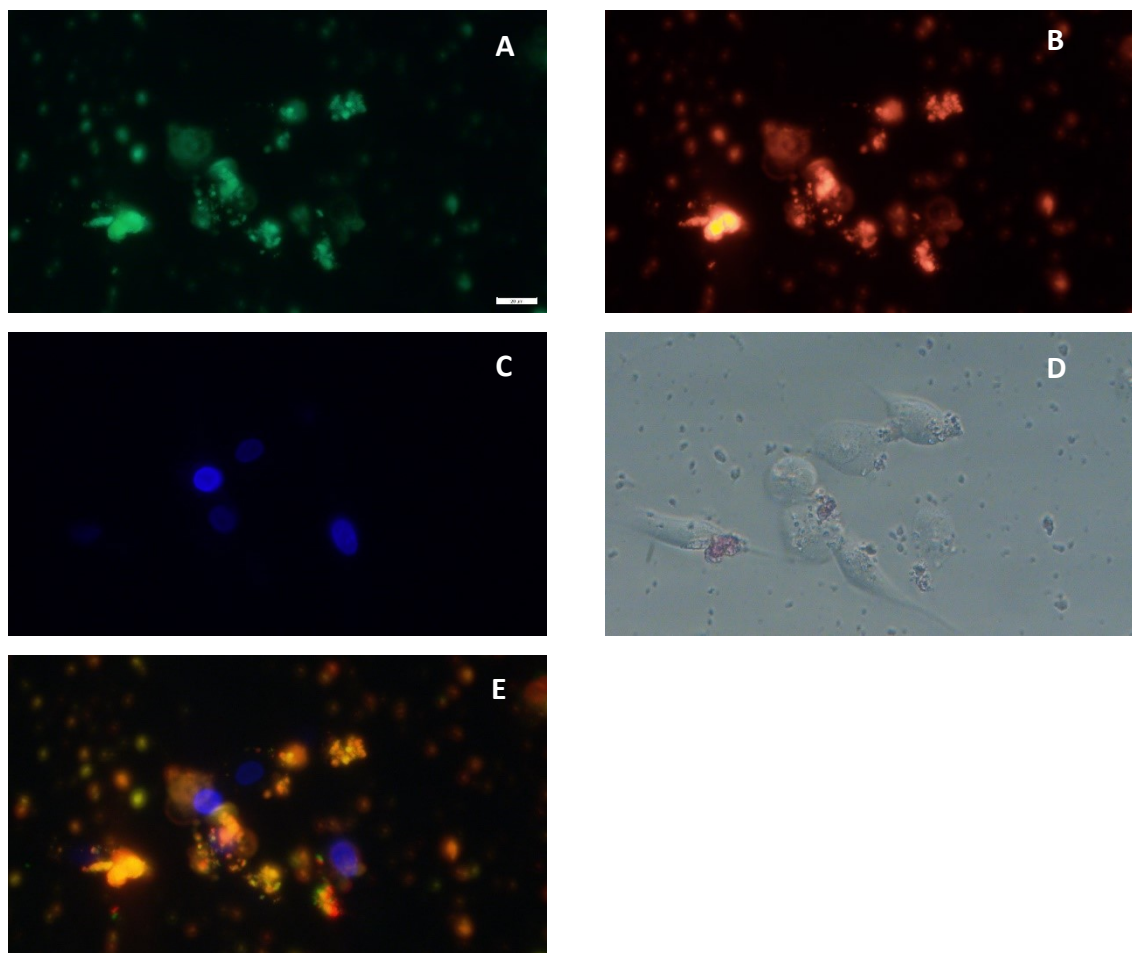
úplně vlevo dole. Na složeném snímku E lze potvrdit překryv červeného signálu z Rho B a zeleného signálu z FITC, oba fluorofory jsou detekovány na částici, výsledný signál je žlutý. Z pozorování buněk i z nasnímaných fotek je zřejmé, že vyšší koncentrace nanočástic podporovala kumulaci nanočástic na povrchu buněk. Vyšší koncentrace přidaných nanočástic stimuluje jejich shlukování na povrchu buněk, jež jsou patrné i na snímcích z průchozího světla (obr .č. 30).



Obr. č. 28.: Zobrazení živých buněk NHDF s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$ , objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: buňky focené v průchozím světle, snímek E: složení snímku A,B,C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20  $\mu\text{m}$ .



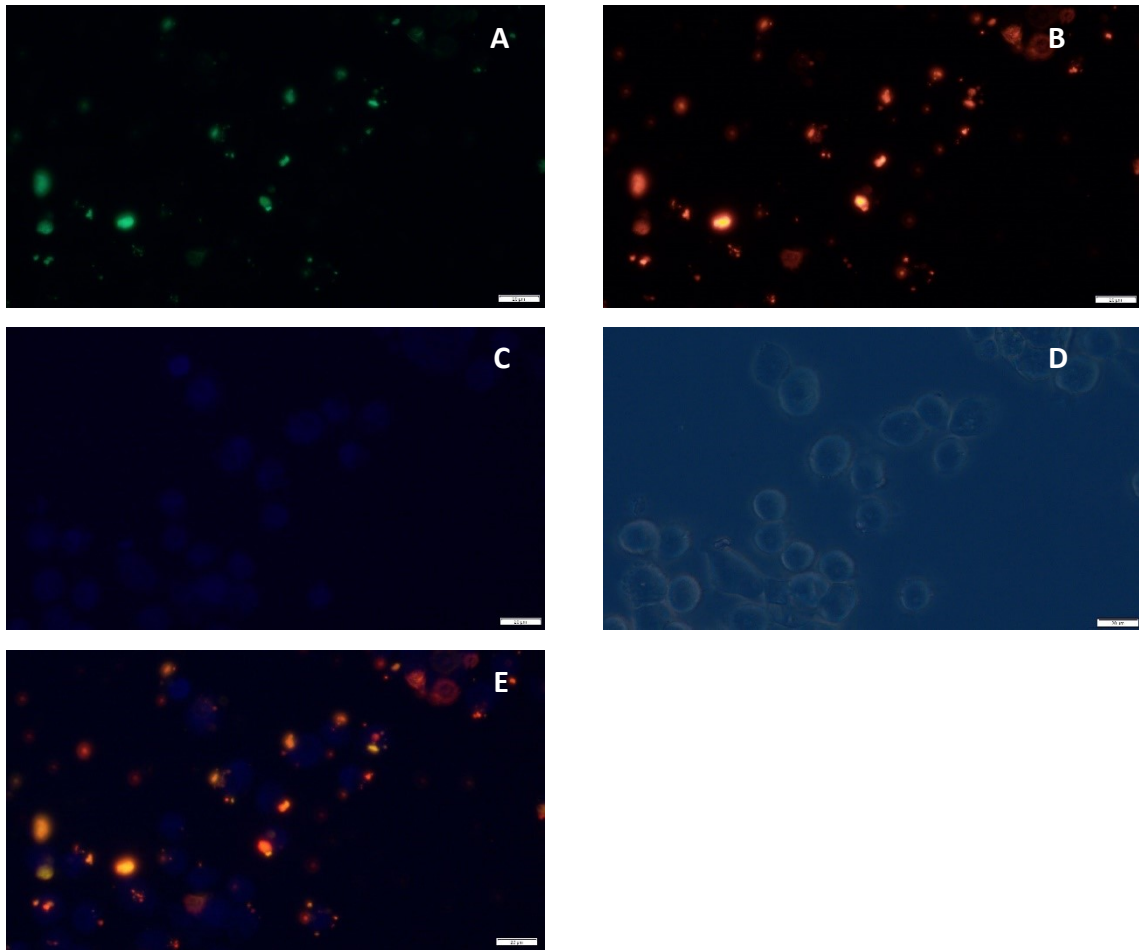
Obr. č. 29.: Zobrazení živých buněk NHDF s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ , objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: buňky focené v průchozím světle, snímek E: složení snímku A,B,C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20  $\mu\text{m}$ .



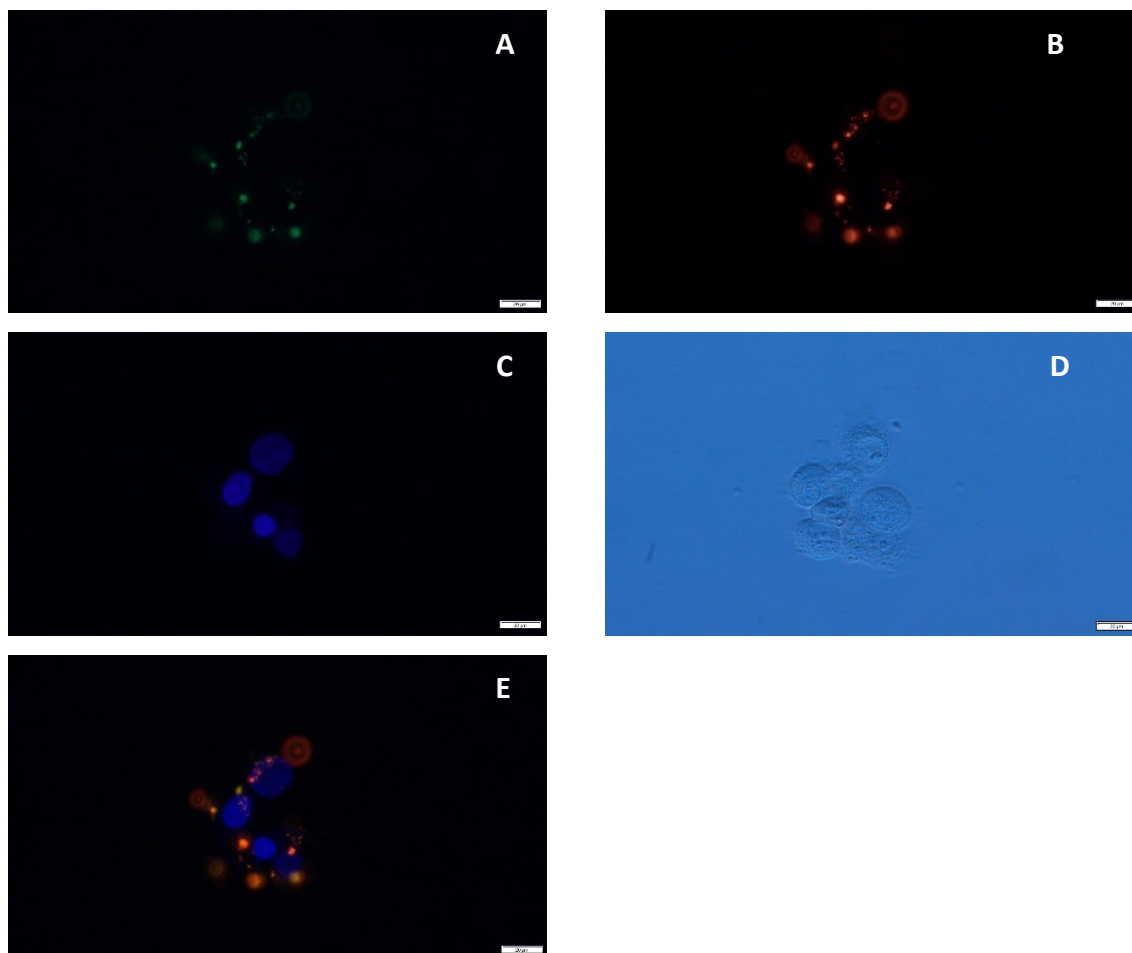
Obr. č. 30.: Zobrazení živých buněk NHDF s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ , objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: buňky focené v průchozím světle, snímek E: složení snímku A,B,C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20  $\mu\text{m}$ .

Na obrázcích č. 31, 32, 33 jsou zobrazeny živé buňky linie A431, které jsou v porovnání s NHDF znatelně menší. Byly přidány nanočástice typu F-RF v methanolu v koncentracích 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  (obdrženy v červnu 2020). Na snímku A je pozorovatelný signál zeleně zářícího FITC navázaného na nanočástici. Na snímku B lze pozorovat červený signál Rho B, taktéž navázaného na nanočástici. Na snímku C jsou patrná jádra barvená DAPI. Snímek D zobrazuje buňky v průchozím světle. Složený snímek E ze všech tří fluorescenčních kanálů je znázorněn úplně vlevo dole. Na složeném snímku E lze potvrdit překryv červeného signálu z Rho a zeleného signálu z FITC, oba fluorofory jsou detekovány na částici, výsledný signál je žlutý. Z pozorování i nasnímaných fotek lze usuzovat na hromadění nanočástic na povrchu buněk. Stále lze pozorovat tvorbu větších shluků nanočástic, jež jsou patrné i na snímcích z průchozího

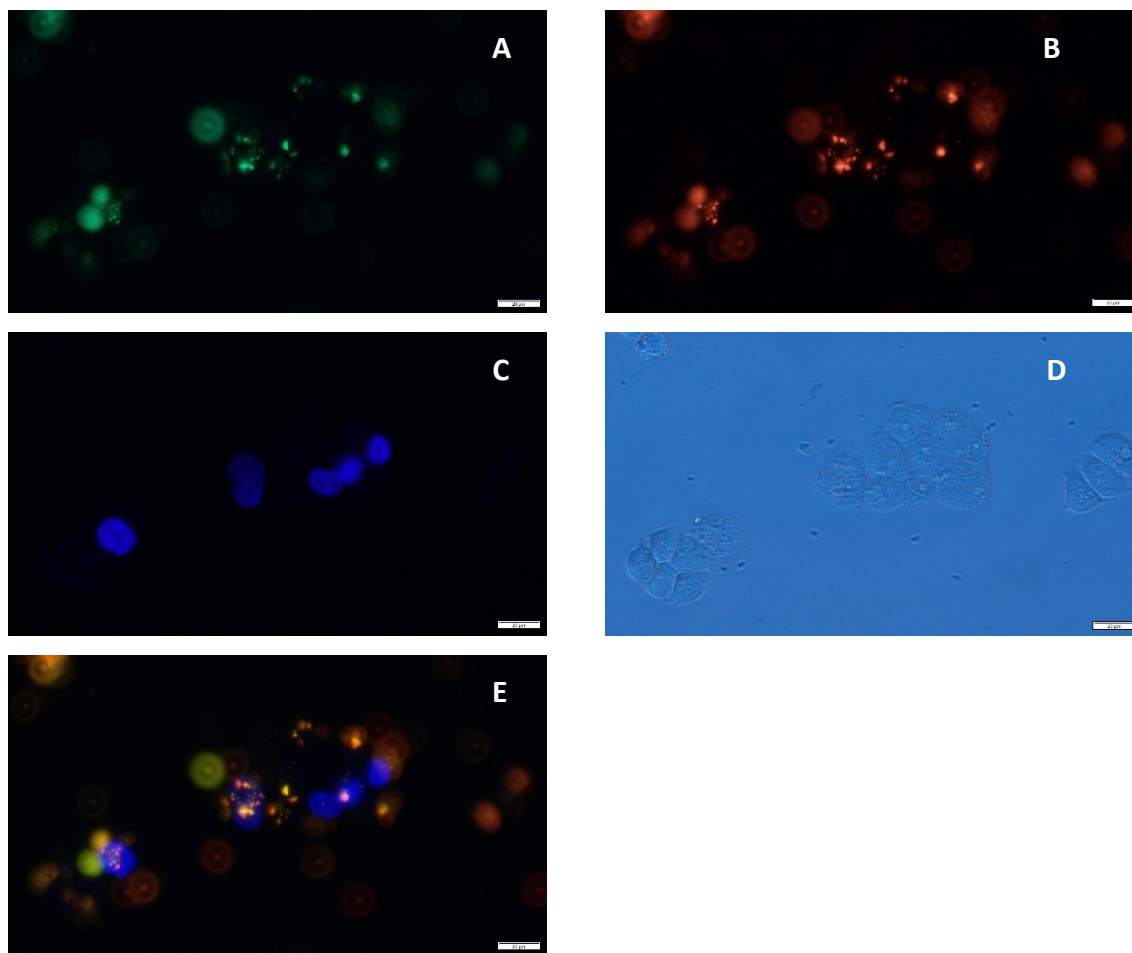
světla (obr. č. 33). Při použití nejvyšší koncentrace nanočástic typu F-RF je patrný výskyt nanočástic zejména na povrchu buněk (obr. č. 33).



Obr. č. 31: Zobrazení živých buněk A431 s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 25 µg/ml, objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: buňky focené v průchodím světle, snímek E: složení snímku A,B,C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20 µm.



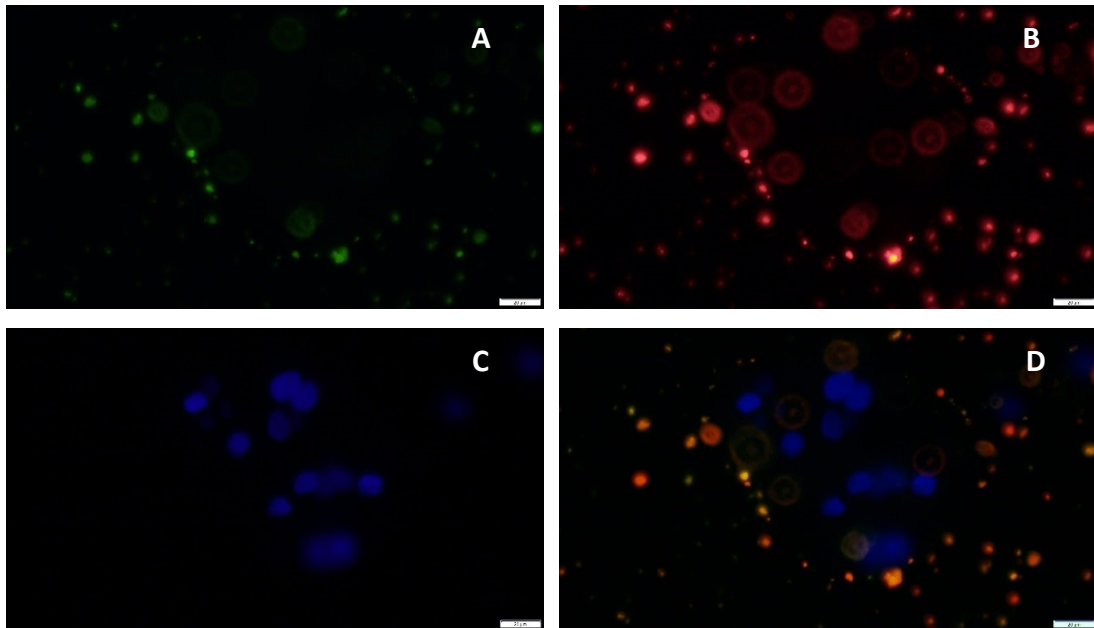
Obr. č. 32: Zobrazení živých buněk A431 s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 50 µg/ml, objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: buňky focené v průchozím světle, snímek E: složení snímku A,B,C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20 µm.



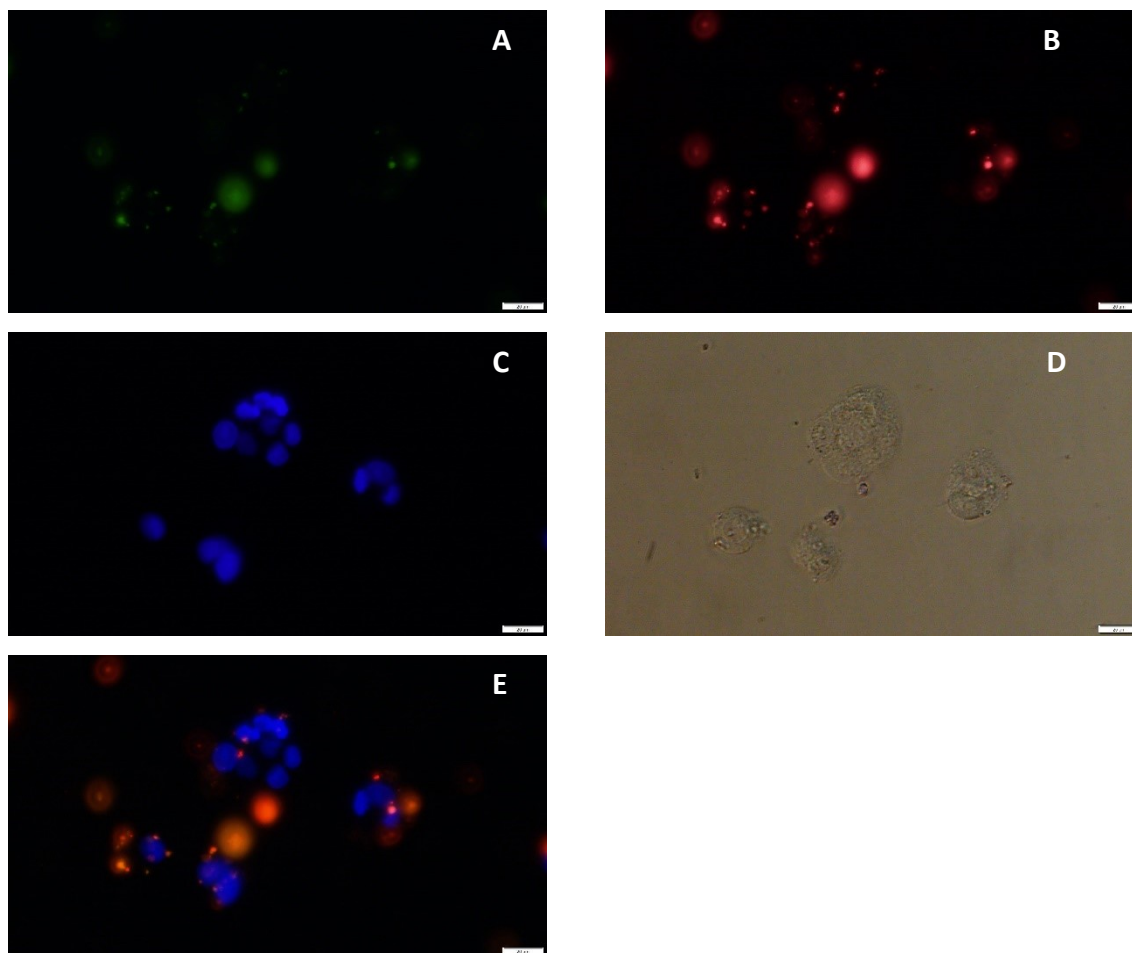
Obr. č. 33: Zobrazení živých buněk A431 s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100 µg/ml, objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: buňky focené v průchozím světle, snímek E: složení snímku A,B,C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20 µm.

