

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2022

Kateřina Ingrová



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

## ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## HODNOCENÍ MITOCHONDRIÁLNÍ PRODUKCE SUPEROXIDŮ INDUKOVANÉ ANTIBIOTIKY U ADHERENTNÍCH BUNĚK

EVALUATION OF ANTIBIOTIC-INDUCED MITOCHONDRIAL SUPEROXIDE PRODUCTION IN ADHERENT CELLS

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Ingrová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Inna Zumberg

BRNO 2022

# Bakalářská práce

bakalářský studijní program **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

**Studentka:** Kateřina Ingrová

**ID:** 219244

**Ročník:** 3

**Akademický rok:** 2021/22

**NÁZEV TÉMATU:**

## **Hodnocení mitochondriální produkce superoxidů indukované antibiotiky u adherentních buněk**

### **POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:**

1) Provedte literární rešerši týkající se role mitochondrií, tvorby ROS (reactive oxygen species) a oxidačního stresu. 2) Navrhněte experiment pro sledování indukované produkce superoxidových radikálů v mitochondriích. 3) Nastudujte kultivaci zvolené adherentní buněčné linie a prakticky ji ověřte v buněčné laboratoři. 4) Navržený experiment otestujte s dostatečným počtem opakování. 5) Provedte sběr mikroskopických dat. Ve vhodném programovém prostředí zpracujte nasbímaná data. 6) Dosažené výsledky důkladně diskutujte.

### **DOPORUČENÁ LITERATURA:**

[1] KALGHATGI, S., SPINA, C., COSTELLO, J., LIESA, M., MORONES-RAMIREZ, J., SLOMOVIC, S., MOLINA, A., SHIRIHAI, O., COLLINS, J. Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. *Science translational medicine*. 2013, 5 (192ra85). ISSN 1946-6242.

[2] GUILLOUZO, A., GUGUEN-GUILLOUZO, C. Antibiotics-induced oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*. 2020, 20–21, s. 23-28. ISSN 2468-2020.

**Termín zadání:** 7.2.2022

**Termín odevzdání:** 27.5.2022

**Vedoucí práce:** Ing. Inna Zumberg

**doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.**  
předseda rady studijního programu

### **UPOZORNĚNÍ:**

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

## **ABSTRAKT**

Teoretická část bakalářské práce obsahuje popis vlivu reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) na oxidační stres u mitochondrií a následky použití antibiotik při kultivaci buněčných linií. Buněčnou linii studovanou v této bakalářské práci je buněčná linie mezenchymálních kmenových buněk (MSCs). V praktické části je popsán postup provedeního experimentu – pasážování, kultivace a barvení buněk. Navržený experiment byl zopakován s dostatečným počtem opakování. Nasnímané snímky konfokálním mikroskopem byly zpracovány v programovacím prostředí MATLAB.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mitochondrie, ROS, Oxidační stres, Antibiotika, MSCs, Kultivace buněk, Konfokální mikroskop

## **ABSTRACT**

The theoretical part of this bachelor's thesis contains a description of the effect of reactive oxygen species on oxidative stress by mitochondria and the consequences of antibiotics use in cell line culturing. The cell line studied in this bachelor's thesis is the mesenchymal stem cells (MSCs). The practical part describes the procedure of the experiment including cell culturing, passaging and cell labeling. The proposed experiment was repeated with sufficient number of repetitions. Finally, confocal microscopy images were processed in the MATLAB programming environment.

## **KEYWORDS**

Mitochondria, ROS, Oxidative stress, Antibiotics, MSCs, Cell cultivation, Confocal microscopy



INGROVÁ, Kateřina. *Hodnocení mitochondriální produkce superoxidů indukované antibiotiky u adherentních buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2022, 71 s. Bakalářská práce. Vedoucí práce: Ing. Inna Zumberg

## Prohlášení autora o původnosti díla

|                                 |                                                                                                |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Jméno a příjmení autora:</b> | Kateřina Ingrová                                                                               |
| <b>VUT ID autora:</b>           | 219244                                                                                         |
| <b>Typ práce:</b>               | Bakalářská práce                                                                               |
| <b>Akademický rok:</b>          | 2021/22                                                                                        |
| <b>Téma závěrečné práce:</b>    | Hodnocení mitochondriální produkce superoxidů indukované antibiotiky u adhe-<br>rentních buněk |

Prohlašuji, že svou závěrečnou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí/ho závěrečné práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno .....  
.....  
podpis autorky\*

---

\*Autor podepisuje pouze v tištěné verzi.

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce paní Ing. Inně Zumberg za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci.