Na obrázcích č. 34, 35, 36 jsou zobrazeny živé buňky linie HaCaT, srovnatelně velké s buňkami linie A431. K nim byly přidány nanočástice typu F-RF v methanolu v koncentracích 25, 50, 100 µg/ml (obdrženy v červnu 2020). Na snímku A je pozorovatelný signál zeleně zářícího FITC navázaného na nanočástici. Na snímku B lze pozorovat červený signál Rho B, taktéž navázaného na nanočástici. Na snímku C jsou patrná jádra barvená DAPI. Snímek D zobrazuje buňky v průchozím světle. Složený snímek E ze všech tří fluorescenčních kanálů je znázorněn úplně vlevo dole. Na složeném snímku E lze opět potvrdit překryv červeného signálu z Rho B a zeleného signálu z FITC, oba fluorofory jsou detekovány na částici, výsledný signál je žlutý. Z pozorování buněk i z nasnímaných fotek lze usuzovat na zvýšenou míru shlukování se mimo buňku i na

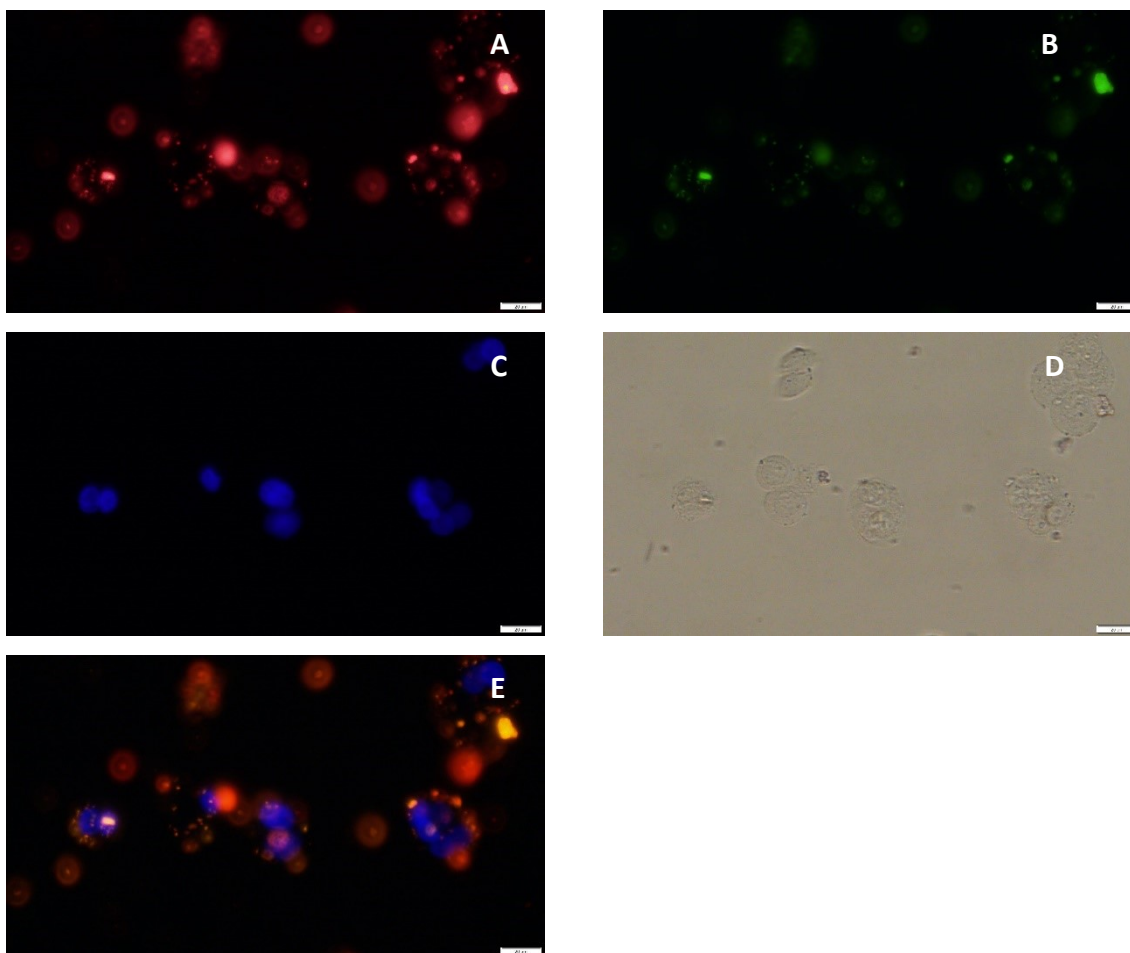
povrchu buňky. Vyšší koncentrace přidávaných nanočástic podporuje tvorbu větších shluků nanočástic, jež lze identifikovat jako rozostřené velké body.



Obr. č. 34: Zobrazení živých buněk HaCaT s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: buňky focené v průchozím světle, snímek E: složení snímku A,B,C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20  $\mu\text{m}$ .



Obr. č. 35: Zobrazení živých buněk HaCaT s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 50 µg/ml, objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: buňky focené v průchozím světle, snímek E: složení snímku A,B,C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20 µm.



Obr. č. 36: Zobrazení živých buněk HaCaT s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100 µg/ml, objektivem 40x. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: buňky focené v průchozím světle, snímek E: složení snímku A,B,C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20 µm.

Vizualizaci nanočástic fluorescenčním mikroskopem provázely problémy spojené s výrobou nových typů SiNP. Tabulka č. 10 shrnuje všechny dodané šarže nanočástic a jejich stručnou charakterizaci. Nejprve nebyla jejich lokalizace v buňce možná z důvodu odpojení lokalizačního fluoroforu Rho B z četných dodávek nanočástic. Dále při pozorování živých buněk po přidání nových nanočástic se fluorescenční body pohybovaly, což naznačovalo na přítomnost bakteriální kontaminace, která byla i ověřena pomocí kultivace na agaru, takže požadované vlastnosti (přítomnost obou fluoroforů a sterilita) splňoval až vzorek obdrženy v červnu 2020 (typ F-RF v methanolu). Tento vzorek byl úspěšně zobrazen ve třech různých koncentracích po inkubaci s buněčnými linie NHDF, A431 a HaCaT. Ze snímků, je patrné, že se nanočástice se vyskytují zejména na povrchu buněk a ve vyšších koncentracích mají tendenci se shlukovat.

šarže	datum převzetí	komplikace
A	08.11.2018	Rho B v buňce, nanočástice s FITC mimo ve shlucích
B	22.03.2019	Rho B v buňce, nanočástice s FITC mimo ve shlucích
C	09.10.2019	Rho B zůstal po centrifugaci SiNP v supernatantu
D	12.12.2019	Rho B lokalizován v mitochondriích
E	04.05.2020	kontaminace
F	16.06.2020	Sterilní, SiNP konjugované s Rho B i FITC, mimo buňku

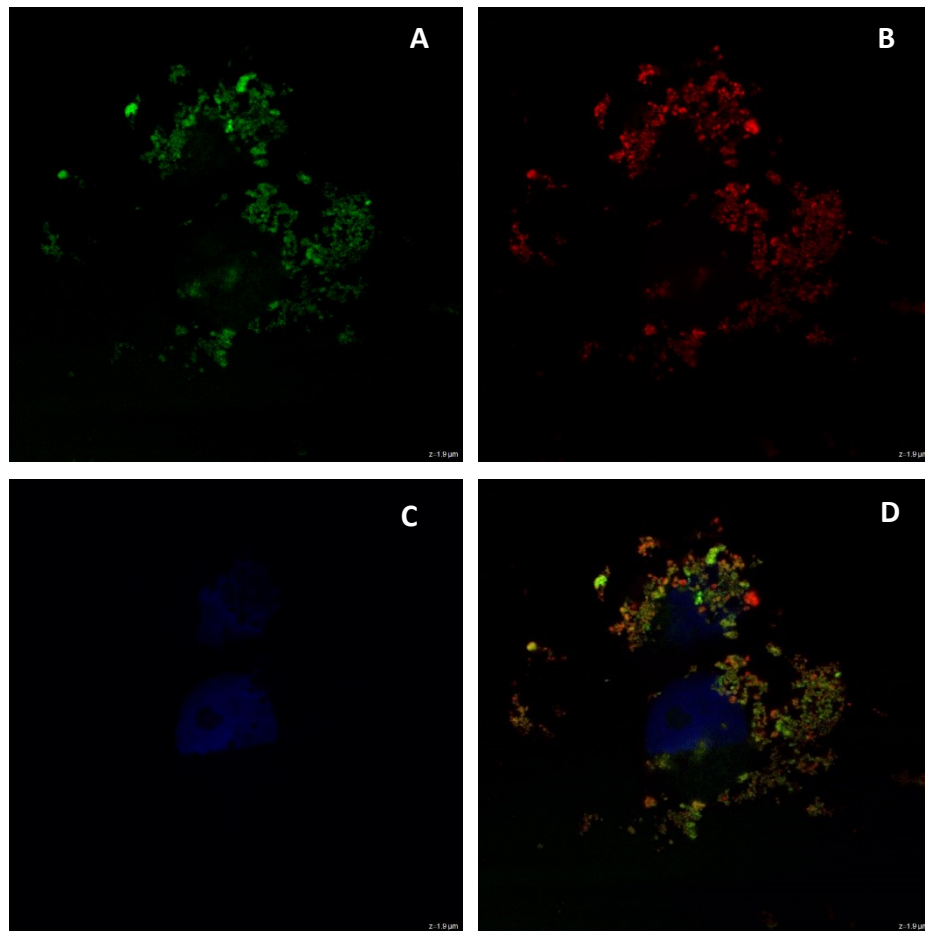
Tab. č. 10: Přehled převzatých nanočástic a jejich stručná charakterizace

#### 5.4 Lokalizace SiNP pomocí konfokální mikroskopie

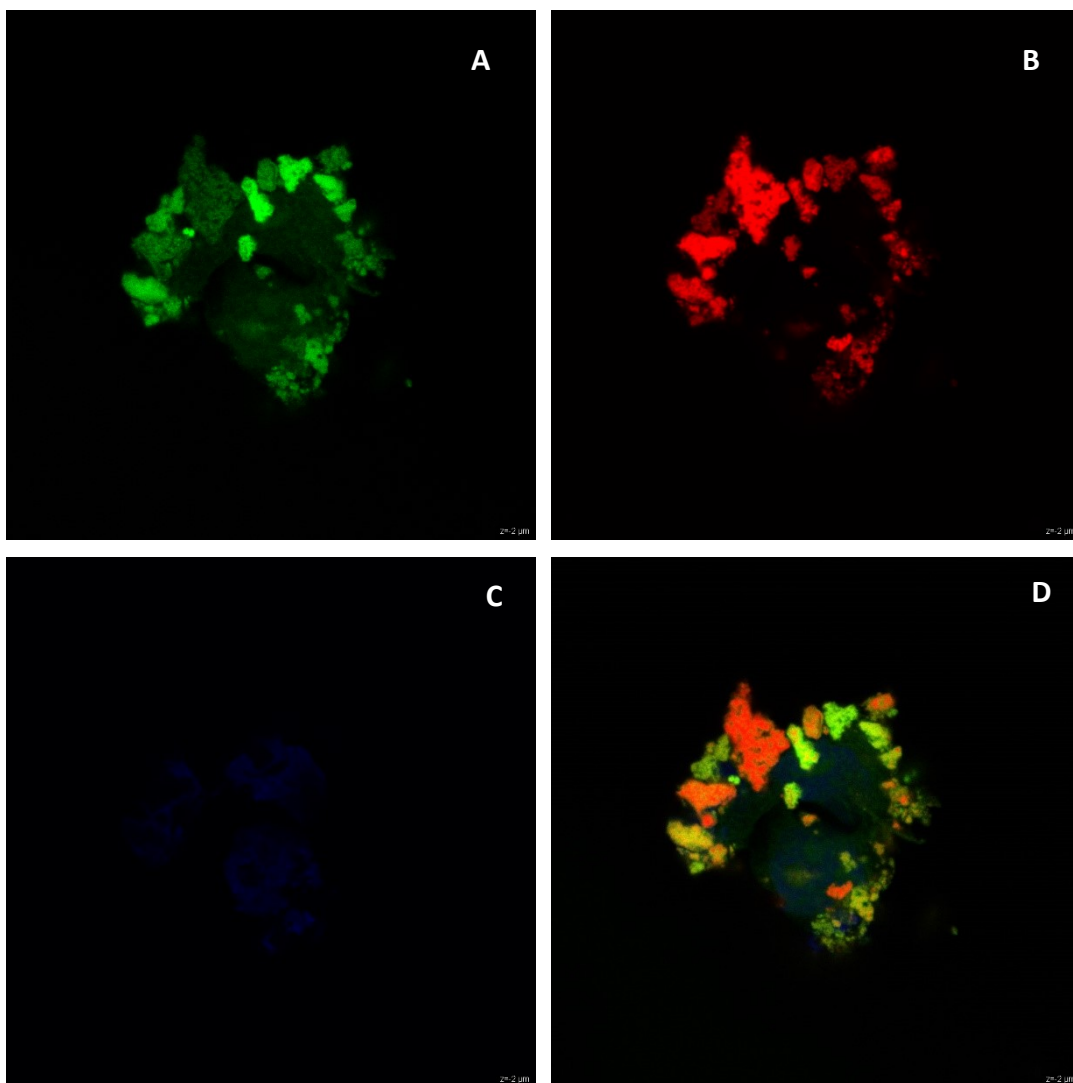
Pro preciznější lokalizaci nanočástic byly použity nanočástice typu F-RF, k zobrazení konfokálním mikroskopem bylo třeba použít fixovaný preparát. Fixace znemožňuje analyzovat obraz prostřednictvím pH senzitivního fluoroforu FITC a použít jej k výpočtu pH. Buňky linie A431 a HaCaT byly standardně inkubovány s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  po dobu 15 min. Pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus byly sledovány shluky nanočástic lokalizované zejména na povrchu buněk. Za účelem podpořit vstup nanočástic do buněk byl během inkubace přidán detergent Triton. Vzorky buněk s nanočásticemi byly dobarveny DAPI, za účelem lokalizovat buněčné jádro. Zafixované vzorky byly zobrazeny a nasnímány na konfokálním mikroskopu.

Na obrázku č. 37 a č. 38 jsou zobrazeny buňky A431 s nanočásticemi typu F-RF, vzorek na obrázku č. 37 byl na rozdíl od vzorku na obrázku č. 38 opůsoben 0,01 % Tritonem v PBS. Na snímku A lze pozorovat zelený signál z FITC navázaného na nanočástici. Na snímku B je detekován červený signál Rho B, taktéž lokalizující

nanočástici. Snímek C zobrazuje jsou modře zbarvená jádra DAPI. Snímek D je složený snímek ze všech tří kanálů.

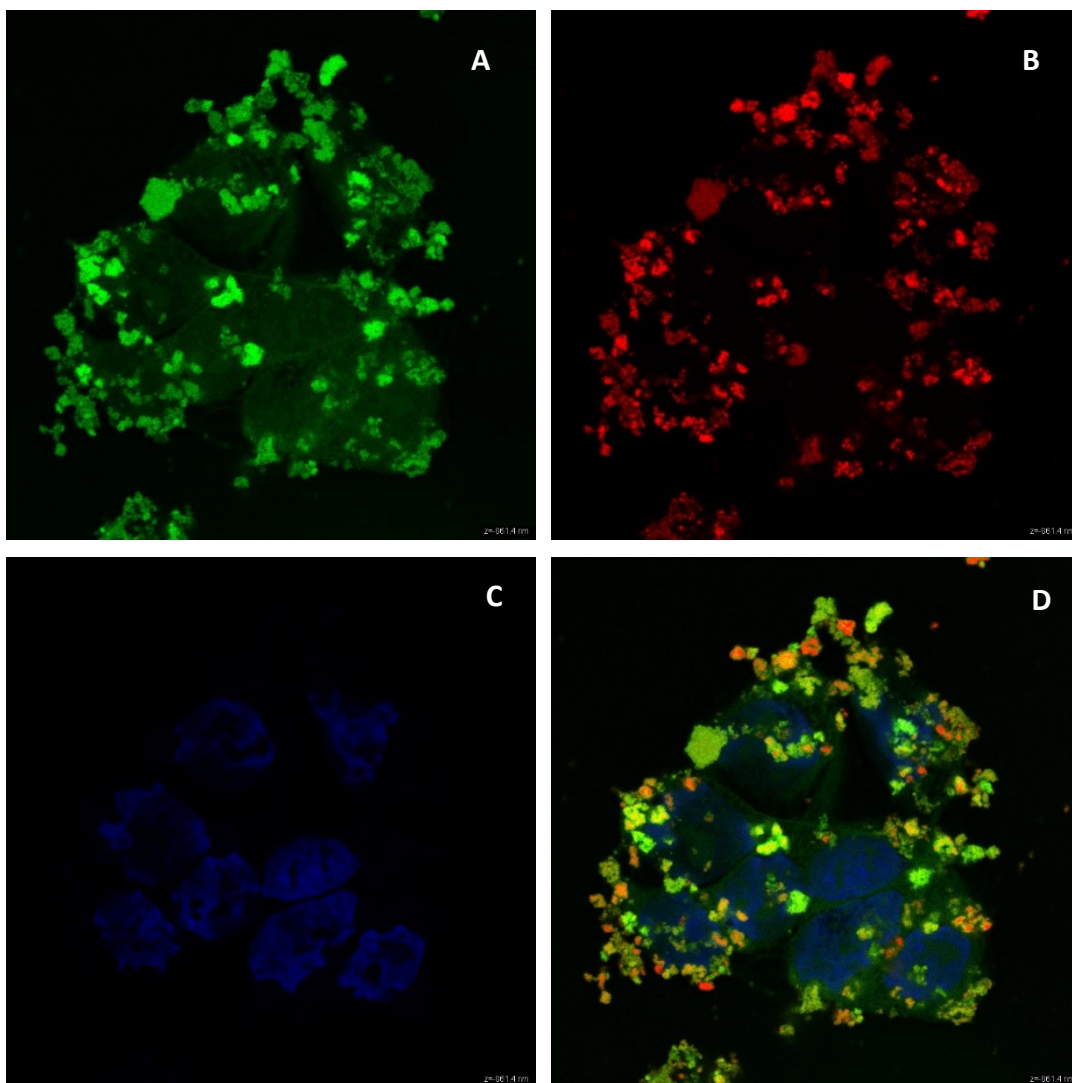


Obr. č. 37: Zobrazení fixovaných buněk A431 s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100 µg/ml na konfokálním mikroskopu. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: složení snímku A,B,C. **Buňky byly opůsobeny 1 µl 0,01 % roztoku Tritonu (v PBS) po dobu 1 min za účelem podpořit vstup nanočástic do buňky.**

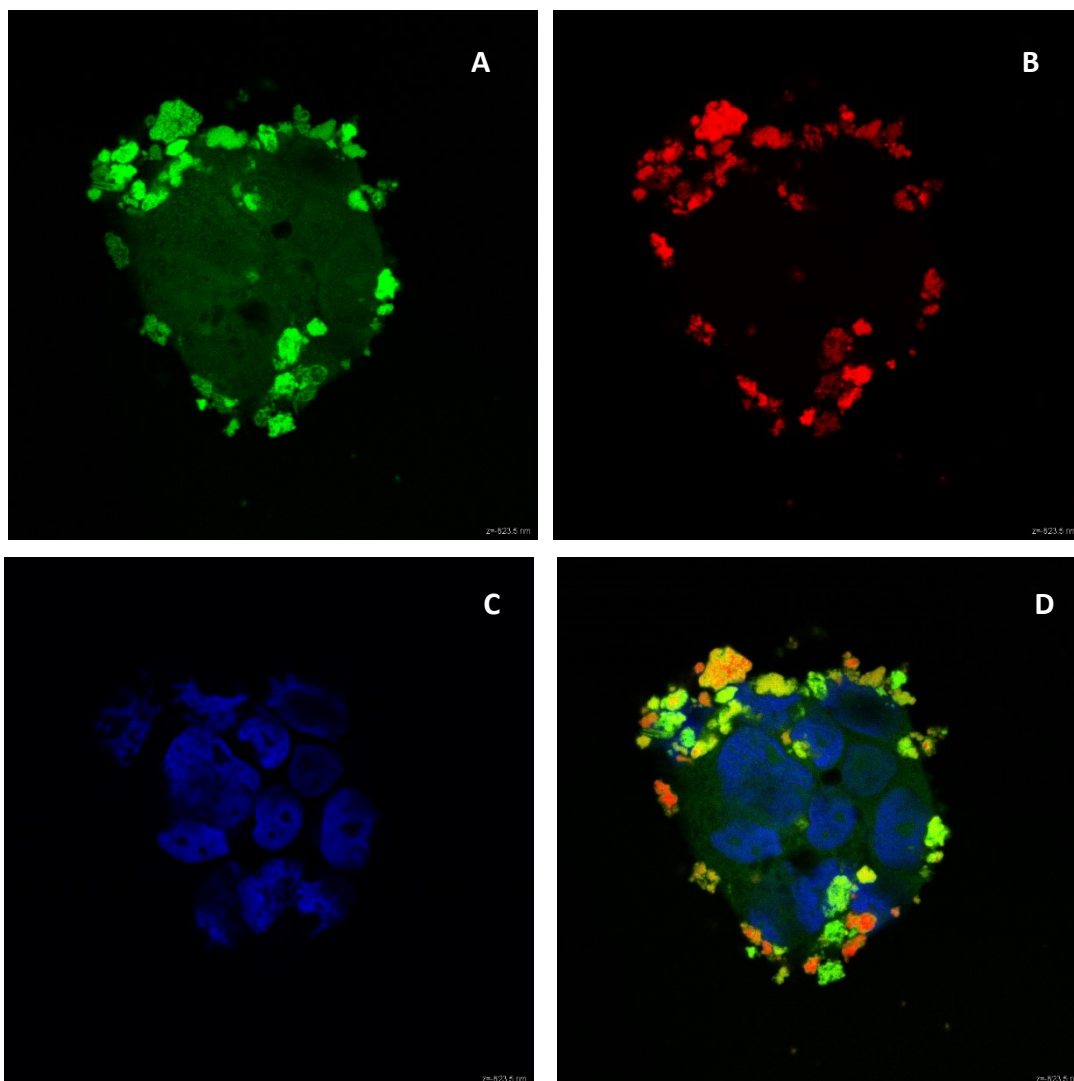


Obr. č. 38: Zobrazení fixovaných buněk A431 s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100 µg/ml na konfokálním mikroskopu. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: složení snímku A,B,C.

Buňky linie HaCaT s nanočásticemi typu F-RF jsou zobrazeny na obrázku č. 39 a č. 40. Buňky A431 na obrázku č. 39 byly inkubovány s nanočásticemi typu F-RF a s detergentem Triton. Pro srovnání obrázků č. 40 zobrazuje tytéž buňky s nanočásticemi neopůsobené Tritonem. Na snímku A lze pozorovat zelený signál z FITC navázaného na nanočástici. Na snímku B je detekován červený signál Rho B, taktéž lokalizující nanočástici. Snímek C zobrazuje jsou modře zbarvená jádra DAPI. Snímek D je složený snímek ze všech tří kanálů.

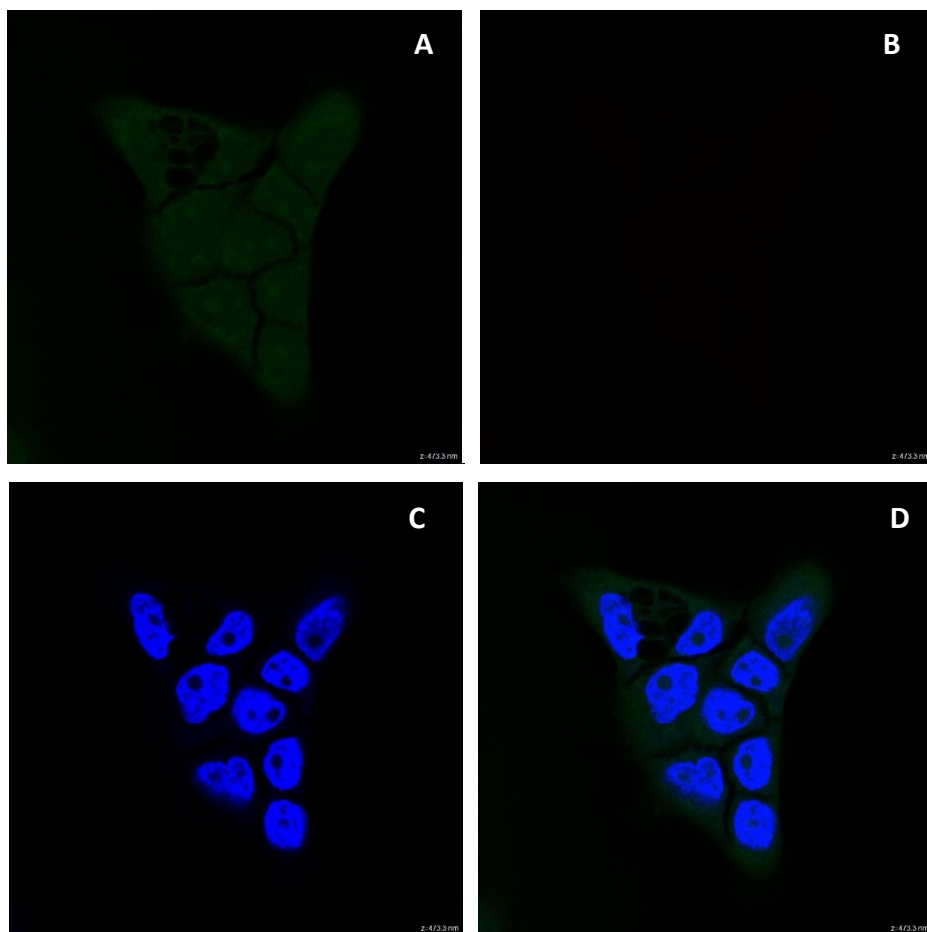


Obr. č. 39: Zobrazení fixovaných buněk HaCaT s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  na konfokálním mikroskopu. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: složení snímku A,B,C. **Buňky byly opůsobeny 1  $\mu\text{l}$  0,01 % roztoku Tritonu (v PBS) po dobu 1 min za účelem podpořit vstup nanočástic do buňky.**



Obr. č. 40: Zobrazení fixovaných buněk HaCaT s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  na konfokálním mikroskopu. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, snímek C: jádra barvena modře DAPI, snímek D: složení snímku A,B,C.

Buňky linie A431 neopůsobené nanočásticemi s obarvenými jádry a aktinem sloužily jako kontrola, znázorněno na obrázku č. 41. Na snímku A lze pozorovat aktin barvený zeleně Phalloidinem + AF 488. Červený signál na snímku B není detekován. Na snímku C jsou patrná jádra barvena modře DAPI. Snímek D reprezentuje složené snímky A, B, C.



Obr. č. 41: Zobrazení fixovaných buněk A431 bez nanočástic (kontrola) na konfokálním mikroskopu. Snímek A: aktin značen zeleně Phalloidinem + AF488, Snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP není detekována, snímek C: jádra značená modře DAPI, snímek D: složení snímků A, B, C.

Cílem této experimentální části bylo lokalizovat nanočástice F-RF. pH senzitivním fluoroforem FITC není možné měřit po fixaci vzorku pH, tato část byla zaměřena zejména na detekci červeného signálu z Rho B, ideálně uvnitř buňky. V předchozí mikroskopické části byly nanočástice F-RF pozorovány ve zvýšené míře na povrchu buněk. Za cílem podpořit vstup jednotlivých nanočástic do intracelulárního prostoru, byla membrána buněk narušena roztokem 0,01 % Tritonu.

Zobrazením nanočástic typu F-RF bylo zjištěno, že ani po narušení membrány 0,01 % roztokem Tritonu nebyly nanočástice lokalizovány v oblasti cytoplazmy, tedy uvnitř buňky. Dle snímků lze usuzovat na lokalizaci nanočástic na buněčné membráně. Toto tvrzení je podpořeno pořizováním 3D snímků převedených do videa, jež je součástí

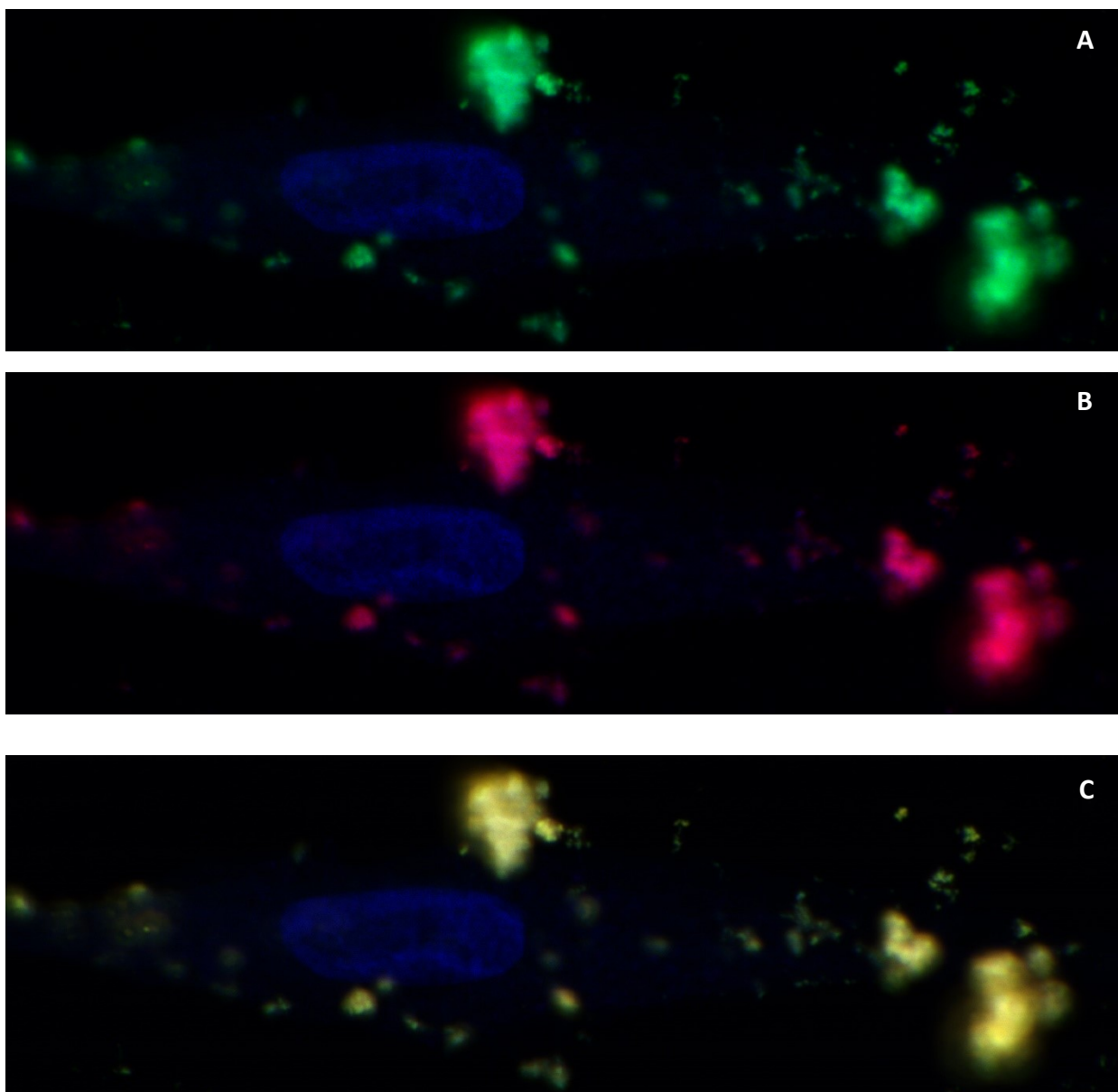
příloh na přiloženém CD. Pořadí v přiloženém videu je následující: 1. buňky linie A431 opůsobené Tritonem s F-RF, 2. buňky linie A431 bez Tritonu s F-RF, 3. buňky linie A431 kontrola, 4. buňky linie HaCaT opůsobené Tritonem s F-RF, 5. buňky linie HaCaT bez Tritonu s F-RF, 6. buňky linie HaCaT kontrola.

## **5.5 Lokalizace SiNP pomocí super-rezoluční mikroskopie**

Tato mikroskopická metoda umožňuje, zobrazovat vzorky za hranicí rozlišení kolem 200 nm. Toho je v případě mikroskopie STED dosaženo využitím dvou laserů, jeden pro excitaci fluoroforu a druhý depleční laser ve tvaru donutu obkružující laser excitační. Tak dojde k „vyčerpání“ (redukci) emise fluorescence v okolí excitačního paprsku. Fluorescence je soustředěna do středu excitačního paprsku a tím se zvyšuje rozlišovací schopnost mikroskopu až na 50 nm.

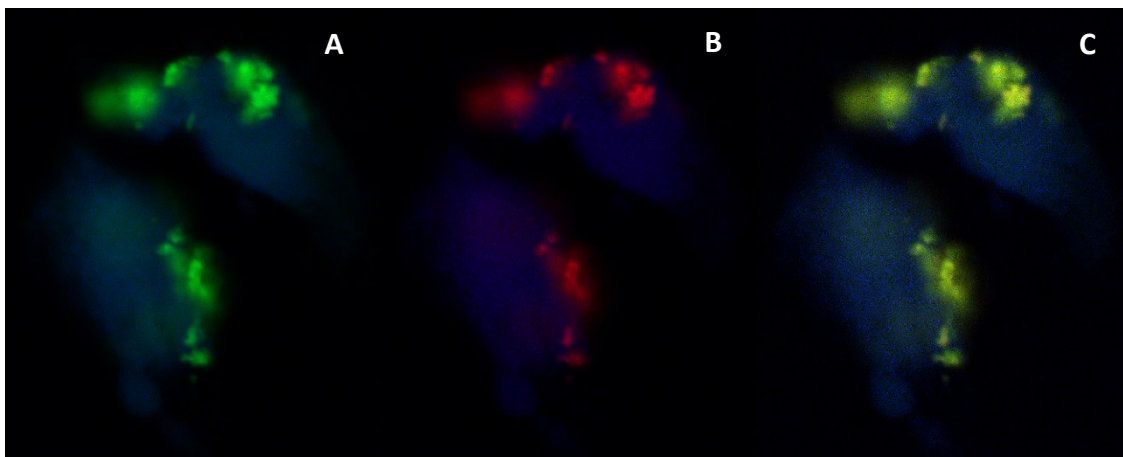
Super-rezoluční mikroskopie byla zařazen jako další metoda pro vizualizaci a lokalizaci SiNP typu F-RF. Nanočástice typu F-RF v nejvyšší koncentraci 100 µg/ml byly inkubovány 15 min s buňkami linie A431, HaCaT a NHDF. Buněčná jádra byla lokalizována pomocí DAPI. Buňky byly opůsobeny 0,01 % roztoku Tritonu po dobu 1 min.

Na obrázku č. 42 je zobrazen fibroblast NHDF. Na snímku A je detekován zelený signál FITC. Na snímku B je detekován červený signál z Rho B. Snímek C zobrazuje modře obarvené jádro a složený signál fluorescence FITC a Rho B.



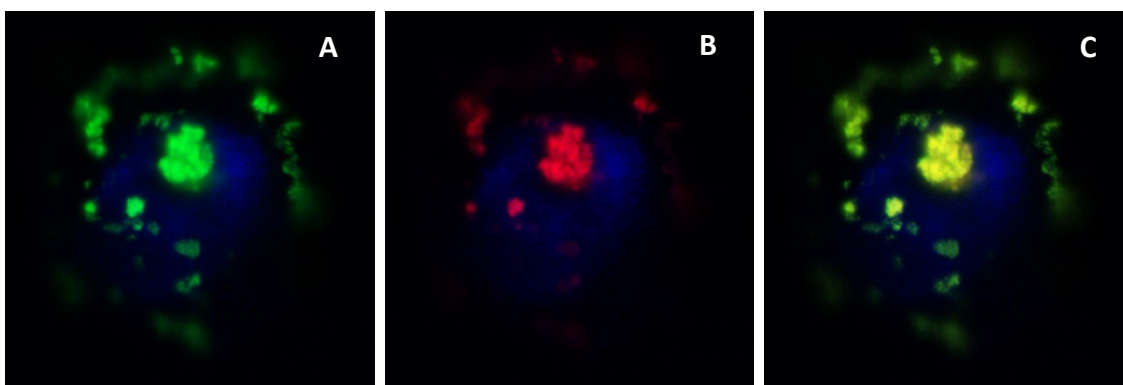
Obr. č. 42: Zobrazení fixovaných buněk NHDF s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  pomocí STED mikroskopie. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, jádro značeno modře DAPI, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, jádro značeno modře DAPI, snímek C: žlutý signál složený z Rho B a FITC, jádro značeno modře DAPI.

Na obrázku č. 43 jsou zobrazeny buňky A431. Na snímku A je detekován zelený signál FITC. Na snímku B je detekován červený signál z Rho B. Snímek C zobrazuje modře obarvené jádro a složený signál fluorescence FITC a Rho B.



Obr. č. 43: Zobrazení fixovaných buněk A431 s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  pomocí STED mikroskopie. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, jádro značeno modře DAPI, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, jádro značeno modře DAPI, snímek C: žlutý signál složený z Rho B a FITC, jádro značeno modře DAPI.

Na obrázku č. 44 jsou zobrazeny buňky HaCaT. Na snímku A je detekován zelený signál FITC. Na snímku B je detekován červený signál z Rho B. Snímek C zobrazuje modře obarvené jádro a složený signál fluorescence FITC a Rho B.

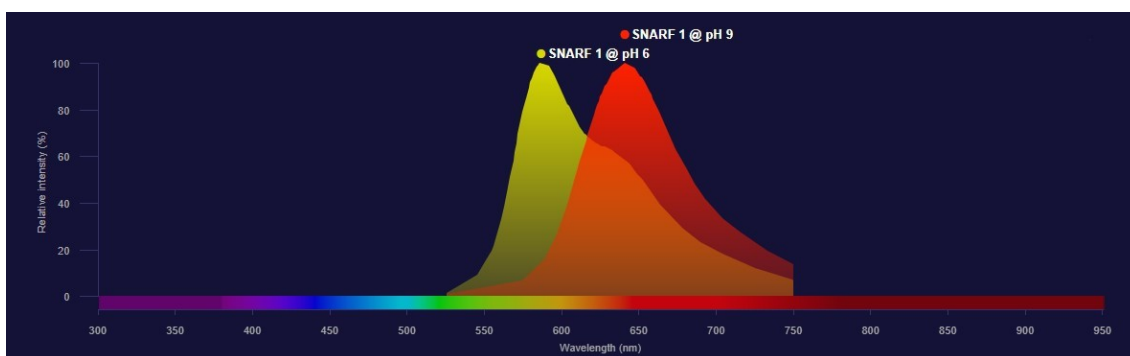


Obr. č. 44: Zobrazení fixovaných buněk HaCaT s nanočásticemi typu F-RF v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  pomocí STED mikroskopie. Snímek A: zelená fluorescence FITC konjugovaného s SiNP, jádro značeno modře DAPI, snímek B: červená fluorescence Rhodaminu B konjugovaného s SiNP, jádro značeno modře DAPI, snímek C: žlutý signál složený z Rho B a FITC, jádro značeno modře DAPI.

Využitím superrezoluční mikroskopie byly získány snímky buněk s nanočásticemi. V porovnání se snímky z konfokálního mikroskopu není patrné vyšší rozlišení pro lokalizaci nanočástic, právě naopak. Zejména patrné jsou shluky nanočástic lokalizované pravděpodobně na povrchu buňky.