# Obsah

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Úvod</b>                                                                                                           | <b>13</b> |
| <b>1 Mitochondrie</b>                                                                                                 | <b>14</b> |
| 1.1 Stavba . . . . .                                                                                                  | 14        |
| 1.2 Funkce . . . . .                                                                                                  | 15        |
| 1.3 Citrátový cyklus . . . . .                                                                                        | 16        |
| 1.4 Dýchací řetězec . . . . .                                                                                         | 16        |
| 1.5 ATP - oxidační fosforylace . . . . .                                                                              | 18        |
| <b>2 Reaktivní kyslíkové radikály (ROS)</b>                                                                           | <b>19</b> |
| 2.1 Superoxid . . . . .                                                                                               | 21        |
| 2.2 Peroxid vodíku . . . . .                                                                                          | 21        |
| 2.3 Hydroxylový radikál . . . . .                                                                                     | 21        |
| 2.4 Tvorba ROS v mitochondriích . . . . .                                                                             | 22        |
| <b>3 Oxidační stres a antibiotika</b>                                                                                 | <b>23</b> |
| 3.1 Penicilin-streptomycin . . . . .                                                                                  | 23        |
| 3.2 Gentamicin . . . . .                                                                                              | 24        |
| <b>4 Kultivace</b>                                                                                                    | <b>25</b> |
| 4.1 Typy kultivovaných buněk . . . . .                                                                                | 25        |
| 4.1.1 Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) . . . . .                                                                    | 26        |
| 4.2 Kultivační médium . . . . .                                                                                       | 27        |
| 4.3 Podmínky kultivace . . . . .                                                                                      | 28        |
| 4.4 Postup kultivace . . . . .                                                                                        | 28        |
| 4.5 Křivka růstu buněčné kultury . . . . .                                                                            | 29        |
| 4.6 Počítání buněk . . . . .                                                                                          | 30        |
| <b>5 Fluorescenční značení mitochondrií</b>                                                                           | <b>32</b> |
| 5.1 Cell Meter <sup>TM</sup> Fluorimetric Mitochondrial Superoxide Activity Assay<br>Kit Green Fluorescence . . . . . | 33        |
| 5.2 MitoSOX <sup>TM</sup> Red Mitochondrial Superoxide Indicator . . . . .                                            | 34        |
| <b>6 Praktická část</b>                                                                                               | <b>35</b> |
| 6.1 Použité přístroje a pomůcky . . . . .                                                                             | 35        |
| 6.2 Kultivační médium a ostatní roztoky . . . . .                                                                     | 36        |
| 6.3 Kultivace a pasážování buněk . . . . .                                                                            | 36        |
| 6.3.1 Počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky . . . . .                                                               | 38        |

|          |                                                                                                                                             |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.3.2    | Coating pomocí fibronektinu . . . . .                                                                                                       | 38        |
| 6.4      | Barvení buněk pomocí sady Cell Meter <sup>TM</sup> Fluorimetric Mitochondrial<br>Superoxide Activity Assay Kit Green Fluorescence . . . . . | 39        |
| 6.5      | Barvení buněk pomocí MitoSOX <sup>TM</sup> Red Mitochondrial Superoxide<br>Indicator . . . . .                                              | 39        |
| 6.6      | Nastavení měření . . . . .                                                                                                                  | 40        |
| <b>7</b> | <b>Výsledky bakalářské práce</b>                                                                                                            | <b>41</b> |
| <b>8</b> | <b>Zpracování dat</b>                                                                                                                       | <b>47</b> |
| 8.1      | Popis navrženého algoritmu v programovacím prostředí MATLAB . .                                                                             | 47        |
| <b>9</b> | <b>Statistické vyhodnocení dat</b>                                                                                                          | <b>55</b> |
| 9.1      | Hodnocení vlivu obsahu daného antibiotika v kultivačním médiu na<br>mitochondriální produkci superoxidů . . . . .                           | 55        |
| 9.2      | Hodnocení vlivu typu zvoleného antibiotika na mitochondriální pro-<br>dukci superoxidů . . . . .                                            | 60        |
|          | <b>Závěr</b>                                                                                                                                | <b>63</b> |
|          | <b>Literatura</b>                                                                                                                           | <b>65</b> |
|          | <b>Seznam symbolů a zkratk</b>                                                                                                              | <b>70</b> |

# Seznam obrázků

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 | Stavba mitochondrie [4] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                               | 15 |
| 1.2 | Snímek mitochondrie z elektronového mikroskopu [3] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                    | 15 |
| 1.3 | Schéma dýchacího řetězce [9] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                          | 18 |
| 2.1 | Působení ROS na buňku. Upraveno dle [16] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                              | 20 |
| 2.2 | Tvorba ROS při oxidativní fosforylaci v mitochondriích [13] . . . . .                                                                                                                                                                                                                           | 22 |
| 4.1 | Mezenchymální kmenové buňky [33] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                      | 27 |
| 4.2 | Křivka růstu buněčné kultury. Upraveno dle [36] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                       | 30 |
| 4.3 | Bürkerova komůrka [37] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                | 30 |
| 5.1 | Excitační a emisní spektrum barviva MitoROS <sup>TM</sup> 520. Upraveno dle [42] . . . . .                                                                                                                                                                                                      | 33 |
| 5.2 | Excitační a emisní spektrum barviva MitoSOX <sup>TM</sup> Red. Upraveno dle [43] . . . . .                                                                                                                                                                                                      | 34 |
| 7.1 | Srovnání kontrolní a experimentální misky s penicilinem-streptomycinem                                                                                                                                                                                                                          | 41 |
| 7.2 | Srovnání kontrolní a experimentální misky s gentamicinem . . . . .                                                                                                                                                                                                                              | 42 |
| 7.3 | Ukázka odlepování MSCs ze dna misky . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                   | 42 |
| 7.4 | Nasnímané snímky prvního experimentu s penicilinem-streptomycinem (vlevo) a gentamicinem (vpravo): (A) kontrolní miska, (B) miska s doporučeným obsahem antibiotika, (C) miska s dvojnásobným obsahem antibiotika . . . . .                                                                     | 44 |
| 7.5 | Nasnímané snímky prvního experimentu s penicilinem-streptomycinem (vlevo) a gentamicinem (vpravo): (A) kontrolní miska, (B) miska s doporučeným obsahem antibiotika, (C) miska s dvojnásobným obsahem antibiotika, zvětšeno 100x . . . . .                                                      | 45 |
| 8.1 | Schéma navrženého algoritmu v programovacím prostředí MATLAB .                                                                                                                                                                                                                                  | 47 |
| 9.1 | Krabicový graf intenzity fluorescence na pixel prvního experimentu: (1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika . . . . . | 57 |
| 9.2 | Post-hoc test prvního experimentu s penicilinem-streptomycinem: (1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika . . . . .     | 57 |

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9.3 | Krabicový graf intenzity fluorescence na pixel druhého experimentu:<br>(1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika . . . . . | 58 |
| 9.4 | Post-hoc test druhého experimentu s penicilinem-streptomycinem: (1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika . . . . .        | 58 |
| 9.5 | Krabicový graf intenzity fluorescence na pixel třetího experimentu:<br>(1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika . . . . . | 59 |
| 9.6 | Post-hoc test třetího experimentu s penicilinem-streptomycinem: (1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika . . . . .        | 59 |

# Seznam tabulek

|     |                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8.1 | 1. měření pro antibiotikum penicilin-streptomycin . . . . .                                                                                                                                                           | 49 |
| 8.2 | 1. měření pro antibiotikum gentamicin . . . . .                                                                                                                                                                       | 50 |
| 8.3 | 2. měření pro antibiotikum penicilin-streptomycin . . . . .                                                                                                                                                           | 51 |
| 8.4 | 2. měření pro antibiotikum gentamicin . . . . .                                                                                                                                                                       | 52 |
| 8.5 | 3. měření pro antibiotikum penicilin-streptomycin . . . . .                                                                                                                                                           | 53 |
| 8.6 | 3. měření pro antibiotikum gentamicin . . . . .                                                                                                                                                                       | 54 |
| 9.1 | Tabulka výsledných p-hodnot vícevýběrového testu, použitých testů,<br>výsledných p-hodnot zvolených testů a platných hypotéz u jednotli-<br>vých měření první části statistické analýzy . . . . .                     | 56 |
| 9.2 | Tabulka p-hodnot Shapirova-Wilkova testu pro penicilin-streptomycin<br>a gentamicin a p-hodnot F-testu k ověření předpokladů použití para-<br>metrického nepárového t-testu druhé části statistické analýzy . . . . . | 61 |
| 9.3 | Tabulka použitých testů, výsledných p-hodnot zvolených testů a plat-<br>ných hypotéz druhé části statistické analýzy . . . . .                                                                                        | 62 |



# Úvod

Mitochondrie jsou malé buněčné útvary s řadou důležitých funkcí. Mezi ty nejdůležitější patří produkce energie ve formě ATP, účast na buněčném dýchání, apoptóze, ukládání vápníku a vliv při buněčném stárnutí. Jsou hlavním zdrojem reaktivních kyslíkových radikálů a zároveň jejich cílovým místem.

V mitochondriálním dýchacím řetězci vznikají reaktivní kyslíkové radikály především na komplexu I a III. Při nadměrné produkci reaktivních kyslíkových radikálů buňka trpí oxidačním stresem, dochází k jejímu poškození a případně až k buněčné smrti. Poškození DNA oxidačním stresem se pojí s řadou chorob a onemocnění. Nízké hladiny reaktivních forem kyslíku jsou ale prospěšné například k zneškodnění virů a nádorových buněk.

Nadměrné množství reaktivních kyslíkových radikálů způsobují také mnohá antibiotika. Rozlišujeme dva základní druhy antibiotik — baktericidní a bakteriostatická. Oba dva druhy cílí na mitochondrie, ale mitochondriální dysfunkci vyvolávají pouze baktericidní. Antibiotika, zejména penicilin-streptomycin, se přidávají do kultivačních médií především k ničení a blokování růstu bakterií.