## 5.6 Stanovení intracelulárního pH pomocí pH indikátoru SNARF-1

Jednou z variant stanovení pH je využití fluorescenčního ratiometrického indikátoru SNARF-1 (5-(and-6)-Carboxy SNARF<sup>TM</sup>-1, acetoxymetyl ester, acetát, Invitrogen<sup>TM</sup>). Tento indikátor je ve formě acetoxymetyl esteru schopný projít buněčnou membránou, vlivem buněčných esteráz uvnitř buňky dochází k odštěpení acetoxymetylu a uvěznění zbytku nabitě molekuly SNARF-1 v cytosolu (Hinton et al. 2009). Tento na fluorescenci založený SNARF-1 má pouze jedno excitační maximum, a to mezi 488-514 nm. Fluorescence je snímána ve dvou emisních vlnových délkách, při 580 nm a 640 nm, což je znázorněno na grafu č. 45. Podílem hodnot intenzity fluorescence naměřené při 580 nm a 640 nm dostaneme hodnotu, jež můžeme po kalibraci použít pro výpočet reálného vnitrobuněčného pH.

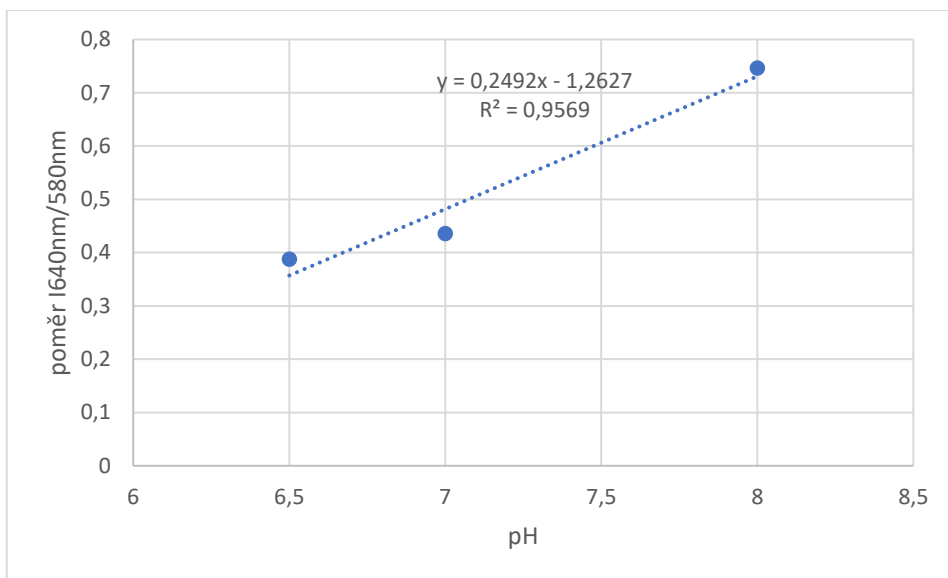


Graf č. 45: Relativní intenzita fluorescence pro emisní maxima SNARF-1 při 580 nm a 640 nm (převzato z Fluorescence SpectraViewer, ThermoFisher)

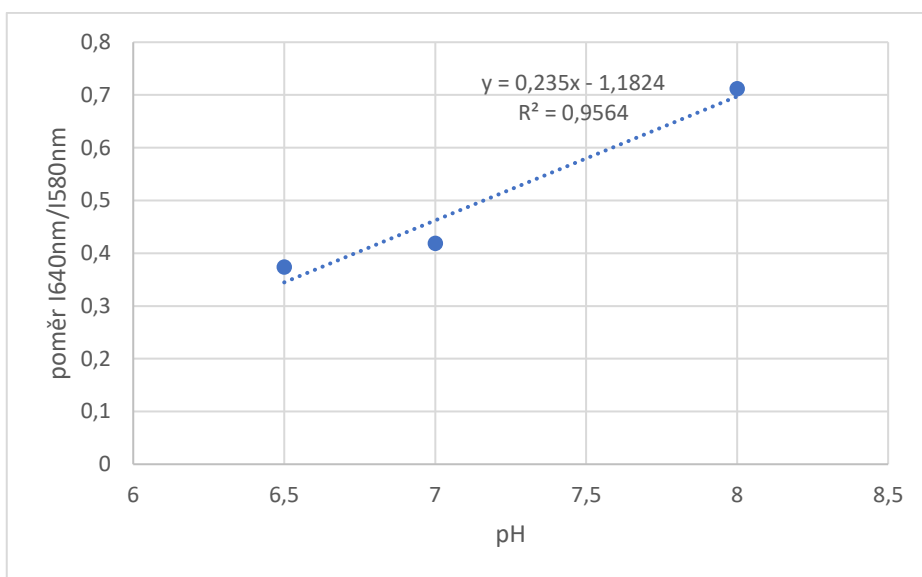
### 5.6.1 Kalibrace

K dopočítání reálných hodnot pH bylo nejdříve nutné SNARF-1 kalibrovat v roztocích o různých hodnotách pH za přítomnosti  $K^+/H^+$  ionoforu Nigericinu (Sigma-Aldrich). Ionofor umožnil vyrovnání pH intracelulárního a extracelulárního prostředí vlivem toku extracelulárního draselného iontu. Smíšením kyselého pufru A a zásaditého pufru B v odlišných poměrech byly připraveny pufrы o hodnotách pH: 6,5; 7; 8.

Kalibrace byla měřena v režimu měření intenzity fluorescence na fluorescenčním destičkovém spektrometru při vlnových délkách excitace 488 nm a při dvou emisních maximech 580 nm a 640 nm, gain 132. Byla stanovena kalibrační křivka pro SNARF-1 aplikovaný k buňkám A431 a HaCaT za použití ionoforu Nigericinu, v pufrch o hodnotách pH 6,5;7;8 (graf č. 46 a č. 47).



Graf č. 46: Kalibrační křivka pro SNARF-1 a buněčnou linii A431. Vyjadřuje závislost poměru intenzit fluorescence SNARF-1 měřených ve dvou emisních délkách na pH.

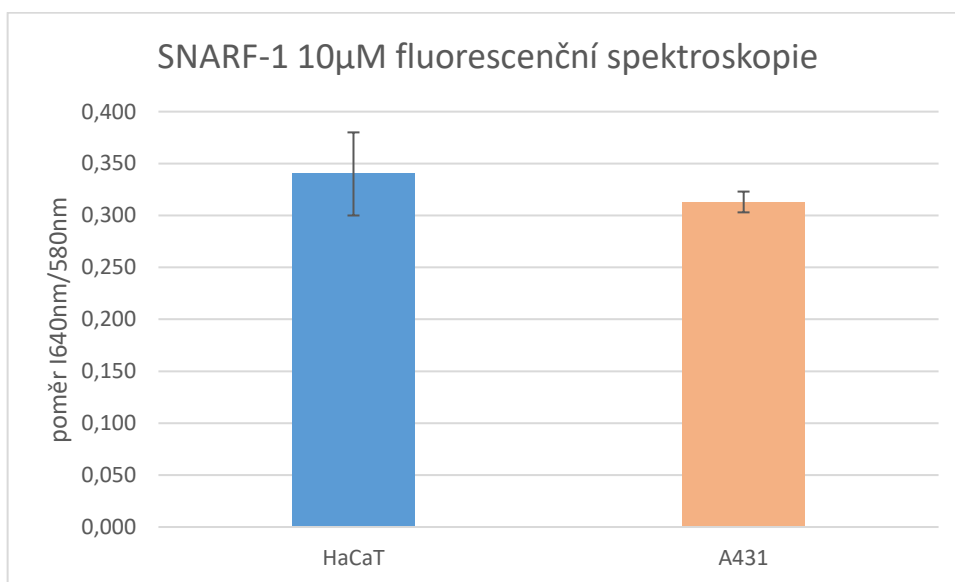


Graf č. 47: Kalibrační křivka pro SNARF-1 a buněčnou linii HaCaT. Vyjadřuje závislost poměru intenzit fluorescence SNARF-1 měřených ve dvou emisních délkách na pH.

Z kalibračních křivek byly dopočítány hodnoty pH pro buněčné linie HaCaT a A431. Na fluorescenčním destičkovém spektrometru byla hodnota pH pro HaCaT stanovena na 6,7 a pro A431 na 6,3, naznačující více kyselé prostředí u rakovinných A431 buněk.

### 5.6.2 Detekce pH indikátoru SNARF-1 metodou fluorescenční spektroskopie

Po kalibraci byl SNARF-1 v koncentraci 10  $\mu$ M inkubován s buněčnou linií A431 a HaCaT. Při totožném nastavení fluorescenčního destičkového spektrometru byly snímány intenzity fluorescence při vlnových délkách 580 nm a 640 nm. Prezentované výsledky jsou průměrem hodnot minimálně ze tří provedených měření. Poměr intenzit fluorescence (640/580 nm) je v případě měření na destičkovém spektrometru zobrazeno na grafu č. 48, buněčná linie HaCaT dosahuje hodnoty 0,340 vs 0,313 buněčné linie A431 (graf č. 48). Poměr intenzit fluorescence (640/580 nm) dosahuje opět vyšších hodnot u buněčné linie HaCaT, než je tomu u buněk linie A431, což poukazuje na kyslejší intracelulární prostředí buněk A431.

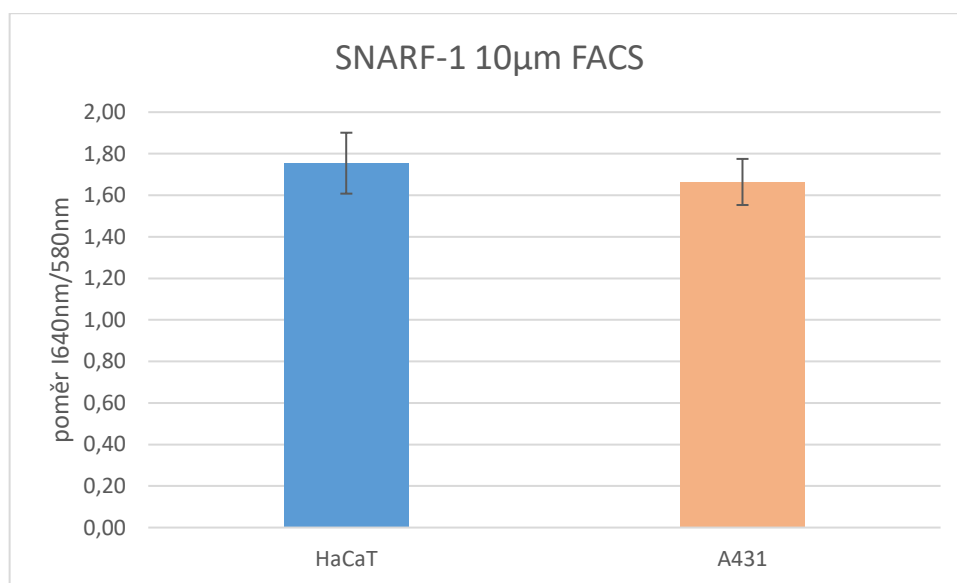


Graf č. 48: Porovnání poměrů intenzit fluorescence (I640 nm/I580 nm) SNARF-1 u buněčné linie HaCaT a A431 metodou fluorescenční spektroskopie. Poměr intenzit fluorescence linie HaCaT činil 0,340, u linie A431 0,313. Prezentované hodnoty jsou výsledkem tří nezávislých měření. Chybová úsečka představuje směrodatnou odchylku.

### 5.6.3 Detekce pH indikátoru SNARF-1 metodou průtokové cytometrie

Detekce fluorescence pH indikátoru SNARF-1 byla rozšířena o metodu průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie analyzuje jednotlivé buňky v proudu tekutiny, kterou prochází paprsek světla z laseru. Buňky je poté možné třídit mimo jiné i na základě jejich specifických fluorescenčních vlastností. Opět byly buňky linie A431 a HaCaT inkubovány s pH indikátorem SNARF-1 v koncentraci 10  $\mu$ M po dobu 30 min. Buňky

byly posléze převedeny do buněčné suspenze a včetně kontroly a duplikátu měřeny metodou průtokové cytometrie při nastavení uvedeném v tab. č 7. V programu FlowJo byla vyhodnocena průměrná intenzita fluorescence, poté byl stanoven poměr 640/580 nm. Takto získané výsledky poukazují na shodný trend detekovaný pomocí destičkového spektrometru. Výsledky jsou průměrem hodnot čtyř provedených měření. Poměr průměrných hodnot intenzit fluorescence (640 nm/580 nm) byl metodou průtokové cytometrie stanoven na 1,75 u buněčné linie HaCaT vs 1,66 u buněčné linie A431 (graf č. 49).

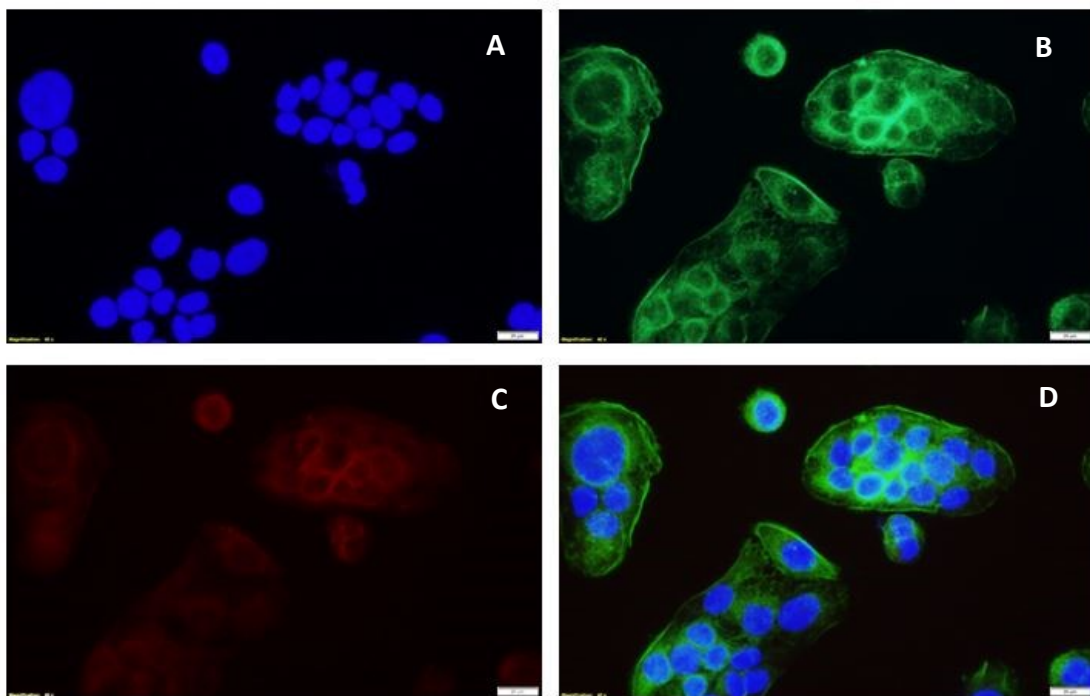


Graf č. 49: Porovnání poměrů intenzit fluorescence (I640 nm/I580 nm) SNARF-1 u buněčné linie HaCaT a A431 metodou průtokové cytometrie. Poměr intenzit fluorescence linie HaCaT činil 1,75 u linie A431 1,66. Prezentované hodnoty jsou výsledkem tří nezávislých měření. Chybová úsečka představuje směrodatnou odchylku.

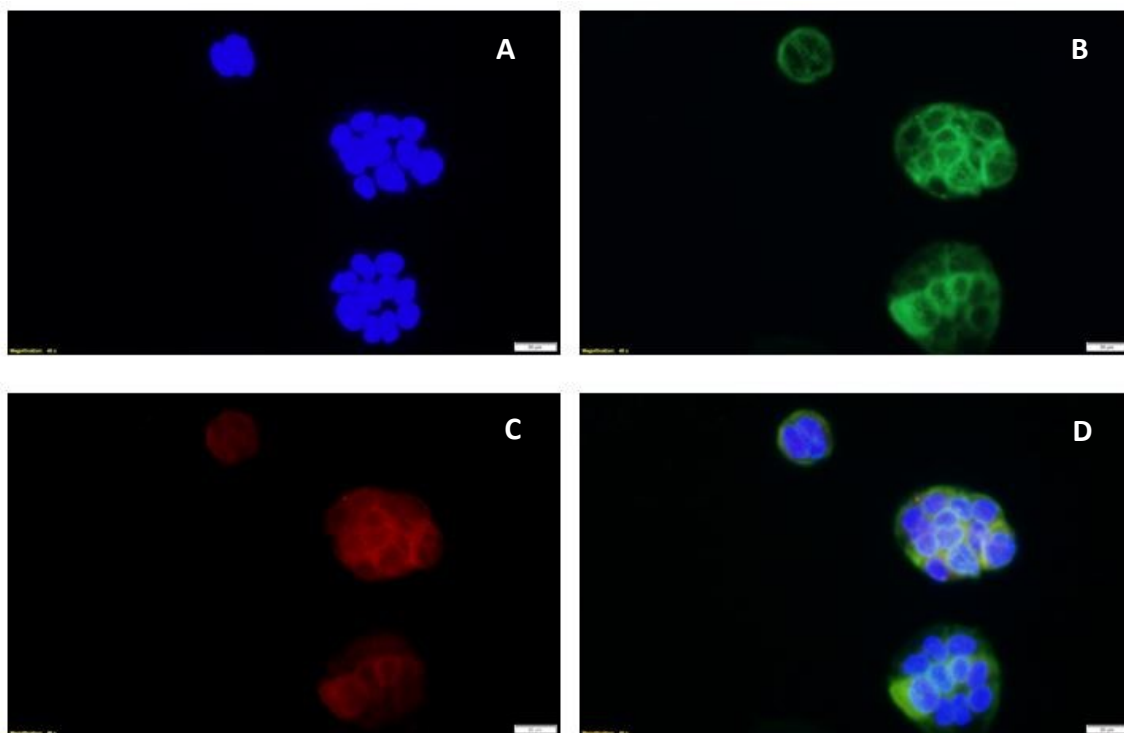
## 5.7 Vizualizace SNARF-1 fluorescenčním mikroskopem Olympus

Metodou fluorescenční mikroskopie byl vizualizován SNARF-1 uvnitř buněk. Nejdříve byly testovány dvě koncentrace SNARF-1: 5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ , ale dále byla používána již jen koncentrace 10  $\mu\text{M}$ , znázorněno na obrázcích č. 50 a č. 51. Byl použit pouze kanál pro snímání vlnové délky 580 nm, jelikož filtr pro snímání druhého emisního maxima (640 nm) nebyl ve výbavě našeho fluorescenčního mikroskopu Olympus.

Na obrázcích č. 50 a č. 51 lze jsou vyfoceny fixované buňky linie HaCaT inkubované se SNARF-1 (koncentrace 5  $\mu$ M vs 10  $\mu$ M), DAPI a Phalloidin + AF 488. Byly porovnány dvě koncentrace SNARF-1 za účelem optimalizace jeho vizualizace. Na snímku A jsou jádra barvená modře DAPI, na snímku B je vizualizován aktin pomocí Phalloidin + AF 488. Na snímku C u obrázku č. 50 je pozorovatelný slabý červený signál SNARF-1, na obrázku č. 51 je při vyšší koncentraci SNARF-1 červený signál intenzivnější. Snímek D je složený ze snímku A, B, C. Výsledky ukazují, že použití vyšší koncentrace dává lepší fluorescenční signál z vnitřku buňky.

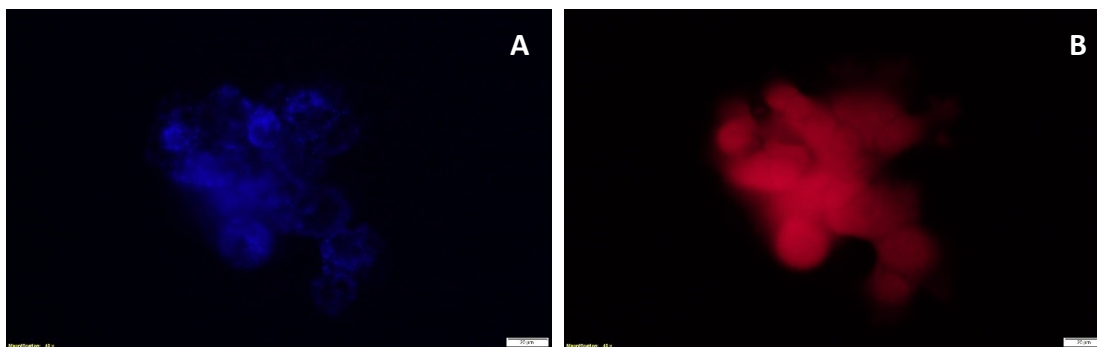


Obr. č. 50: Lokalizace červeně zářícího SNARF-1 v koncentraci 5 $\mu$ M uvnitř již zafixovaných buněk HaCaT. Snímek A: jádra obarvena modře DAPI, snímek B: aktin obarven zeleně Phalloidin + AF488, snímek C: červený signál SNARF-1 (580 nm), snímek D: složený ze snímku A, B, C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20  $\mu$ m.