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jak mitochondrie mezenchymálních kmenových buněk reagují na zvýšené množství antibiotik při kultivaci.

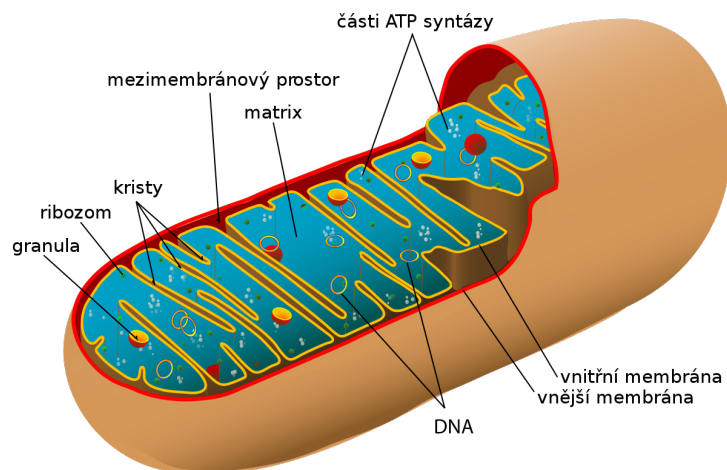
# 1 Mitochondrie

Název mitochondrie vznikl spojením dvou řeckých slov „mitos“ (vlákno) a „chondro“ (zrno). Mitochondrie podle endosymbiotické teorie vznikly z volně žijících aerobních bakterií pomocí endocytózy v eukaryotických hostitelských buňkách před miliony lety. Jedná se malé organely s velikostí 3–4  $\mu\text{m}$  a průměrem 1  $\mu\text{m}$ , které tvoří trubicovitou síť. Jejich tvar a rozměry jsou poměrně variabilní. Jsou obsaženy ve většině eukaryotických buněk. Považují se za energetická a dýchací centra v buňce. Jejich počet se liší v závislosti na druhu buňky. Největší množství mitochondrií mají buňky, které potřebují velké množství energie. Jedná se například o buňky srdeční svaloviny a nervové buňky. Naopak červené krvinky nemají mitochondrie vůbec. [1] [2]

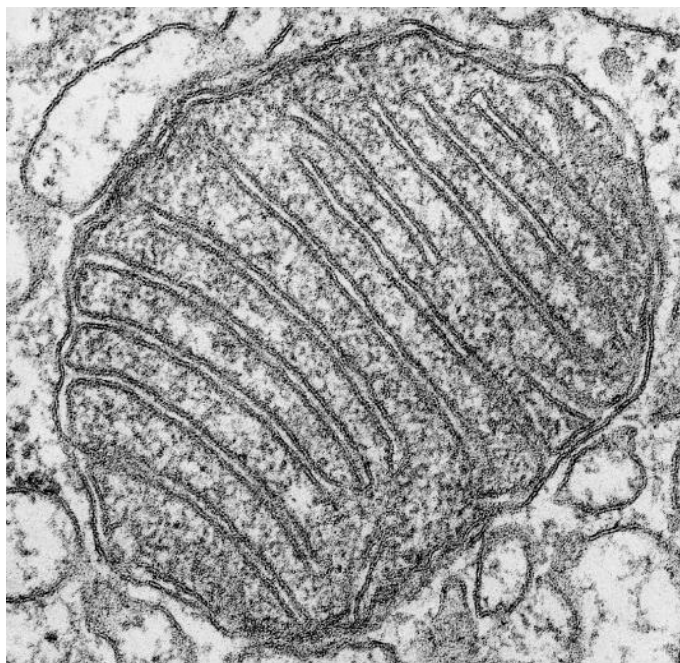
## 1.1 Stavba

Podrobný morfologický popis mitochondrií byl možný až s objevením elektronového mikroskopu. Pomocí něj byla objevena dvojité membrány a kristy, které jsou viditelné na snímku z elektronového mikroskopu na Obr. 1.2. [1]