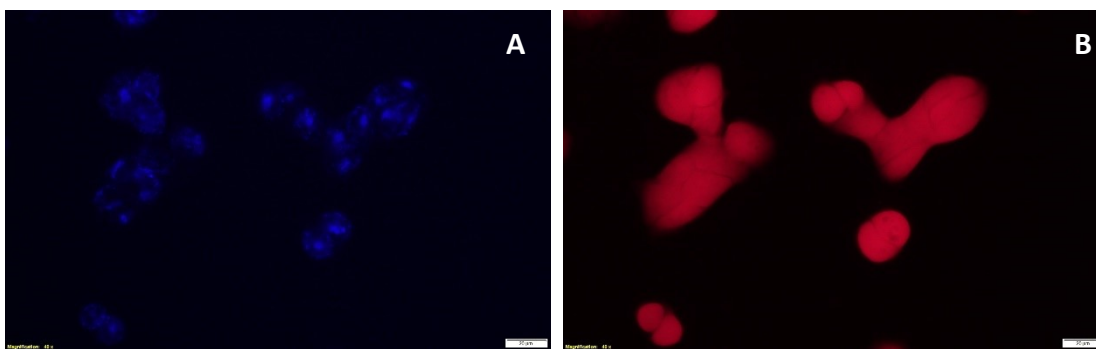


Obr. č. 51: Lokalizace červeně zářícího SNARF-1 v koncentraci 10  $\mu$ M uvnitř již zafixovaných buněk HaCaT. Snímek A: jádra obarvena modře DAPI, snímek B: aktin obarven zeleně Phalloidin + AF488, snímek C: červený signál SNARF-1 (580 nm), snímek D: složený ze snímku A, B, C. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20  $\mu$ m.

K lokalizaci SNARF-1 uvnitř živých buněk linie A431 a HaCaT byly lysozomy barveny modře vitální barvičkou LysoTracker MHB 207. Živé buňky A431 jsou zobrazeny na obrázku č. 52. Na snímku A jsou modře barveny lysozomy (LysoTracker MHB207), snímek B zobrazuje červenou fluorescenci SNARF-1 (580 nm). Byly taktéž pozorovány živé buňky HaCaT (obr. č. 53). Na snímku A jsou modře barveny lysozomy (LysoTracker MHB207), snímek B zobrazuje červenou fluorescenci SNARF-1 (580 nm). Lokalizace SNARF-1 ve váčcích lysozomů nebyla potvrzena.

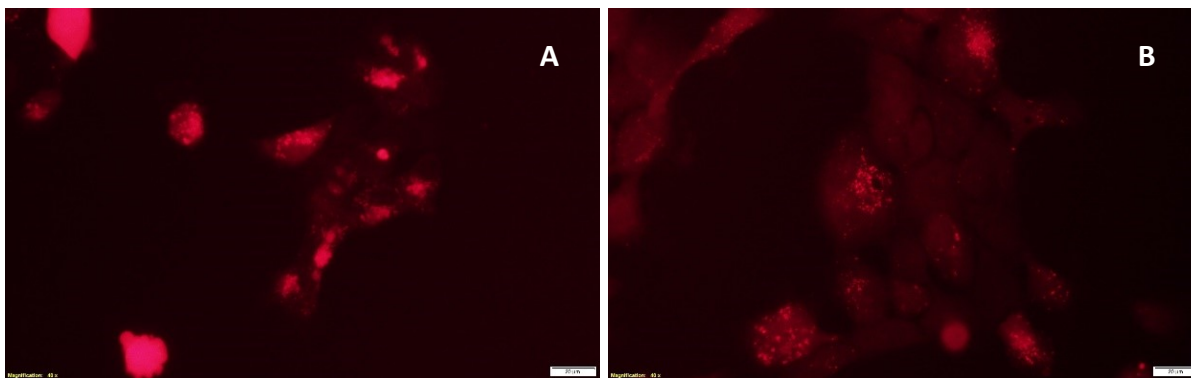


Obr. č. 52: Lokalizace červeně zářícího SNARF-1 v koncentraci 10  $\mu$ M uvnitř živých buněk A431. Snímek A: lysozomy barveny modře LysoTracker MHB 207, snímek B: fluorescence SNARF-1 (580nm). Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20  $\mu$ m.



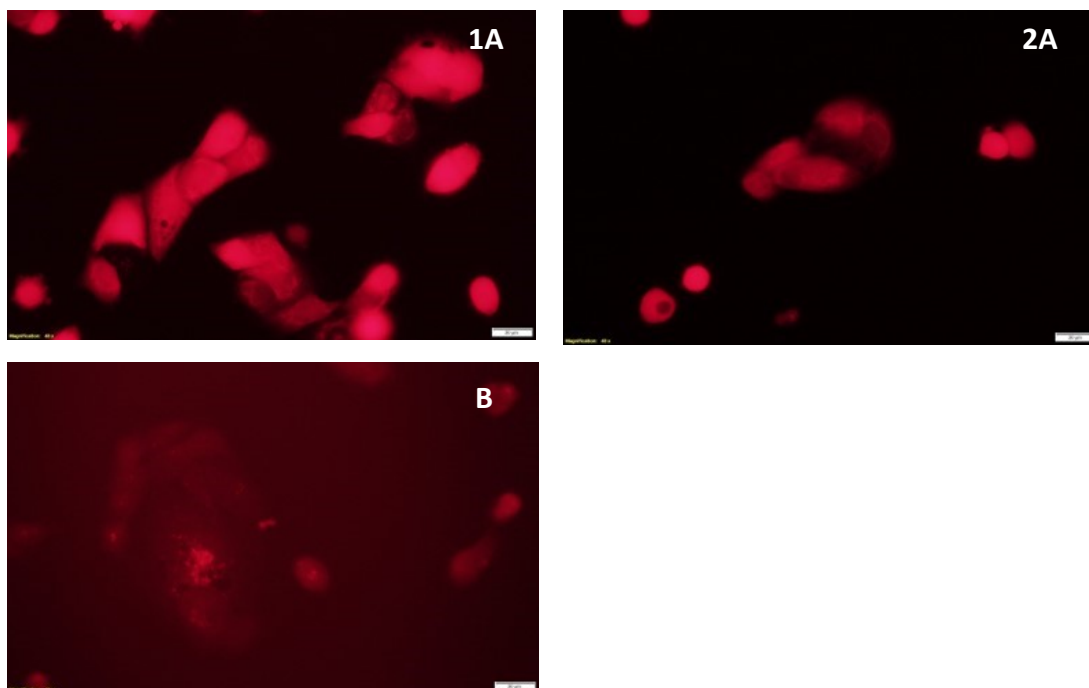
Obr. č. 53: Lokalizace červeně zářícího SNARF-1 v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  uvnitř živých buněk HaCaT. Snímek A: lysozomy barveny modře LysoTracker MHB 207, snímek B: fluorescence SNARF-1 (580nm). Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20  $\mu\text{m}$ .

Na obrázku č. 54 jsou vyfoceny živé i fixované buňky linie A431 inkubované s 10  $\mu\text{M}$  SNARF-1. Lokalizace sondy se v rámci jednoho vzorku liší. Na snímku A jsou živé buňky A431, SNARF-1 se vyskytuje spíše rozptýlený v cytoplazmě, ale lze pozorovat i místa, kde se v cytoplazmě koncentruje. Na snímku B jsou buňky A431 po fixaci, SNARF-1 lze pozorovat spíše v útvarech připomínající váčky.



Obr. č. 54: Lokalizace červeně zářícího SNARF-1 (580 nm) v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  uvnitř buněk A431. A) buňky živé, B) buňky po fixaci. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20  $\mu\text{m}$ .

Na obrázku č. 55 jsou vyfoceny živé i fixované buňky linie HaCaT inkubované s 10  $\mu\text{M}$  SNARF-1. Lokalizace sondy se v rámci jednoho vzorku, který se nachází v různém stavu (živé buňky vs buňky po fixaci), liší. SNARF-1 lze pozorovat jak v cytoplazmě (snímek 1A), tak v útvarech připomínající váčky (snímek B).



Obr. č. 55: Lokalizace červeně zářícího SNARF-1 v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  uvnitř buněk HaCaT. 1A) a 2A) buňky živé, B) buňky po fixaci. Foceno objektivem 40x, bílá úsečka vpravo dole reprezentuje rozměr 20  $\mu\text{m}$ .

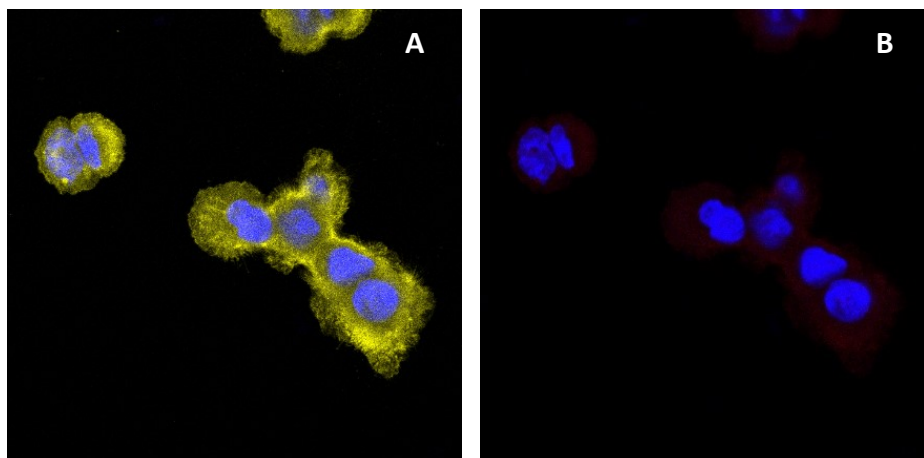
Cílem této experimentální části bylo vizualizovat SNARF-1 v buňce, pozorovány byly buňky linie HaCaT a A431, živé i fixované vzorky. Ke kolokalizaci SNARF-1 byly použity fluorescenční barvy jako LysoTracker MHB 207 a Phalloidin+AF 488. SNARF-1 byl pozorován jak v cytoplazmě, tak v útvech připomínající váčky, nicméně lokalizace v lysosomech potvrzena nebyla.

## 5.8 Lokalizace SNARF-1 pomocí konfokální mikroskopie

Pro preciznější lokalizaci SNARF-1 uvnitř buněk A431 a HaCaT byly preparáty snímány na konfokálním mikroskopu. Byl použit kanál pro snímání prvního emisního maxima při 580 nm a zvlášť kanál pro snímání druhého emisního maxima při 640 nm. K jeho kolokalizaci byly použity fluorescenční barvy jako LysoTracker MHB207, pro snažší vizualizaci a lokalizaci buněk byla jádra barvena DAPI.

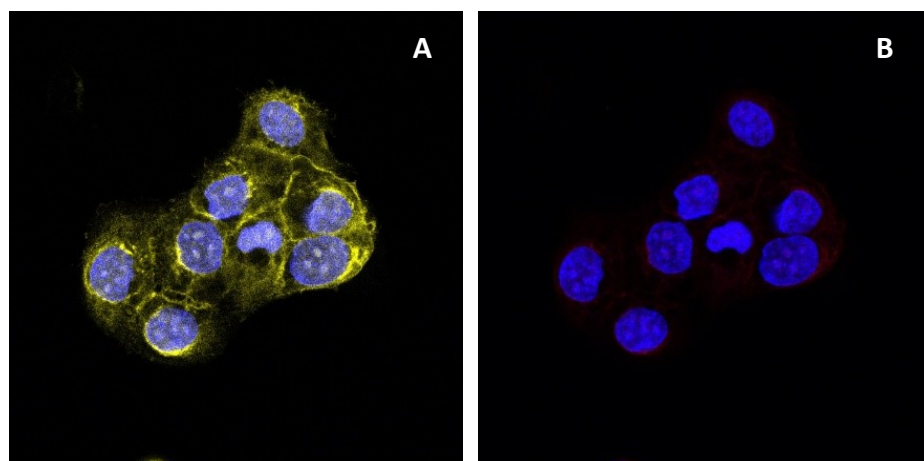
Na obrázku č. 56 jsou snímky buněk A431 inkubovaných s 10  $\mu\text{M}$  SNARF-1. Snímek A zobrazuje SNARF-1 v prvním emisním maximu při 580 nm a jádra obarvená

modře. Na snímku B je SNARF-1 v druhém emisním maximu při 640 nm a jádra obarvená modře.



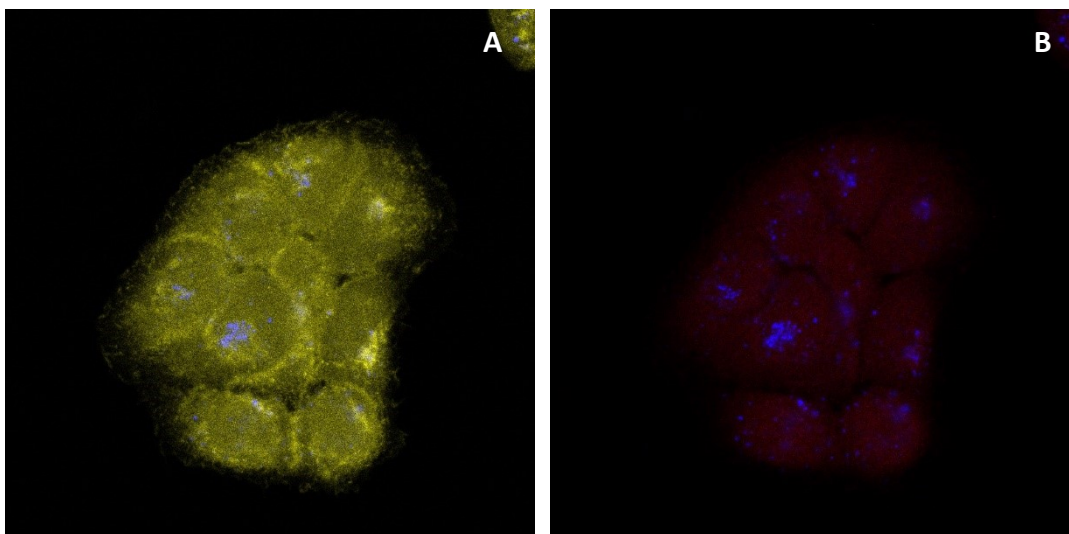
Obr. č. 56: Lokalizace SNARF-1 v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  uvnitř již zafixovaných buněk A431. Snímek A: žlutá fluorescence SNARF-1 (570-590 nm), jádra obarvena modře DAPI, snímek B: červená fluorescence SNARF-1 (630-650 nm), jádra obarvena modře DAPI.

Na obrázku č. 57 jsou snímky buněk HaCaT inkubovaných s 10  $\mu\text{M}$  SNARF-1. Snímek A zobrazuje SNARF-1 v prvním emisním maximu při 580 nm a jádra obarvená modře. Na snímku B je SNARF-1 v druhém emisním maximu při 640 nm a jádra obarvená modře.



Obr. č. 57: Lokalizace SNARF-1 v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  uvnitř již zafixovaných buněk HaCaT. Snímek A: žlutá fluorescence SNARF-1 (570-590 nm), jádra obarvena modře DAPI, snímek B: červená fluorescence SNARF-1 (630-650 nm), jádra obarvena modře DAPI.

Na obrázku č. 58 jsou snímky fixovaných buněk HaCaT inkubovaných s 10  $\mu\text{M}$  SNARF-1. Snímek A zobrazuje SNARF-1 v prvním emisním maximu při 580 nm s modře barvenými lysozomy. Snímek B zobrazuje SNARF-1 v druhém emisním maximu při 640 nm, taktéž s lysozomy barvenými modře.



Obr. č. 58: Lokalizace SNARF-1 v koncentraci 10  $\mu$ M uvnitř již zafixovaných buněk HaCaT. Snímek A: žlutá fluorescence SNARF-1 (570-590 nm), modře barvené lysosomy LysoTracker MHB 207, Snímek B: červená fluorescence SNARF-1 (630-650 nm), modře barvené lysosomy LysoTracker MHB 207.

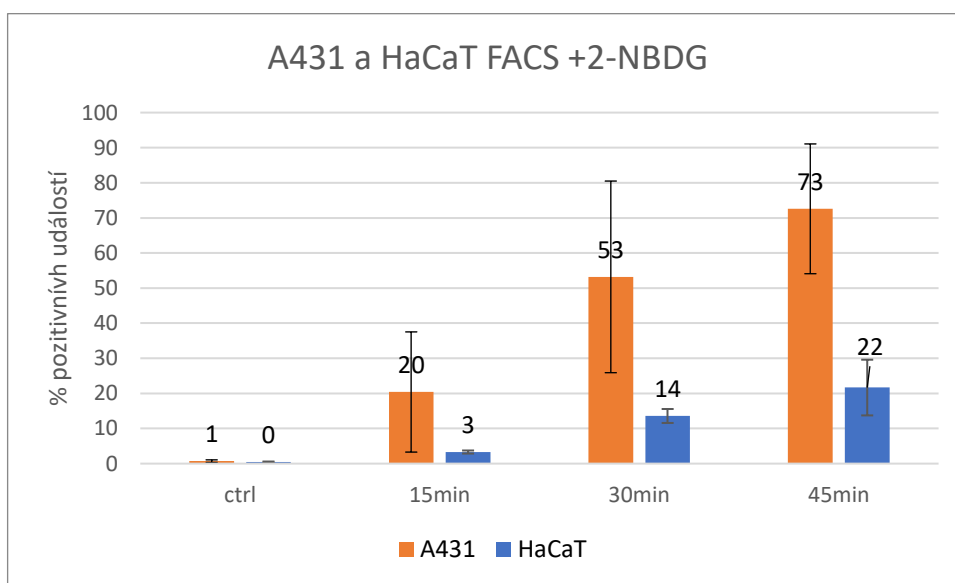
Konfokálním mikroskopem byl zobrazen SNARF-1 v buňkách A431 a HaCaT. Byl taktéž pozorován v cytoplazmě. U buněk HaCaT byla provedena kolokalizace s LysoTrackerem MHB 207, lokalizace v lysozomech pozorována nebyla.

## 5.9 Stanovení buněčné spotřeby glukózy použitím jejího analogu 2-NBDG

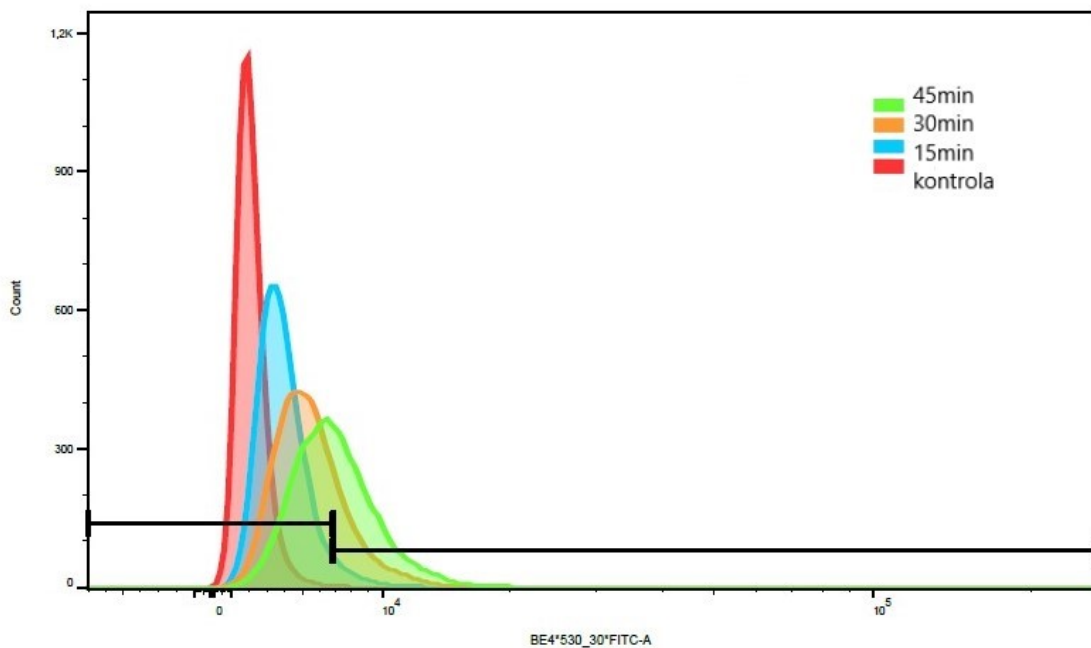
Buněčná spotřeba glukózy přímo souvisí s mírou glykolýzy v metabolismu. Tento princip využívá D-analog glukózy (2-NBDG, (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-deoxyglukóza, ThermoFisher,) fungující jako kompetitivní inhibitor v glykolytické dráze. Na takové molekule glukózy došlo k odstranění OH skupiny na 2. uhlíku, připojila se modifikovaná fluorescenčně značená skupina, kterou již enzym hexokináza nerozezná. Nevzniká proto glukóza-6-fosfát a glykolýza je pozastavená. Průtoková cytometrie analyzuje jednotlivé buňky v proudu tekutiny, kterou prochází paprsek světla z laseru. Buňky je poté možné třídit mimo jiné i na základě jejich specifických fluorescenčních vlastností. Zelenou fluorescenci 2-NBDG lze snímat při

vlnových délkách excitace 456 nm a emise 540 nm a pomocí průtokové cytometrie.