Jejich stěna je tvořena dvěma vrstvami fosfolipidové membrány – vnější a vnitřní. Každá z nich má jinou roli. Vnější membrána je volně propustná pro malé molekuly. Větší molekuly jako jsou bílkoviny musí být transportovány do mezimembránového prostoru mitochondrie pomocí enzymatického TOM komplexu. Vnější membrána obsahuje proteiny zvané poriny a nachází se v ní řada enzymů s různou funkcí. Díky pórům nenajdeme na vnější membráně žádný potenciál. Vnitřní membrána obsahuje proteiny se třemi funkcemi – proteiny s účastí oxidačních reakcí transportu elektronů, ATP–syntázu a transportní proteiny. Vnitřní membrána neobsahuje poriny jako ta vnější a stává se tak pro řadu molekul nepropustná. Molekuly tedy procházejí membránou pomocí selektivních transportních přenašečů. Obsahuje komplex TIM umožňující přenos molekul skrze ni do mezimembránového prostoru. Na vnitřní membráně se díky selektivitě vytváří membránový potenciál. Prostor mezi oběma membránami se označuje jako mezimembránový prostor. Další částí mitochondrie je matrix. Jedná se o hustou hmotu bohatou na bílkoviny obklopenou vnitřní membránou. V matrix dochází k replikaci DNA, transkripci, biosyntéze proteinů a enzymatickým reakcím. Vnitřní membrána je zprohýbána v kristy, které slouží ke zvětšení povrchu vnitřní membrány a zasahují hluboko do matrix. Membrány krist obsahují komplexy elektronového transportního řetězce a probíhá na nich syntéza ATP. V tkáních s vysokou spotřebou energie jsou kristy v těsné blízkosti vedle sebe a zabírají většinu mitochondriálního objemu. [2] [3]



Obr. 1.1: Stavba mitochondrie [4]



Obr. 1.2: Snímek mitochondrie z elektronového mikroskopu [3]

## 1.2 Funkce

Mezi jednu z nejdůležitějších funkcí mitochondrií patří tvorba ATP, která vzniká při buněčném dýchání. K tvorbě ATP používají volnou energii z oxidace metabolických látek kyslíkem. Mitochondrie přeměňují chemickou energii z jídla na energii elektrickou, kterou buňka následně využívá. [2]

Mitochondrie hrají roli i při apoptóze (buněčné smrti), kde pomáhají rozhodovat jaké buňky budou zničeny. Další vlastností je ukládání iontů vápníku či výroba tepla. Vliv mají i při buněčném dělení a stárnutí. [2]

Představují hlavní zdroj reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Při nesprávném fungování mitochondrií se objevuje nadměrné množství ROS a buňka má nedostatek energie. Reaktivní druhy kyslíku jsou v mitochondriích produkovány jako vedlejší produkt produkce energie. Volné radikály poškozují fosfolipidy v buněčných membránách. Při produkci většího množství ROS se zhoršuje funkčnost mitochondrií, dochází k prohlubování poškození až k zániku buňky. [5]

Mitochondrie jsou unikátní pro svou vlastní genetickou informaci (mtDNA). V důsledku toho je označujeme za orgány semiautonomní. Mitochondriální DNA dědíme výhradně po matce. [6]

### 1.3 Citrátový cyklus

Citrátový cyklus též zvaný jako Krebsův cyklus se odehrává v matrix mitochondrií. Vstupuje do něj acetylkoenzym A (CoA) vznikající v mitochondriích odbouráním mastných kyselin nebo oxidační dekarboxylací pyruvátu. Hlavním smyslem citrátového cyklu je produkce redukovaných kofaktorů NADH a FADH<sub>2</sub>. Tyto redukované kofaktory následně vstupují do dýchacího řetězce, kde oxidací slouží k tvorbě ATP.

Citrátový cyklus začíná kondenzací CoA s oxalacetátem za vzniku citrátu. Dekarboxylací jsou uvolněny dvě molekuly CO<sub>2</sub>. Postupně dochází k dehydrogenaci meziproduktů za vzniku redukovaných kofaktorů 3 NADH a 1 FADH<sub>2</sub>. Ty jsou v dýchacím řetězci oxidovány na 11 molekul ATP. Konečným produktem citrátového cyklu je oxalacetát. Ten je schopen reagovat s dalším CoA a celý cyklus se může opakovat. [7]

### 1.4 Dýchací řetězec

Dýchací řetězec představuje soubor čtyř oxidoredukčních enzymových komplexů umístěných ve vnitřní mitochondriální membráně a dvou pohyblivých přenašečů — ubiquinonu a cytochromu c. Ukončuje energetické odbourávání sacharidů, lipidů a proteinů. Při odbourávání vznikají redukované koenzymy NADH a FADH<sub>2</sub> vstupující do dýchacího řetězce. Elektrony z koenzymů se přenášejí do akceptorů v dýchacím řetězci na elementární kyslík za vzniku vody. Protony z koenzymů a matrix mitochondrií se přenášejí do mezimembránového prostoru, odtud přecházejí zpět do matrix za vzniku ATP. [7] [8]