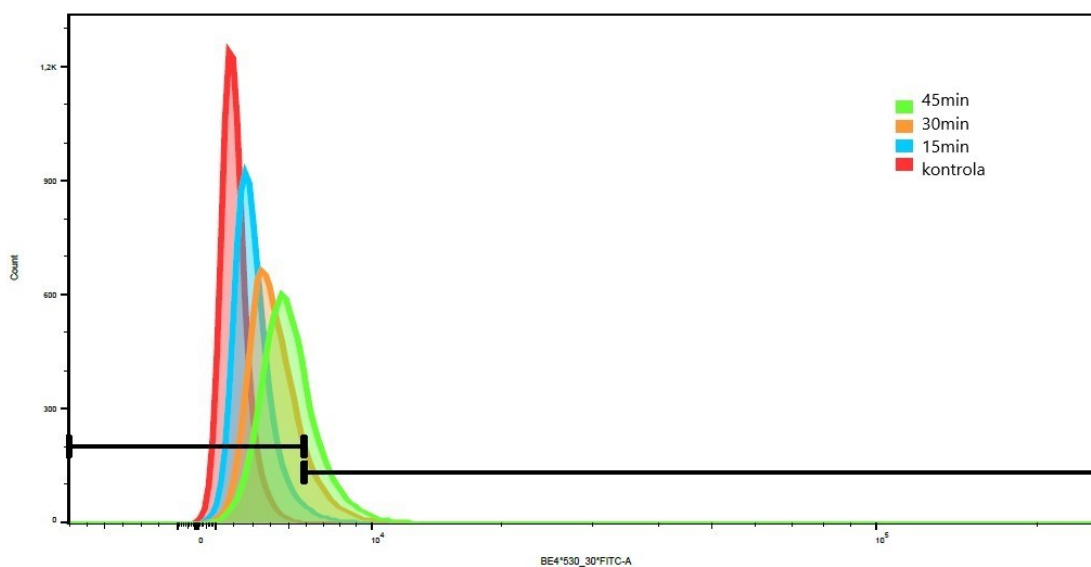
Metodou kompetitivní inhibice glykolýzy analogem glukózy 2-NBDG byly zjištěny rozdíly mezi metabolismem buněčné linie A431 a HaCaT. Procentuální vyjádření pozitivních událostí mezi buněčnou linií A431 a HaCaT je vyjádřeno na grafu č. 59. Zatímco po 15 min vykazovaly buňky A431 na FACSu 20 % pozitivních událostí na 2-NBDG, buňky HaCaT této hodnoty dosáhly až po 45 min. Po 45 min dlouhé inkubaci bylo 73 % buněk vyhodnoceno pozitivně na 2-NBDG u A431 v kontrastu s 22 % u HaCaT. Grafické znázornění počtu pozitivních událostí pomocí histogramů v různých časech je zobrazeno na grafu č. 60 pro buňky linie A431 a na grafu č. 61 pro buňky linie HaCaT. Toto zjištění silně podporuje fakt, že buňky linie A431 keratinocytů pocházející z epidermální vrstvy kůže pacienta s rakovinou kůže preferenčně využívají glykolýzu oproti jiným způsobům produkce ATP.



Graf č. 59: Procentuální vyjádření pozitivních událostí detekovaných pomocí FACSu po inkubaci buněk A431 s 2-NBDG v rozdílných časech. Prezentované hodnoty jsou výsledkem tří nezávislých měření. Chybová úsečka představuje směrodatnou odchylku.



Graf č. 60: Překryv histogramů po inkubaci buněk A431 s 2-NBDG v časech 45 min (zeleně), 30 min (oranžově), 15 min (modře) a nebarvená kontrola (červeně).



Graf č. 61: Překryv histogramů po inkubaci buněk HaCaT s 2-NBDG v časech 45 min (zeleně), 30 min (oranžově), 15 min (modře) a nebarvená kontrola (červeně).

Metabolismus buněčné linie A431 a HaCat byl porovnán na úrovni spotřeby analogu glukózy v narůstajícím čase metodou průtokové cytometrie. Bylo pozorováno vyšší procento pozitivních buněk na 2-NBDG v každém časovém intervalu, než je tomu u buněk linie HaCaT, jak je znázorněno v tabulce č. 11.

	2-DG %			
	ctrl	15 min	30 min	45 min
A431	1	20	53	73
HaCaT	0	3	14	22

Tab. č. 11: Procentuální vyjádření pozitivních buněk linie A431 a HaCaT na 2-NBDG v konkrétních časových intervalech.

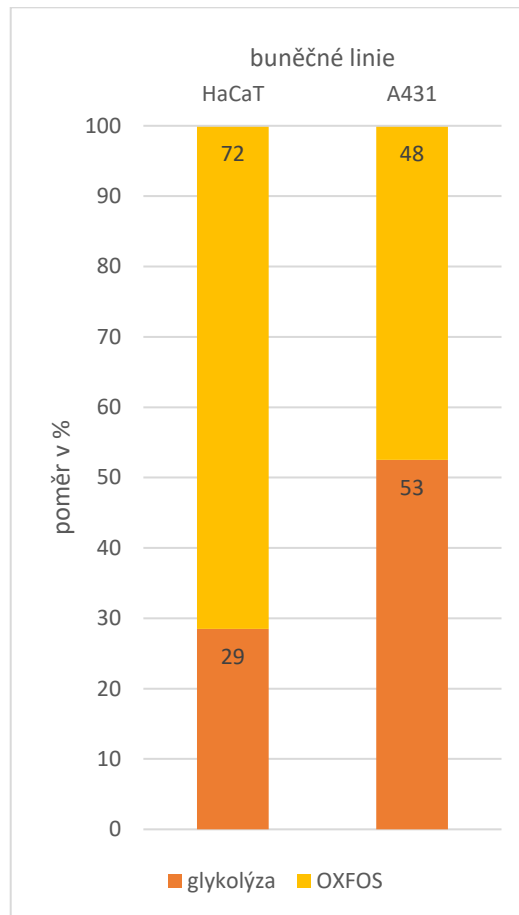
## 5.10 Měření buněčného metabolismu metodou SeaHorse

SeaHorse je metoda pro charakterizaci buněčného metabolismu v reálném čase (zejména zastoupení oxidativní fosforylace – OXFOS a glykolýzy v produkci adenosintrifosfátu - ATP). Jak bylo uvedeno v literární části, metabolismus rakovinných a zdravých buněk se liší na několika úrovních. Zdravé buňky získávají ATP prostřednictvím vyváženého poměru mezi glykolýzou a oxidační fosforylací. Buňky upřednostňující glykolýzu produkují ve zvýšené míře vodíkové protony vedoucí k extracelulárnímu okyselování (extracellular acidification rate, ECAR), tím se fenotypově podobají rakovinným buňkám. U zdravých buněk je rovnováha v produkci ATP zajištěna spotřebou kyslíku při oxidační fosforylaci (oxygen consumption rate, OCR) v mitochondriích. Poměr zastoupení těchto dvou metabolických drah vyjadřuje metabolický fenotyp buňky.

Mitochondriální dýchání charakterizované hodnotou spotřeby kyslíku (OCR) je zjištěno pomocí tří konkrétních modulátorů pro buněčné dýchání. Identickou metodou je zjištěna hodnota ECAR, tedy extracelulární okyselování, zastupující indikátor glykolýzy (nebo je zejména produktem/výsledkem glykolýzy).

Jelikož je z předchozí části patrné, že buňky linie A431 mají v čase vyšší spotřebu analogu glukózy bylo žádoucí dále určit, v jakém zastoupení hraje v buněčném metabolismu roli. Pro měření preferovaného buněčného metabolismu buněk byly opět použity buňky linie A431 a HaCaT. Výsledkem je preferovaný metabolismus v produkci ATP a předpokládané rozdíly v zastoupení glykolýzy a OXFOS v produkci ATP. Pokud byl proveden pouze dvakrát z důvodu časově omezeného zapůjčení analyzátoru The Agilent SeaHorse XFp. Buněčná linie HaCaT vykazovala zastoupení glykolýzy pouze v 28,5 % oproti OXFOS, která dosáhla hodnoty 71,5 %, znázorněno na grafu č. 62. U buněčné linie A431 byla hodnota zastoupení glykolýzy na celkové produkci ATP

stanovena na 52,5 %, hodnota OXFOS dosahovala v tomto případě pouze 47,5 % (graf č. 62). Tyto rozdílné poměry podporují tvrzení, že metabolismus buněčné linie A431, pocházející z epidermální vrstvy kůže pacienta s rakovinou kůže, vykazuje fenotypové znaky rakovinné buňky.



Graf č. 62: Charakterizace buněčného metabolismu metodou SeaHorse. Poměr zastoupení glykolýzy (oranžově) a OXFOS (žlutě) v produkci ATP v metabolismu buněčné linie HaCat a A431. Pokud byl proveden dvakrát z důvodu časově omezeného zapůjčení analyzátoru (Agilent SeaHorse XFp, Real Time ATP Rate Assay kit). Prezentovaná data jsou průměrem dvou měření.

## 6 Diskuze

Cílem této studie bylo charakterizovat nově vyvinuté sondy (fluorescenční křemíkové nanočástice) v buněčných systémech. Jejich charakterizace byla zaměřena na sledování jejich pH závislé fluorescence. Nově vyvinuté nanočástice byly proto konjugovány s dvěma fluorofory. K jejich buněčné lokalizaci by měl sloužit na pH nezávislý Rhodamin B zářící červeně. Druhým fluoroforem byl FITC, zářící zeleně v závislosti na pH v rozmezí hodnot 5-7,5.

Předchozí experimenty provedené před zadáním této diplomové práce s nanočásticemi stejného typu poukázaly na jejich výskyt uvnitř živých buněk. Předpokladem této diplomové práce bylo tedy sledovat fluorescenci nanočástic uvnitř buněk, lokalizovat tyto SiNP uvnitř buněk pomocí fluoroforu Rhodamin B a současně detekovat na pH závislou fluorescenci FITC. Na základě fluorescence FITC by poté bylo možné analýzou obrazu nebo měřením na spektrofotometru vypočítat intracelulární pH. Výsledné hodnoty pH by se měly v souladu s literaturou lišit, porovnáme-li zdravou a rakovinnou buňku. Intracelulární pH rakovinné buňky by mělo dosahovat lehce zásaditých hodnot, v důsledku okyselování extracelulárního prostoru, zatímco pH uvnitř zdravé buňky zůstává okolo pH neutrální hodnoty 7,2 (White et al. 2017b). Studium pH závislé fluorescence křemíkových nanočástic v rozdílných buněčných liniích mělo poukázat na potenciál těchto nanočástic detekovat intracelulární pH ve zdravé a rakovinné buňce. Pokud by se tato schopnost prokázala, bylo by možné uvažovat o jejich případném využití v diagnostice.

Za tímto účelem byly vybrány dvě buněčné linie keratinocytů. Linie HaCaT pocházela z epidermální vrstvy kůže zdravého pacienta, zatímco buněčná linie A431 byla z epidermální vrstvy kůže pacienta s rakovinou kůže. Tyto buněčné linie zastupovaly model zdravé a rakovinné buňky keratinocytu. Buněčná linie lidských fibroblastů NHDF byla vybrána z důvodu velikosti jednotlivých buněk, tedy k snadné identifikaci buněčných struktur. Možný výskyt nanočástic byl měl být tedy lépe pozorovatelný.

V rámci charakterizace použitých buněčných linií byla popsána dynamika růstu a životaschopnost buněk linie NHDF, HaCaT, A431. Nejdynamičtější rozrůstající se populace na základě stanovení doby zdvojení (doubling time) byla buněčná linie HaCaT, poté A431 a nejpomaleji rostla buněčná linie NHDF. Doubling time byl

vypočítán z počtu buněk ve 3 časových intervalech (4, 24 a 48 h). Ve všech případech se jedná o adherentní buňky, tudíž počet adherentních buněk po 4 hod inkubace byl závislý na tom, jak rychle jsou schopné si dané buňky přisednout. Je možné, že v případě HaCaT všechny buňky ještě nestačily přisednout k podkladu, a tudíž to zásadním způsobem mohlo ovlivnit počáteční počet buněk, ze kterého vycházel výpočet doubling time. Obdobně nízký doubling time buněčné linie HaCaT byl ale také popsán (pavez Lorie et al. 2020), zatímco kolegyně v laboratoři naměřila tento čas delší (ústní sdělení, nepublikovaná data). Při měření životaschopnosti buněk linie A431 a HaCaT vysazených v různých koncentracích pomocí determinace aktivity buněčných dehydrogenáz (MTS test) dosahovala naopak buněčná linie A431 zřetelně vyšších hodnot než buněčná linie HaCaT. Zvýšené hodnoty MTS testu u buněčné linie A431 jsou v souladu s faktem, že se jedná o buněčnou linii z pacienta s rakovinnou kůží.

Buňky linie NHDF byly charakterizovány pouze zobrazením buněčných struktur, jelikož byly používány zejména pro mikroskopickou experimentální část.

Po osvojení práce s buněčnými liniemi a jejich charakterizací bylo možné přistoupit k pokusům s nanočásticemi. Po každé dodávce nové šarže nanočástic byly provedeny testy cytotoxicity. Cílem bylo zjistit nejvyšší možnou koncentraci nanočástic, kterou by bylo možné použít pro další experimenty, aniž by buňky významně nepoškodila. Po zjištění, že ani nejvyšší aplikované koncentrace významně neovlivňovaly životaschopnost buněk, mohly být nanočástice vizualizovány s živými buňkami na fluorescenčním mikroskopu.

Již od podzimu 2018 se bohužel vyskytovaly komplikace vyplývající z přípravy vzorků nanočástic na VŠCHT, jež nesplňovaly potřebné vlastnosti jako nanočástice připravené předchozí diplomantkou. V průběhu dvou let byly dodány vzorky nanočástic celkem šesti šarží (tab. č. 2 a č. 10) jež bylo nutné všechny na začátku testovat na možnou cytotoxicitu a poté ověřit jejich funkčnost zobrazením na fluorescenčním mikroskopu. Poslední šarže F z června 2020 již byla sterilní a oba fluorofory byly konjugovány s nanočásticí a bylo tedy možné přistoupit k dalším experimentům.

Křemíkové nanočástice ze šarže F byly dvojího typu. První typ F-RF byl konjugován s fluorofory Rho B a FITC, druhý typ F-R byl konjugován pouze s fluoforem Rho B, oba vzorky byly dodané v metanolu. Nanočástice této šarže byly sférického tvaru a měly v průměru 14,2 nm. Kvůli kontaminaci v zásobním vodném

roztoku nanočástic šarže E byly další nanočástice připravené do metanolu (šarže F). Jelikož měly nanočástice tendenci se shlukovat, byly před každým experimentem sonikovány 45 minut v ledové lázni. Jako kompromis pro zachování fyziologických podmínek a zamezení přílišného shlukování nanočástic přítomností sérových bílkovin byly nanočástice ředěny do 5 % inaktivovaného FBS v kultivačním médiu. Takto připravené nanočástice byly použity do následujících experimentů.

Cytotoxické testy prokázaly, že ani nejvyšší použité koncentrace obou typů nanočástic šarže F významně neovlivňují životaschopnost buněk linie A431, avšak se zvyšující se koncentrací nanočástic (typu F-R a F-RF) se signifikantně životaschopnost buněk snižovala. U linie HaCaT byl pozorován opačný trend, buňky vykazovaly vyšší životaschopnost s narůstající koncentrací nanočástic, což bylo signifikantně potvrzeno u nanočástic typu F-R. Z toho lze usuzovat na stimulační účinek tohoto typu nanočástic. Ten byl sledován i u nanočástic ze stříbra, kde nízké dávky potenciálně toxických agens stimulovaly buněčnou proliferaci a tento jev je obecně znám jako hormeze (Kawata et al. 2009). Po normalizaci hodnot na počet buněk bylo zjištěno, že ani nejvyšší použitá koncentrace (100 µg/ml) nanočástic typů F-R a F-RF nezpůsobila pokles životaschopnosti buněk A431 pod 75 %, což je udávaná hladina cytotoxicity (Flahaut et al. 2006). U typu nanočástic F-R byla pozorována klesající životaschopnost se zvyšující se koncentrací nanočástic, bohužel vzhledem k velikosti odchylek se nepodařilo prokázat signifikantní rozdíl. U typu nanočástic F-RF byl pozorován signifikantní pokles životaschopnosti buněk A431 oproti neopůsobené kontrole při nejvyšší aplikované koncentraci nanočástic. U buněčné linie HaCaT byl naopak pozorován signifikantní stimulační vliv nanočástic typu F-R v nejvyšší použité koncentraci oproti neopůsobené kontrole. Tyto výsledky jsou v souladu s dříve pozorovanou biokompatibilitou křemíkových nanočástic. Takto byly například popsány křemíkové nanočástice syntetizované pro obdobný účel (měření pH uvnitř lysozomů v živých buňkách) (Chu et al. 2016).

Vizualizace nanočástic fluorescenčním mikroskopem odhalovala řadu komplikací vycházejících z jejich přípravy. Z nanočástic šarže A, B, C, D se odděloval Rhodamin B od nanočástice a vnikal samovolně do buněk. U šarže A a B byl pozorován Rhodamin B uvnitř buněk. Po centrifugaci vzorku C zůstal zřejmě Rhodamin B v supernatantu. Po přidání tohoto supernatantu k buňkám bylo možné posléze sledovat Rhodamin B uvnitř buňky, jak tomu bylo i u předchozích šarží nanočástic. Navíc, u

šarže D byla potvrzena lokalizace Rhodaminu B v mitochondriích. Nanočástice konjugována s FITC zůstávala v těchto případech vždy mimo buňku. Nanočástice měly tendenci tvořit shluky, které byly lokalizovány maximálně na povrchu buněčné membrány. Při pozorování nanočástic šarže E ve vzorku s živými buňkami byl pozorován pohyb, jehož původce byl agarovým testem potvrzen jako kontaminace. Vzorky A-E byly totiž připravované v chemických laboratořích na stole a pouze do destilované vody. Z toho důvodu bylo námi navrženo připravit nanočástice do metanolu, který sám o sobě působí pozitivně na sterilitu vzorku. V tabulce č. 10, jež je součástí Výsledků popisující vizualizaci SiNP fluorescenčním mikroskopem Olympus, je seznam šarží dodaných nanočástic a jejich stručná charakterizace.

Poslední šarže F (z června 2020) již požadavek na sterilitu vzorku a přítomnost obou fluoroforů na nanočástici splňovala. Zobrazením živých buněk A431, HaCaT a NHDF s nanočásticemi byla sledována vyšší míra fluorescence se zvyšující se koncentrací nanočástic. Nanočástice měly ale tendenci se shlukovat v okolí buňky, zejména na jejím povrchu. Fluorescenční mikroskop Olympus byl schopen poskytnout pouze omezené rozlišení, nicméně i tak byly nanočástice pozorovány zejména na buněčné membráně živých buněk.

Následovalo tedy zobrazení buněk A431 a HaCaT s nanočásticemi pomocí konfokální mikroskopie ve vyšším rozlišení. Tato metoda ale vyžaduje fixaci vzorku. K tomu byl použit 4 % roztok glutaraldehydu. Fixací buněk je pak zásadně ovlivněno pH vzorku, tudíž již není možné sledovat pH závislou fluorescenci FITC. Účelem použití této metody bylo zejména lokalizovat nanočástice uvnitř buněk, aby mohly být nanočástice použity jako senzory měřící vnitrobuněčné pH. Pro ujištění, že nanočástice se opravdu nacházejí uvnitř buněk, byla část vzorků během inkubace s nanočásticemi narušena 0,01 % Tritonem, aby se usnadnil průnik SiNP do buněk. Bohužel, ani po opůsobení buněk 0,01 % Tritonu nebyly nanočástice pozorovány v oblasti cytoplazmy, nýbrž pouze na povrchu buňky. Ze snímků jsou patrné nanočástice pouze zanořené do membrány, nikoliv však uvnitř buňky, jak je dobře znatelné z 3D videí.