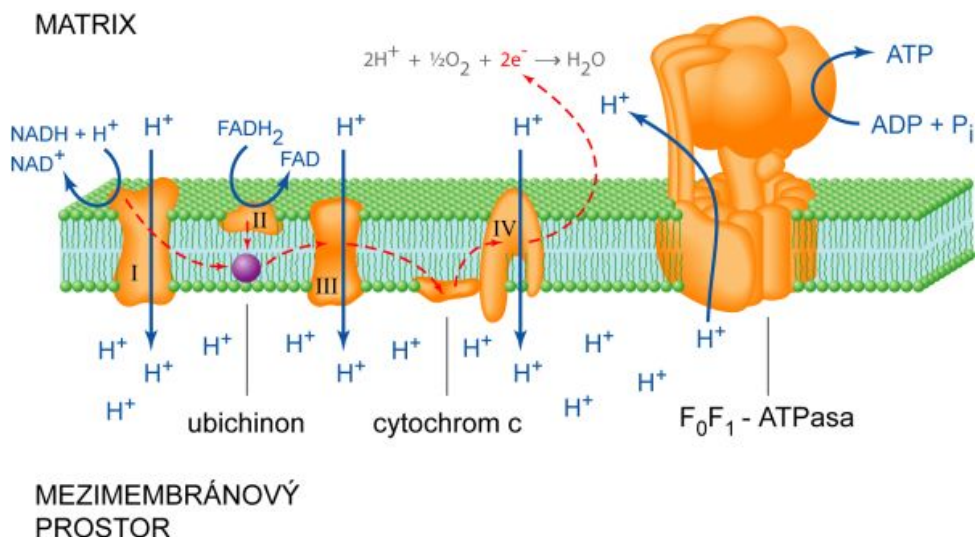
Komplex I též zvaný jako NADH – ubiquinonoxidoreduktasa přenáší elektrony z NADH na koenzym Q (CoQ), kde dochází k redukci na ubiquinol (CoQH<sub>2</sub>). V tomto komplexu najdeme flavinmononukleotid (FMN) a Fe-S klastry, které jsou součástí přenosu elektronů z NADH na CoQ. Transport elektronů na komplexu I začíná

tím, že 2 elektrony a  $H^+$  z NADH přejdou na FMN a vzniká  $NAD^+$  a  $FMNH^-$ . Elektrony z  $FMNH^-$  přechází na CoQ, který se postupně redukuje na  $CoQH_2$  přes ubisemichinon ( $CoQH\cdot$ ). V době navázání elektronu na CoQ dochází i k navázání protonu z matrix. Celkem se přenesou čtyři  $H^+$  z matrix do mezimembránového prostoru.  $CoQH_2$  se uvolní z komplexu I a je nahrazen další molekulou CoQ.[6] [8]

Komplex II též zvaný jako sukcinát–ubichinonoxidoreduktasa přenáší elektrony ze sukcinátu na CoQ. Ten se díky přenosu elektronu redukuje na  $CoQH_2$ . Při vzniku koenzymu  $FADH_2$  se sukcinát oxiduje na fumarát. Tato reakce je součástí citrátového cyklu. V komplexu II se nachází cytochrom b a Fe-S klastry zúčastňující se přenosu elektronů z  $FADH_2$  na CoQ. Transport elektronů na komplexu II začíná tím, že elektrony z  $FADH_2$  přecházejí na CoQ, který je postupně redukován na  $CoQH\cdot$  a poté na  $CoQH_2$ . Redukovaný  $CoQH_2$  je uvolněn z komplexu I a je nahrazen CoQ. CoQ slouží jako přenašeč elektronů z komplexu I a II na komplex III. Komplex II nepřenáší žádné protony, jelikož je pro ně vnitřní mitochondriální membrána nepropustná a dochází na ní k tvorbě protonového gradientu. K přečerpání protonů slouží komplexy I, III a IV. [6] [8]

Komplex III též zvaný jako ubichinol–cytochrom–c–oxidoreduktasa přenáší elektrony z redukovaného CoQ na cytochrom c. Komplex III obsahuje cytochrom b, cytochrom  $c_1$  a Rieskeho Fe-S protein. Cytochrom b váže dva hemy  $b_H$  a  $b_L$ . Transport elektronů komplexem III je nazýván jako Q-cyklus. Dochází zde k přebírání elektronů od  $CoQH_2$ . Dále k uvolňování  $H^+$  z matrix do mezimembránového prostoru. Meziproduktem Q-cyklu je semichinon ( $CoQ\cdot-$ ). Komplex III má dvě vazebná místa  $Q_O$  a  $Q_i$ .  $Q_O$  váže  $CoQH_2$  a  $Q_i$  váže  $CoQ\cdot-$  a CoQ. K uvolnění dvou  $H^+$  do mezimembránového prostoru je přenesen jeden elektron přes Rieskeho Fe-S protein na cytochrom  $c_1$  a vzniká  $CoQ\cdot-$ . Druhý elektron přejde na hem  $b_L$  a redukuje jej na hem  $b_H$ . Vzniklý CoQ je uvolněn z  $Q_O$  a váže se do místa  $Q_i$ . Elektron z hemu  $b_H$  se naváže zpět na CoQ a vzniká  $CoQ\cdot-$ . Tento děj se stále opakuje s jinou molekulou CoQ.[6] [8]