Naskytla se taktéž možnost zobrazit nanočástice pomocí super-rezoluční mikroskopie STED na Matematicko-fyzikální fakultě pod vedením Ph.D. Fučíkové. Touto zobrazovací metodou bohužel nebylo dosaženo preciznějšího zobrazení. Tato

možnost byla časově omezená, a proto nemohla být provedena dostatečná optimalizace nastavení a popřípadě získ průkaznějších výsledků o lokalizaci NP v rámci buňky.

Ze všech mikroskopických pozorování, ale vyplývá, že se nepodařilo jednoduchou inkubací nanočástic s buňkami dostat nanočástice do buněk. Ani krátkodobé použití Tritonu neusnadnilo jejich vstup do buňky. Z hlediska dalšího využití těchto sond pro detekci vnitrobuněčného pH by bylo žádoucí zvolit jinou techniku vhodnou pro vstup nanočástic do buněk, jak bylo například testováno *in vivo* na modelu prasete (inokulace, rozpustné mikro Jehlové náplasti a povrchová elektroporace nanočástic asociovaných s DNA) (Bernelin-Cottet et al. 2019). Odlišným přístupem by mohla být dodatečná modifikace povrchu nanočástic, například peptidem penetrujícím membránu (TAT peptid fungující jako transaktivátor transkripce viru HIV-1) (Wei et al. 2019).

Za účelem ověření schopnosti nanočástic detekovat vnitrobuněčné pH bylo nutné srovnání se standardně používanou metodou k měření pH. Použitím ratiometrické sondy SNARF-1 byl systém nakalibrován a připraven pro ověření výsledků získaných nanočásticemi. Jeho fluorescence byla snímána ve dvou emisních maximech (580 nm a 640 nm), poměrem intenzit fluorescence v těchto vlnových délkách a jejich kalibrací lze dopočítat hodnoty pH. Kalibrací SNARF-1 za použití Nigericinu byly zjištěny hodnoty pH buněk A431 a HaCaT. Na fluorescenčním destičkovém spektrometru byla hodnota pH po kalibraci pro HaCaT stanovena na 6,7 a pro A431 na 6,3, naznačující kyselější intracelulární prostředí rakovinných A431 buněk. Pokud by byl stanoven pouze poměr I640/I580, pro destičkový spektrometr by byly hodnoty HaCaT 0,340 a pro A431 0,313, což odpovídá kyselějšímu intracelulárnímu prostředí u rakovinných A431 buněk. SNARF-1 byl testován na obou buněčných liniích také metodou průtokové cytometrie. Touto metodou byly naměřeny hodnoty poměru I640/I580 pro HaCaT 1,75 a pro A431 1,66, což naznačuje opět nižší pH u buněk A431 než u buněk HaCaT. Hodnota vyšší než 1 by znamenala zásadité pH, nicméně pro tuto metodu nebyla provedena kalibrace, kterou bychom určily přesné hodnoty. Avšak i touto metodou byl získán výsledek vyjadřující nižší pH uvnitř buněk A431. Porovnáním těchto dvou metod byly tedy získány shodné výsledky ukazující na kyselější prostředí uvnitř A431 než u buněk HaCaT. Nižší intracelulární pH zjištěné u rakovinných buněk je v rozporu s literaturou uvedenou v literárním přehledu (White et al. 2017b), ale na druhé straně odpovídá výsledkům měření intracelulárního pH pomocí dvojitého snímání použitím Ramanovské

spektroskopie a fluorescence (Cao et al. 2015). V této práci porovnávají intracelulární pH také za použití nanočástic v rakovinné a zdravé epiteliální buňce. Touto novou metodou bylo zjištěno neutrální pH ve zdravé buňce v porovnání s mírně kyseljším intracelulárním pH rakovinné buňky.

Je také známo, že k okyselování intracelulárního prostředí nevyhnutelně dochází i při vstupu buňky do apoptózy (Gottlieb et al. 1996). Zároveň, pokud dojde v rakovinné buňce ke snížení pH, proliferace se zpomalí, až nakonec dojde k apoptóze (Lucas et al. 1988; Horvat et al. 1993). V případě A431 buněk byl zjištěn na koncentraci nanočástic závislý pokles jejich životaschopnosti, což by mohlo znamenat nastartování procesu apoptózy a tím způsobit nižší pH uvnitř těchto buněk. Zatímco HaCaT buňky změnou životaschopnosti na přítomnost nanočástic nereagovaly.

Po zjištění nižších hodnot pH u buněčné linie A431 bylo cílem ověřit, zda SNARF-1 není lokalizován v buněčných kompartmentech s typicky odlišným pH (například lysozomy). Pokud by se SNARF-1 vyskytoval v lysozomech u buněčné linie A431 a u buněčné linie HaCaT by byl přítomen v cytoplazmě, nebyl by výsledek pH srovnatelný. Pro lokalizaci SNARF-1 v živé buňce bylo také využito fluorescenčního mikroskopu Olympus. Z důvodu omezeného vybavení mikroskopu byl SNARF-1 pozorovatelný pouze ve svém prvním emisním maximu (580 nm). V tomto kanále bylo tedy možné sledovat pouze jeho lokalizaci v buňce. V rámci jednoho vzorku byl SNARF-1 detekován v cytoplazmě i v útvarech připomínající váčky. Následně byly v obou buněčných liniích značeny lysozomy (Lysotracker MHB207). Ze snímků (viz obr. č. 52, 53, 58) je patrné, že lokalizace SNARF-1 v lysozomech nebyla potvrzena. Pro zobrazení SNARF-1 i v jeho druhém emisním maximu byly vzorky snímány pomocí konfokálního mikroskopu. Opět bylo nutné vzorek před pozorováním zafixovat a nebylo tak možné na základě fluorescence měřit pH. Ze snímků z konfokálního mikroskopu je zřejmé rozptýření SNARF-1 v cytoplazmě fixovaných buněk, kolokalizace se značenými lysozomy opět nebyla potvrzena (obr. č. 58). Lze tedy říct, že lokalizace SNARF-1 byla pozorována v cytoplazmě, tudíž hodnoty naměřených intenzit a posléze jejich poměry pochází ze srovnatelného intracelulárního prostředí.

Jelikož jsou změny v pH rovnováže úzce spjaté s buněčným metabolismem, bylo cílem porovnat rozdíly v metabolismu zdravé linie HaCaT a rakovinné linie A431. Mezi metody charakterizující buněčný metabolismus patřilo měření spotřeby

fluorescenčního analogu glukózy 2-NBDG. Tento kompetitivní inhibitor glykolýzy byl inkubován s buňkami linie A431 a HaCaT za účelem sledovat zvyšující se spotřebu 2-NBDG buňkami v narůstajícím čase. Měřením spotřeby analogu glukózy průtokovou cytometrií bylo vyhodnoceno zřetelně vyšší procento buněk linie A431 pozitivní na 2-NBDG v kratším čase v porovnání s buňkami linie HaCaT (po 45min bylo 73 % buněk A431 pozitivních na 2-NBDG v porovnání s 22 % buněk HaCaT ve stejný čas). Z tohoto výsledku lze nazvat buňky linie A431 jako glykolyticky aktivnější.

Z předchozí části lze usuzovat na rozdílný metabolismus buněk A431 a HaCaT, proto byla dále zařazena metoda SeaHorse pro potvrzení těchto výsledků a získání dalších informací týkajících se buněčného metabolismu v reálném čase. Konkrétně bylo měřeno zastoupení oxidativní fosforylace – OXFOS a glykolýzy v produkci adenosintrifosfátu – ATP. Buňky upřednostňující glykolýzu produkují ve zvýšené míře vodíkové protony vedoucí k extracelulárnímu okyselení (extracellular acidification rate, ECAR), tím se fenotypově podobají rakovinným buňkám. U zdravých buněk je rovnováha v produkci ATP zajištěna spotřebou kyslíku při oxidační fosforylaci (oxygen consumption rate, OCR) v mitochondriích. Poměr zastoupení těchto dvou metabolických drah vyjadřuje metabolický fenotyp buňky.

Mitochondriální dýchání charakterizované hodnotou spotřeby kyslíku (OCR) je zjištěno pomocí tří konkrétních modulátorů pro buněčné dýchání. Identickou metodou je zjištěna hodnota ECAR, tedy extracelulární okyselení, zastupující indikátor glykolýzy (nebo je zejména produktem/výsledkem glykolýzy).

Metodou SeaHorse byly zjištěny rozdíly v zastoupení glykolýzy a OXFOS v produkci ATP buněčné linie A431 a HaCaT. Výsledkem bylo vyšší procentuální zastoupení glykolýzy (52,5 %), na celkové produkci ATP u buněčné linie A431, hodnota OXFOS dosahovala v tomto případě 47,5 %. Buněčná linie HaCaT vykazovala zastoupení glykolýzy pouze v 28,5 % oproti OXFOS, která dosáhla hodnoty 71,5 %. Tyto rozdílné poměry glykolýzy a OXFOS v produkci ATP podporují tvrzení, že metabolismus buněčné linie A431, pocházející z epidermální vrstvy kůže pacienta s rakovinou kůže, vykazuje metabolický fenotyp rakovinné buňky.

Obě metody charakterizující buněčný metabolismus buněk linie A431 a HaCaT poukazovaly na glykolyticky aktivnější buňky linie A431. U metody SeaHorse byla preference glykolýzy dána minimálním procentuálním rozdílem v porovnání se

sledováním spotřeby analogy glukózy. Pokud chceme výsledky z těchto metod srovnávat, je nutné zdůraznit, že v případě metody SeaHorse je měřena hodnota charakterizující extracelulární okyselení, zatímco v případě měření spotřeby analogy glukózy jde o vyhodnocení pozitivních buněk na 2-NBDG v čase (intracelulární detekce). Nadále je důležité zmínit, že buňky během testování na 2-NBDG byly drženy co nejdéle ve fyziologických podmínkách, zatímco metoda SeaHorse vyžadovala mnohem náročnější manipulaci s buňkami, tudíž se to mohlo negativně projevit na jejich stavu. Právě v raných fázích apoptózy byl popsán přechod buněčného metabolismu k oxidativní variantě získávání energie, tento děj je zákonitě doprovázen i změnou pH směrem k nižším hodnotám (Sergeeva et al. 2017; Matsuyama et al. 2000). Fyziologické podmínky, jež se podařilo do jisté míry zachovat při měření 2-NBDG poskytují věrohodnější představu o standardní situaci v buněčném metabolismu. Na rozdíl od toho metoda SeaHorse vyžadovala složitější manipulaci s buňkami, tento stres pro buňky mohl indukovat apoptózu a tím je směřovat k OXFOS. Takto by mohlo být interpretováno nízké procentuální zastoupení glykolýzy u buněk A431 v porovnání s metodou měření 2-NBDG. V souvislosti se zjištěnými výsledky je tedy důležité při charakterizaci metabolismu i měření pH živých buněk zachovat v co největší míře podmínky a prostředí blízké fyziologickému stavu studované buněčné linie.

V rámci této diplomové práce byla charakterizována buněčná linie zdravých lidských keratinocytů a buněčná linie keratinocytů z pocházející z pacienta s rakovinou kůže. Buněčná linie HaCaT a buněčná linie A431 vykazovaly na více úrovních charakteristické rysy chování zdravé a rakovinné linie, znázorněno v tabulce č. 12. Po provedení MTS testu životaschopnosti buněk dosahovaly vyšších hodnot buňky linie A431. Měření spotřeby analogy glukózy průtokovou cytometrií bylo zjištěno, že buňky linie A431 jsou glykolyticky aktivnější, než je tomu u buněčné linie HaCaT. Metodou SeaHorse byl také zjištěn vyšší podíl glykolýzy na produkci ATP u buněčné linie A431, zatímco u buněčné linie HaCaT dominovala oxidativní fosforylace a tím byl potvrzen shodný trend jako u předchozí metody. Na základě výše uvedených zjištění by tyto dobře charakterizované buněčné linie mohly představovat modelové buněčné systémy pro studium a diagnostiku rakoviny. Nicméně v rozporu s literaturou citovanou v literárním přehledu (White et al. 2017a), jsou zjištěné hodnoty pH u buněčných linií A431 a HaCaT vychýlené opačným směrem, tedy nižší intracelulární pH u buněk A431 a vyšší u buněk linie HaCaT. Hodnoty vyšší než 1

získané metodou průtokové cytometrie by poukazovaly na zásadité pH, nicméně pro tuto metodu nebyla provedena kalibrace, pomocí které by bylo možné dopočítat přesné hodnoty. Avšak trend získaných poměrů z fluorescenční mikroskopie i průtokové cytometrie je zachován - intracelulární pH u A431 je mírně kyslejší, což bylo taktéž sledováno ve článku zabývající se pH detekcí nanočásticemi (Cao et al. 2015).

Na závěr by bylo vhodné podotknout, že studované buněčné linie A431 i HaCaT jsou immortalizované, tudíž do jisté míry jsou v tomto směru podobné rakovinným buňkám. Je tedy možné, že se tento fakt mohl projevit stíráním rozdílů mezi námi stanovenou „zdravou“ buňkou keratinocyty a „rakovinnou“ buňkou keratinocyty. Tímto směrem by se mohl ubírat další výzkum a zaměřit se proto na rozdíly v intracelulárním pH a v buněčném metabolismu primárních buněk.

	<b>A431</b>	<b>HaCaT</b>
<b>DT</b>	35,2 h	21,5 h
<b>MTS (absorbance při 20 000 buněk/cm<sup>2</sup>)</b>	0,5674	0,1588
<b>2-NBDG (po 45min)</b>	73 %	22 %
<b>SeaHorse (glykolýza % vs OXFOS %)</b>	53 % vs 48 %	29 % vs 72 %
<b>SNARF-1 kalibrace (pH)</b>	6,3	6,7
<b>SNARF-1 spektroskopie</b>	0,313	0,340
<b>SNARF FACS</b>	1,66	1,75

Tab. č. 12: Charakteristika buněčné linie A431 a HaCaT

## 7 Závěr

V rámci diplomové práce byly charakterizovány nově vyvinuté křemíkové sondy v různých buněčných systémech. Tyto sondy jsou složeny z křemíkové nanočástice, na kterou jsou kovalentně připojeny dva fluorofory (FITC na detekci pH a Rhodamin B na lokalizaci).

Byl popsán vliv nanočástic šarže F (typ F-R a F-RF) na životaschopnost buněk. Ani nejvyšší použitá koncentrace nanočástic významně nesnížila životaschopnost buněčné linie A431 a HaCaT. V případě typu nanočástic F-R v nejvyšší použité koncentraci byl pozorován stimulační vliv na životaschopnost buněk linie HaCaT. Proto pro následné experimenty může být využita nejvyšší testovaná koncentrace.

Sondy typu F-RF byly po interakci s buňkami linie NHDF, A431 a HaCaT vizualizovány a lokalizovány pomocí fluorescenční mikroskopie, konfokální mikroskopie a super-rezoluční mikroskopie. Všemi metodami byly nanočástice lokalizovány na buněčné membráně a ani po narušení membrány nebyly pozorovány uvnitř buňky. Nanočástice měly také tendenci se shlukovat do větších aglomerátů. To znamená, že v současném stavu nebylo možno jich použít jako fluorescenční sondy pro analýzu vnitrobuněčného pH.

Byla zavedena metoda pro detekci intracelulárního pH sondou SNARF-1 v buňkách linie A431 a HaCaT metodou fluorescenční spektroskopie a průtokové cytometrie. Pomocí fluorescenční mikroskopie byla ověřena lokalizace sondy SNARF-1 v cytoplazmě, tudíž lze prohlásit, že detekuje pH v cytoplazmě, a ne v organelách.

Byla provedena charakterizace metabolismu buněčné linie A431 a HaCaT na základě spotřeby fluorescenčně značeného analogu glukózy (2-NBDG) pro glykolýzu v narůstajícím čase. Byl sledován zřetelně vyšší počet buněk A431 pozitivních na 2-NBDG v kratším čase, než tomu bylo u buněčné linie HaCaT poukazující na význam glykolýzy v metabolismu buněk A431.

Byla provedena charakterizace metabolismu buněčné linie A431 a HaCaT metodou SeaHorse. V reálném čase byl měřen podíl OXFOS a glykolýzy na celkové produkci ATP. Bylo zjištěno, že buněčná linie A431 preferenčně využívala glykolýzu (53 %) v porovnání s buněčnou linií HaCaT využívající glykolýzu pouze z 29 %.

## 8 Seznam literatury

ALBANESE, Alexandre and Warren C.W. CHAN, 2011. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. In: *ACS Nano* [online]. B.m.: American Chemical Society, p. 5478–5489 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 19360851. Available at: doi:10.1021/nn2007496

ALBANESE, Alexandre, Carl D. WALKEY, Jonathan B. OLSEN, Hongbo GUO, Andrew EMILI and Warren C.W. CHAN, 2014. Secreted biomolecules alter the biological identity and cellular interactions of nanoparticles. *ACS Nano* [online]. **8**(6), 5515–5526 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 1936086X. Available at: doi:10.1021/nn4061012

ANDRÉS, Vicente, José CARRERAS and Roser CUSSÓ, 1990. Regulation of muscle phosphofructokinase by physiological concentrations of bisphosphorylated hexoses: Effect of alkalization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **172**(1), 328–334. ISSN 10902104. Available at: doi:10.1016/S0006-291X(05)80213-X

ARONSON, P S, 1985. Kinetic Properties of the Plasma Membrane Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> Exchanger. *Annual Review of Physiology* [online]. **47**(1), 545–560 [accessed. 2020-11-01]. ISSN 0066-4278. Available at: doi:10.1146/annurev.ph.47.030185.002553

BARUA, Sutapa, Jin Wook YOO, Poornima KOLHAR, Aditya WAKANKAR, Yatin R. GOKARN and Samir MITRAGOTRI, 2013. Particle shape enhances specificity of antibody-displaying nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **110**(9), 3270–3275 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 00278424. Available at: doi:10.1073/pnas.1216893110

BERNELIN-COTTET, Cindy, Céline URIEN, Joanne MCCAFFREY, Damien COLLINS, Agnese DONADEI, Dennis MCDAID, Virginie JAKOB, Christophe BARNIER-QUER, Nicolas COLLIN, Edwige BOUGUYON, Elise BORDET, Céline BARC, Olivier BOULESTEIX, Jean Jacques LEPLAT, Fany BLANC, Vanessa CONTRERAS, Nicolas BERTHO, Anne C. MOORE and Isabelle SCHWARTZ-CORNIL, 2019. Electroporation of a nanoparticle-associated DNA vaccine induces higher inflammation and immunity compared to its delivery with microneedle patches in pigs. *Journal of Controlled Release* [online]. **308**, 14–28 [accessed. 2021-04-21]. ISSN 18734995. Available at: doi:10.1016/j.jconrel.2019.06.041

BERNFELD, Merton, Martin GÖTTE, Pyong Woo PARK, Ofer REIZES, Marilyn L. FITZGERALD, John LINCECUM and Masahiro ZAKO, 1999. *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans* [online]. 28. November 1999. B.m.: Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA . [accessed. 2021-02-01]. ISSN 00664154. Available at: doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.729

BIGDELI, Arafah, Forough GHASEMI, Samira ABBASI-MOAYED, Maryam SHAHRAJABIAN, Nafiseh FAHIMI-KASHANI, Somayeh JAFARINEJAD, M. Amin FARAHMAND NEJAD and M. Reza HORMOZI-NEZHAD, 2019. *Ratiometric fluorescent nanoprobe for visual detection: Design principles and recent advances - A review* [online]. 4. November 2019. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18734324. Available at: doi:10.1016/j.aca.2019.06.035

BOEDTKJER, E., L. BUNCH and S. F. PEDERSEN, 2012. Physiology, Pharmacology and Pathophysiology of the pH Regulatory Transport Proteins NHE1 and

NBCn1: Similarities, Differences, and Implications for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design* [online]. **18**(10), 1345–1371. ISSN 13816128. Available at: doi:10.2174/138161212799504830

CAO, Yue, Ruo Can QIAN, Da Wei LI and Yi Tao LONG, 2015. Raman/fluorescence dual-sensing and imaging of intracellular pH distribution. *Chemical Communications* [online]. **51**(99), 17584–17587. ISSN 1364548X. Available at: doi:10.1039/c5cc07697h

CASEY, Joseph R and Sergio GRINSTEIN, 2009. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **11** [accessed. 2020-10-22]. Available at: doi:10.1038/nrm2820

CEDERVALL, Tommy, Iseult LYNCH, Stina LINDMAN, Tord BERGGÅRD, Eva THULIN, Hanna NILSSON, Kenneth A. DAWSON and Sara LINSE, 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **104**(7), 2050–2055 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 00278424. Available at: doi:10.1073/pnas.0608582104