Komplex IV též nazývaný jako cytochrom–c–oxidasa usnadňuje oxidaci čtyř po sobě redukovaných molekul cytochromu c za současné redukce molekuly  $O_2$ . Produktem tohoto komplexu je voda. Komplex IV obsahuje  $Cu_A$  centrum, cytochrom a, binukleární  $a_3$  a  $Cu_B$  centrum. Transport elektronů přes komplex IV začíná navázáním molekuly kyslíku do centra binukleárního. Cytochrom c slouží jako přenašeč elektronů z komplexu III na komplex IV. Elektrony z cytochromu c jdou přes  $Cu_A$  centrum, cytochrom a, binukleární komplex  $a_3$  a  $Cu_B$  centra až na kyslík. Molekula kyslíku se postupně redukuje až na  $O^{2-}$  ionty, které společně s protony z matrix reagují za vzniku dvou molekul vody. [6] [8]



Obr. 1.3: Schéma dýchacího řetězce [9]

## 1.5 ATP - oxidační fosforylace

Při průchodu elektronů dýchacím řetězcem vzniká volná energie, díky které dochází k přemísťování protonů z matrix do mezibuněčného prostoru u komplexů I, III a IV. Koncentrace protonů je v mezimembránovém prostoru větší než v matrix a dochází k vytvoření elektrochemického protonového gradientu. Matrix je sídlem negativního elektrického potenciálu, mezimembránový prostor pozitivního. Výsledný potenciál je využit k syntéze ATP, při které dochází k vzniku ATP z ADP a P. Reakce se urychluje pomocí ATP-syntázy. Protony skrze ni přecházejí z mezimembránového prostoru zpět do matrix. Vzniklá energie slouží k syntéze ATP. K vytvoření jedné molekuly ATP je třeba 3 – 4 protony. Syntéza ATP je možná pouze za přítomnosti kyslíku. [7] [8]

## 2 Reaktivní kyslíkové radikály (ROS)

Reaktivní formy kyslíku jsou vedlejším produktem normálního metabolismu a mají roli v buněčné signalizaci a homeostáze. Patří mezi ně kyslíkové radikály a reaktivní neradikály. Existují různé mechanismy, které buněčnou hladinu ROS redukují. Jejich reaktivní povaha může způsobit poškození buněčných složek, DNA, proteinů a lipidů. Při překročení buněčné antioxidační kapacity může dojít k oxidačnímu stresu. Pleiotropní škodlivé účinky oxidačního stresu lze pozorovat u mnoha chronických stavů. [10]

Chemicky reaktivní molekuly obsahující kyslík se nazývají reaktivní formy kyslíku. Mají zkratku ROS z anglického reactive oxygen species. Přítomnost jednoho nebo více nepárových elektronů ve valenční vrstvě způsobuje reaktivitu. Existují ale i reaktivní neradikálové formy, jako je peroxid vodíku. Reaktivní formy kyslíku jsou ochotné k reakci s mastnými kyselinami, lipidy, aminokyselinami, DNA, proteiny a enzymy. ROS molekuly jsou vysoce nestabilní, a proto se snaží dostat do rovnovážného stavu získáním jiného elektronu ze svého okolí, se kterým by tvořil pár. ROS jsou vytvářeny z různých zdrojů ať už endogenně (únik elektronů z elektrotransportního řetězce a rozpad fagocytů) či exogenně (působení ultrafialového a ionizujícího záření, vysoká koncentrace kyslíku, škodliviny ve vzduchu a kouření). [10] [11] [12]

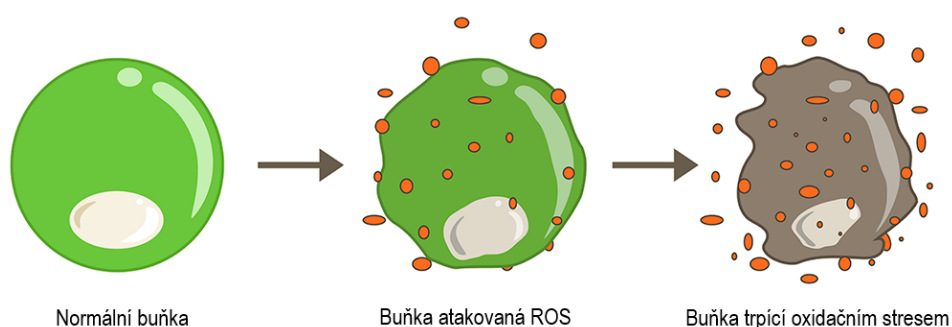
Radikály mohou vznikat několika způsoby. Prvním z nich je homolytické štěpení dvouelektronové vazby mezi dvěma atomy. Každé takto vzniklé částici zůstane jeden elektron ze společné dvouelektronové vazby. Vznikají tedy dva radikály. Radikál může vzniknout také odebráním či přidáním elektronu. Odebráním elektronu neboli oxidací vzniká kationtový radikál  $X - e^- \rightarrow X^+$ . Přidáním elektronu neboli adicí se vytvoří aniontový radikál  $X + e^- \rightarrow X^-$ . Za volný radikál označujeme tedy částici, která má ve vnější vrstvě elektronového obalu alespoň jeden nepárový elektron a je po určitou dobu schopna samostatné existence. Radikály mohou být velmi reaktivní, ale i prakticky nereaktivní. Reaktivita totiž závisí na velikosti a struktuře základního atomu či molekuly. Volné radikály mohou být produkovány patologicky i fyziologicky. Fyziologicky mohou působit prospěšně i škodlivě. [13]