CONG, Damin, Wen ZHU, Yejie SHI, Kelli B POINTER, Paul A CLARK, Hongmei SHEN, John S KUO, Shaoshan HU and Dandan SUN, 2014. Upregulation of NHE1 protein expression enables glioblastoma cells to escape TMZ-mediated toxicity via increased H<sup>+</sup> extrusion, cell migration and survival. *Carcinogenesis* [online]. **35**(9), 2014–2024 [accessed. 2020-11-09]. Available at: doi:10.1093/carcin/bgu089

DAMAGHI, Mehdi, Jonathan W. WOJTKOWIAK and Robert J. GILLIES, 2013. *pH sensing and regulation in cancer* [online]. 2013. ISSN 1664042X. Available at: doi:10.3389/fphys.2013.00370

DAVIES, T. A., R. E. FINE, R. J. JOHNSON, C. A. LEVESQUE, W. H. RATHBUN, K. F. SEETOO, S. J. SMITH, G. STROHMEIER, L. VOLICER, L. DELVA and E. R. SIMONS, 1993. Non-age Related Differences in Thrombin Responses by Platelets from Male Patients with Advanced Alzheimer's Disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **194**(1), 537–543. ISSN 10902104. Available at: doi:10.1006/bbrc.1993.1853

DECHANT, Reinhard, Matteo BINDA, Sung Sik LEE, Serge PELET, Joris WINDERICKX and Matthias PETER, 2010. Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *The EMBO Journal* [online]. **29**(15), 2515–2526 [accessed. 2020-12-01]. ISSN 0261-4189. Available at: doi:10.1038/emboj.2010.138

DIETL, Katrin, Kathrin RENNER, Katja DETTMER, Birgit TIMISCHL, Karin EBERHART, Christoph DORN, Claus HELLERBRAND, Michael KASTENBERGER, Leoni A. KUNZ-SCHUGHART, Peter J. OEFNER, Reinhard ANDREESSEN, Eva GOTTFRIED and Marina P. KREUTZ, 2010. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. *The Journal of Immunology* [online]. **184**(3), 1200–1209 [accessed. 2020-12-01]. ISSN 0022-1767. Available at: doi:10.4049/jimmunol.0902584

ESTRELLA, Veronica, Tingan CHEN, Mark LLOYD, Jonathan WOJTKOWIAK, Heather H CORNNELL, Arig IBRAHIM-HASHIM, Kate BAILEY, Yoganand BALAGURUNATHAN, Jennifer M ROTHBERG, Bonnie F SLOANE, Joseph JOHNSON, Robert A GATENBY and Robert J GILLIES, 2013. Microenvironment and Immunology Acidity Generated by the Tumor

Microenvironment Drives Local Invasion [online]. [accessed. 2021-01-31]. Available at: doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2796

FANTIN, Valeria R., Julie ST-PIERRE and Philip LEDER, 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* [online]. **9**(6), 425–434 [accessed. 2020-12-01]. ISSN 15356108. Available at: doi:10.1016/j.ccr.2006.04.023

FLAHAUT, E., M. C. DURRIEU, M. REMY-ZOLGHADRI, R. BAREILLE and Ch BAQUEY, 2006. Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells. *Carbon* [online]. **44**(6), 1093–1099. ISSN 00086223. Available at: doi:10.1016/j.carbon.2005.11.007

FUSTER, Daniel, Orson W. MOE and Donald W. HILGEMANN, 2008. Steady-state function of the ubiquitous mammalian Na/H exchanger (NHE1) in relation to dimer coupling models with 2Na/2H stoichiometry. *Journal of General Physiology* [online]. **132**(4), 465–480 [accessed. 2020-11-01]. ISSN 00221295. Available at: doi:10.1085/jgp.200810016

GAO, Huajian, Wendong SHI and Lambert B FREUND, 2005. *Mechanics of receptor-mediated endocytosis* [online]. [accessed. 2021-01-31]. Available at: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0503879102

GENG, Yan, Paul DALHAIMER, Shenshen CAI, Richard TSAI, Manorama TEWARI, Tamara MINKO and Dennis E. DISCHER, 2007. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nature Nanotechnology* [online]. **2**(4), 249–255 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 17483395. Available at: doi:10.1038/nnano.2007.70

GOTTLIEB, Roberta A, Judy NORDBERGT, Evan SKOWRONSKIT, Bernard M BABIOR and Ernest BEUTLER, 1996. *Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification Communicated by.*

GRAF, R., M. LÜCK, P. QUELLEC, M. MARCHAND, E. DELLACHERIE, S. HARNISCH, T. BLUNK and R. H. MÜLLER, 2000. ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **18**(3–4), 301–313. ISSN 09277765. Available at: doi:10.1016/S0927-7765(99)00156-3

HAN, Junyan and Kevin BURGESS, 2010. Fluorescent Indicators for Intracellular pH [online]. [accessed. 2020-11-25]. Available at: doi:10.1021/cr900249z

HAVLÍK, Martin, Veronika TALIANOVÁ, Robert KAPLÁNEK, Tomáš BŘÍZA, Bohumil DOLENSKÝ, Jarmila KRÁLOVÁ, Pavel MARTÁSEK and Vladimír KRÁL, 2019. Versatile fluorophores for bioimaging applications:  $\pi$ -expanded naphthalimide derivatives with skeletal and appendage diversity. *Chemical Communications* [online]. **55**(18), 2696–2699. ISSN 1364548X. Available at: doi:10.1039/c8cc09638d

HINTON, Ayana, Souad R SENNOUNE, Sarah BOND, Min FANG, Moshe REUVENI, G Gary SAHAGIAN, Daniel JAY, Raul MARTINEZ-ZAGUILAN and Michael FORGAC, 2009. Function of a Subunit Isoforms of the V-ATPase in pH Homeostasis and in Vitro Invasion of MDA-MB231 Human Breast Cancer Cells \* [online]. [accessed. 2021-01-06]. Available at: doi:10.1074/jbc.M901201200

HORVAT, Branka, Shahram TAHERI and Aida SALIHAGIĆ, 1993. *Tumour*

*cell proliferation is abolished by inhibitors of Na<sup>+</sup> H<sup>+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Cl<sup>-</sup> exchange* [online]. 1993. ISSN 09598049. Available at: doi:10.1016/0959-8049(93)90591-3

CHITHRANI, B. Devika and Warren C.W. CHAN, 2007. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters* [online]. **7**(6), 1542–1550 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 15306984. Available at: doi:10.1021/nl070363y

CHITHRANI, B. Devika, Arezou A. GHAZANI and Warren C.W. CHAN, 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters* [online]. **6**(4), 662–668 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 15306984. Available at: doi:10.1021/nl052396o

CHO, Eun Chul, Jingwei XIE, Patricia A. WURM and Younan XIA, 2009. Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I 2/KI etchant. *Nano Letters* [online]. **9**(3), 1080–1084 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 15306984. Available at: doi:10.1021/nl803487r

CHU, Binbin, Houyu WANG, Bin SONG, Fei PENG, Yuanyuan SU and Yao HE, 2016. Fluorescent and Photostable Silicon Nanoparticles Sensors for Real- Time and Long-Term Intracellular pH Measurement in Live Cells. *Anal. Chem* [online]. **88** [accessed. 2021-04-19]. Available at: doi:10.1021/acs.analchem.6b02488

KAFSHGARI, Morteza, Frances HARDING and Nicolas VOELCKER, 2015. Insights into Cellular Uptake of Nanoparticles. *Current Drug Delivery* [online]. **12**(1), 63–77 [accessed. 2021-01-30]. ISSN 15672018. Available at: doi:10.2174/1567201811666140821110631

KARIMI, Mahdi, Amir GHASEMI, Parham SAHANDI ZANGABAD, Reza RAHIGHI, S. Masoud MOOSAVI BASRI, H. MIRSEKARI, M. AMIRI, Z. SHAFAEI PISHABAD, A. ASLANI, M. BOZORGOMID, D. GHOSH, A. BEYZAVI, A. VASEGHI, A. R. AREF, L. HAGHANI, S. BAHRAMI and Michael R. HAMBLIN, 2016. *Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems* [online]. 7. March 2016. B.m.: Royal Society of Chemistry. [accessed. 2021-01-30]. ISSN 14604744. Available at: doi:10.1039/c5cs00798d

KAWATA, Koji, Masato OSAWA and Satoshi OKABE, 2009. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science and Technology* [online]. **43**(15), 6046–6051. ISSN 0013936X. Available at: doi:10.1021/es900754q

KLYMCHENKO, Andrey S, 2017. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications [online]. [accessed. 2020-12-01]. Available at: doi:10.1021/acs.accounts.6b00517

KOČÁREK, Eduard a Martin PÁNEK. *Klinická cytogenetika I : úvod do klinické cytogenetiky*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 2010. 134 s. ISBN 978-80-246-1880-7.

KUHN, Dagmar A., Dimitri VANHECKE, Benjamin MICHEN, Fabian BLANK, Peter GEHR, Alke PETRI-FINK and Barbara ROTHEN-RUTISHAUSER, 2014. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein Journal of Nanotechnology* [online]. **5**(1), 1625–1636 [accessed. 2021-01-30]. ISSN 21904286. Available at: doi:10.3762/bjnano.5.174

LAGADIC-GOSSMANN, D, L HUC and V LECUREUR, 2004. Alterations of

intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death and Differentiation* [online]. **11**, 953–961 [accessed. 2020-11-09]. Available at: doi:10.1038/sj.cdd.4401466

LE, Anne, Charles R COOPER, Arvin M GOUW, Ramani DINAVAH, Anirban MAITRA, Lorraine M DECK, Robert E ROYER, David L Vander JAGT, Gregg L SEMENZA and Chi V DANG, no date. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression [online]. [accessed. 2020-12-01]. Available at: doi:10.1073/pnas.0914433107

LI, Su and Noah MALMSTADT, 2013. Deformation and poration of lipid bilayer membranes by cationic nanoparticles. *Soft Matter* [online]. **9**(20), 4969–4976 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 1744683X. Available at: doi:10.1039/c3sm27578g

LI, Yang and Ning GU, no date. Thermodynamics of Charged Nanoparticle Adsorption on Charge-Neutral Membranes: A Simulation Study [online]. [accessed. 2021-02-01]. Available at: doi:10.1021/jp904550b

LIBERTI, Maria V. and Jason W. LOCASALE, 2016. *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* [online]. 1. March 2016. B.m.: Elsevier Ltd. [accessed. 2021-01-31]. ISSN 13624326. Available at: doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001

LIU, Zhuang, Weibo CAI, Lina HE, Nozomi NAKAYAMA, Kai CHEN, Xiaoming SUN, Xiaoyuan CHEN, † AND and Hongjie DAI, 2006. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice [online]. [accessed. 2021-02-01]. Available at: doi:10.1038/nnano.2006.170

LUCAS, C. A., R. J. GILLIES, J. E. OLSON, K. A. GIULIANO, R. MARTINEZ and J. M. SNEIDER, 1988. *Intracellular acidification inhibits the proliferative response in BALB/c-3T3 cells* [online]. 1988. ISSN 10974652. Available at: doi:10.1002/jcp.1041360121

LYNCH, Iseult and Kenneth A. DAWSON, 2008. *Protein-nanoparticle interactions* [online]. 1. February 2008. B.m.: Elsevier. ISSN 17480132. Available at: doi:10.1016/S1748-0132(08)70014-8

MATSUYAMA, Shigemi, Juan LLOPIS, Quinn L. DEVERAUX, Roger Y. TSIEN and John C. REED, 2000. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: Early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nature Cell Biology* [online]. **2**(6), 318–325. ISSN 14657392. Available at: doi:10.1038/35014006

MÉNDEZ-ARDOY, Alejandro, Jose J. REINA and Javier MONTENEGRO, 2020. Synthesis and Supramolecular Functional Assemblies of Ratiometric pH Probes. *Chemistry - A European Journal* [online]. **26**(34), 7516–7536. ISSN 15213765. Available at: doi:10.1002/chem.201904834

MICCOLI, Laurent, Stéphane OUDARD, Franck SUREAU, Florence POIRSON, Bernard DUTRILLAUX and Marie France POUPON, 1996. Intracellular pH governs the subcellular distribution of hexokinase in a glioma cell line. *Biochemical Journal* [online]. **313**(3), 957–962 [accessed. 2020-12-01]. ISSN 02646021. Available at: doi:10.1042/bj3130957

MOTYČKOVÁ, Bc. Aneta, 2017. Příprava křemičitých nanočástic s fluorescenčními látkami reagujícími na chemické okolí.

NIIDOME, Takuro, Masato YAMAGATA, Yuri OKAMOTO, Yasuyuki AKIYAMA, Hironobu TAKAHASHI, Takahito KAWANO, Yoshiki KATAYAMA and Yasuro NIIDOME, 2006. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for

in vivo applications. *Journal of Controlled Release* [online]. **114**(3), 343–347. ISSN 01683659. Available at: doi:10.1016/j.jconrel.2006.06.017

PARK, Ji-Ho, Geoffrey VON MALTZAHN, Lianglin ZHANG, Austin M. DERFUS, Dmitri SIMBERG, Todd J. HARRIS, Erkki RUOSLAHTI, Sangeeta N. BHATIA and Michael J. SAILOR, 2009. Systematic Surface Engineering of Magnetic Nanoworms for In vivo Tumor Targeting. *Small* [online]. **5**(6), 694–700 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 16136810. Available at: doi:10.1002/sml.200801789

PARK, Ji-Ho, Geoffrey VON MALTZAHN, Lianglin ZHANG, Michael P. SCHWARTZ, Erkki RUOSLAHTI, Sangeeta N. BHATIA and Michael J. SAILOR, 2008. Magnetic Iron Oxide Nanoworms for Tumor Targeting and Imaging. *Advanced Materials* [online]. **20**(9), 1630–1635 [accessed. 2021-02-01]. ISSN 09359648. Available at: doi:10.1002/adma.200800004

PAVEZ LORIE, elizabeth, Nicola STRICKER, Beata PLITTA-MICHALAK, I-Peng CHEN, Beate VOLKMER, Rüdiger GREINERT, Anna JAUCH, Petra BOUKAMP, Alexander RAPP and Elizabeth PAVEZ LORIE, 2020. Characterisation of the novel spontaneously immortalized and invasively growing human skin keratinocyte line HaSKpw [online]. [accessed. 2021-04-19]. Available at: doi:10.1038/s41598-020-71315-0

PEAK, M., M. AL-HABORI and L. AGIUS, 1992. Regulation of glycogen synthesis and glycolysis by insulin, pH and cell volume. Interactions between swelling and alkalization in mediating the effects of insulin. *Biochemical Journal* [online]. **282**(3), 797–805 [accessed. 2020-12-01]. ISSN 02646021. Available at: doi:10.1042/bj2820797

PERRAULT, Steven D, Carl WALKEY, Travis JENNINGS, Hans C FISCHER and Warren C W CHAN, no date. Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design [online]. [accessed. 2021-02-01]. Available at: doi:10.1021/nl900031y

PUTNEY, Luanna K. and Diane L. BARBER, 2003. Na-H Exchange-dependent Increase in Intracellular pH Times G2/M Entry and Transition. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **278**(45), 44645–44649. ISSN 00219258. Available at: doi:10.1074/jbc.M308099200

PUTNEY, Luanna K. and Diane L. BARBER, 2004. Expression profile of genes regulated by activity of the Na-H exchanger NHE1. *BMC Genomics* [online]. **5**(1), 46 [accessed. 2020-11-09]. ISSN 14712164. Available at: doi:10.1186/1471-2164-5-46

REJMAN, Joanna, Massimo CONESE and Dick HOEKSTRA, 2008. Gene Transfer by Means of Lipo- and Polyplexes: Role of Clathrin and Caveolae-Mediated Endocytosis [online]. [accessed. 2021-01-30]. ISSN 1532-2394. Available at: doi:10.1080/08982100600848819

RESHKIN, Stephan Joel, Maria Raffaella GRECO and Rosa Angela CARDONE, 2014. Role of pH<sub>i</sub> and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **369**(1638), 20130100 [accessed. 2020-11-09]. ISSN 0962-8436. Available at: doi:10.1098/rstb.2013.0100

REZEK, Bohuslav, Marie KRTEK, Egor UKRAINTSEV, Oleg BABCHENKO, Alexander KROMKA, Antonn BRO and Marie KALBACOV, 2011. Diamond as functional material for bioelectronics and biotechnology. *New Perspectives in Biosensors Technology and Applications* [online]. (May 2014). Available

at: doi:10.5772/18848

RINK, T I, R Y TSIEN and T POZZAN, no date. *Cytoplasmic pH and Free Mg<sup>2+</sup> in Lymphocytes* [online]. [accessed. 2020-11-30]. Available at: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/95/1/189/1401089/189.pdf>

RÖNKKÖ, Topi, Liisa PIRJOLA, Leonidas NTZIACHRISTOS, Juha HEIKKILÄ, Panu KARJALAINEN, Risto HILLAMO and Jorma KESKINEN, 2014. Vehicle engines produce exhaust nanoparticles even when not fueled. *Environmental Science and Technology* [online]. **48**(3), 2043–2050. ISSN 0013936X. Available at: doi:10.1021/es405687m

ROOS, Albert and Walter F BORON, 1981. *Intracellular pH*.

SERGEEVA, Tatiana F., Marina V. SHIRMANOVA, Olga A. ZLOBOVSKAYA, Alena I. GAVRINA, Varvara V. DUDENKOVA, Maria M. LUKINA, Konstantin A. LUKYANOV and Elena V. ZAGAYNOVA, 2017. Relationship between intracellular pH, metabolic co-factors and caspase-3 activation in cancer cells during apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* [online]. **1864**(3), 604–611. ISSN 18792596. Available at: doi:10.1016/j.bbamcr.2016.12.022

SHI, Wen, Xiaohua LI and Huimin MA, 2012. A Tunable Ratiometric pH Sensor Based on Carbon Nanodots for the Quantitative Measurement of the Intracellular pH of Whole Cells. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. **51**(26), 6432–6435 [accessed. 2021-04-13]. ISSN 14337851. Available at: doi:10.1002/anie.201202533

ŠPAČKOVÁ, Bc Lucie, Ing PAVEL and D PH, 2019. Multifunkční křemičité nanočástice pro analýzu modelového buněčného prostředí pro klinickou a forenzní analýzu.

TERAI, Takuya and Tetsuo NAGANO, no date. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging [online]. [accessed. 2020-12-01]. Available at: doi:10.1007/s00424-013-1234-z

WEBB, Bradley A., Michael CHIMENTI, Matthew P. JACOBSON and Diane L. BARBER, 2011. *Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression* [online]. September 2011. ISSN 1474175X. Available at: doi:10.1038/nrc3110

WEBB, Bradley A., Farhad FOROUHAR, Fu En SZU, Jayaraman SEETHARAMAN, Liang TONG and Diane L. BARBER, 2015. Structures of human phosphofructokinase-1 and atomic basis of cancer-associated mutations. *Nature* [online]. **523**(7558), 111–114. ISSN 14764687. Available at: doi:10.1038/nature14405

WEI, Yushuang, Tang TANG and Hong-Bo PANG, 2019. Cellular internalization of bystander nanomaterial induced by TAT-nanoparticles and regulated by extracellular cysteine [online]. Available at: doi:10.1038/s41467-019-11631-w

WHITAKER, James E., Richard P. HAUGLAND and Franklyn G. PRENDERGAST, 1991. Spectral and photophysical studies of benzo[c]xanthene dyes: Dual emission pH sensors. *Analytical Biochemistry* [online]. **194**(2), 330–344 [accessed. 2020-12-01]. ISSN 10960309. Available at: doi:10.1016/0003-2697(91)90237-N

WHITE, Katharine A., Bree K. GRILLO-HILL and Diane L. BARBER, 2017a. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. *Journal of Cell Science* [online]. **130**(4), 663–669. ISSN 14779137. Available

at: doi:10.1242/jcs.195297

WHITE, Katharine A, Bree K GRILLO-HILL and Diane L BARBER, 2017b. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance [online]. Available at: doi:10.1242/jcs.195297

YI, Wen, Peter M. CLARK, Daniel E. MASON, Marie C. KEENAN, Collin HILL, William A. GODDARD, Eric C. PETERS, Edward M. DRIGGERS and Linda C. HSIEH-WILSON, 2012. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science* [online]. **337**(6097), 975–980 [accessed. 2020-11-11]. ISSN 10959203. Available at: doi:10.1126/science.1222278

YUAN, Hongyan and Sulin ZHANG, 2010. Effects of particle size and ligand density on the kinetics of receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. *Appl. Phys. Lett* [online]. **96**, 33704 [accessed. 2021-02-01]. Available at: doi:10.1063/1.3293303

ZHAO, Jiacheng and Martina H. STENZEL, 2018. Entry of nanoparticles into cells: The importance of nanoparticle properties. *Polymer Chemistry* [online]. **9**(3), 259–272. ISSN 17599962. Available at: doi:10.1039/c7py01603d