Hlavním zdrojem a zároveň cílovým místem ROS v buňce jsou mitochondrie. Superoxidový radikál vzniká jako vedlejší produkt oxidační fosforylace. Při nadměrné produkci ROS stresory dochází k radiačnímu poškození a nemocem, jejichž následkem vzniká lokální oxidační stres. Ten vzniká i v momentě, kdy množství volných radikálů převažuje nad antioxidanty, což jsou látky chránící biomolekuly před oxidací způsobenou reaktivními formami kyslíku. Antioxidační účinky mohou mít enzymovou (kataláza, superoxiddismutáza) i neenzymovou povahu (glutathion, kyselina askorbová). Konec řetězové reakce tvorby radikálů je ukončen neutralizací volných radikálů antioxidanty. Množství antioxidantů se s rostoucím věkem snižuje. Různé

obránné mechanismy buněk zachycují volné radikály, aby zabránily nebo limitovaly intracelulární poškození a zmírňovali škodlivé účinky ROS. Fyziologická úroveň ROS je nízká kvůli mitochondriální superoxiddismutáze manganu, která převádí superoxidové radikály na peroxid vodíku. Ten je rozkládán na vodu pomocí peroxidáz. Při zvýšení produkci ROS mohou být obranné mechanismy zahlceny a dochází k poškození buněk. Rozsah poškození na molekulární úrovni závisí na řadě faktorů jako je místo produkce ROS, reaktivita cíle či dostupnosti kovových iontů. Poškozená DNA musí být opravena specifickými opravnými mechanismy. Upravené proteiny a lipidy se odstraňují buněčným obratem. Pokud je mitochondriální DNA terčem oxidace, dochází k mutacím, přeskupení a transkripčním chybám. Transkripční chyby narušují mitochondriální složky vedoucí k většímu oxidačnímu stresu a následné případné smrti. Poškození DNA oxidačním stresem se pojí s řadou chorob a onemocnění včetně kardiovaskulárních, neurologických (Alzheimer), aterosklerózy, zánětu, diabetu mellitu, rakovinových a předčasném stárnutí. Naopak produkce ROS je rysem některých žádoucích imunologických reakcí. [10] [13] [15]

ROS mají značnou roli v mnoha fyziologických i patologických procesech. Dnes se odborníci shodují, že nízké hladiny ROS jsou prospěšné k ničení bakterií ve fagocytech, zneškodnění virů a nádorových buněk, oplození vajíčka, signalizaci a usnadňují adaptaci na stres, zatímco vysoké hladiny ROS vyvolávají oxidační stres a jsou škodlivé. Hlavními místy generování ROS v mitochondriích jsou respirační komplexy I a III, kde jako vedlejší produkt vzniká superoxid a hydroxylový radikál. [10] [12]

Kyslíkové radikály poškozují DNA, bílkoviny a tuky. Následkem radikálové oxidace lipidů je poškození receptorových bílkovin LDL částic, což vede k ateroskleróze. Radikálové poškození DNA má za následek poškození bílkovin včetně bílkovin podílejících se na regulaci buněčného cyklu. Takové poškození může vést k maligní transformaci buněk a vzniku nádorového onemocnění. [13]



Obr. 2.1: Působení ROS na buňku. Upraveno dle [16]



## 2.1 Superoxid

Superoxid může být generován ze dvou hlavních zdrojů – mitochondriálního dýchacího řetězce z komplexu I a III či působením NADPH oxidázy. Superoxid může také vzniknout jako meziprodukt činnosti některých enzymů, jako je xanthinoxidáza, cyklooxygenáza a lipoxygenáza. Při běžném fungování biologického systému se uvolňuje enzym superoxiddismutáza udržující jeho koncentraci na optimální úrovni. Vzniká jedoelektronovou redukcí molekulového kyslíku  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ . Ve fagocytujících buňkách, které cíleně produkují superoxid, je vytvářen působením enzymu NADPH oxidázy  $O_2 + NADPH \rightarrow O_2^{\cdot-} + NADPH^+$ . I když superoxid sám o sobě není příliš nebezpečný, nebezpečně se jeví, jelikož z něj mohou vznikat škodlivější formy kyslíku. Dismutací se spontánně přeměňuje na peroxid vodíku  $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ . Superoxid je mnohem méně reaktivní než hydroxylový radikál a neprostupuje biologickými membránami. Spousta biomolekul je na něj ale citlivá. [10] [13] [14]

## 2.2 Peroxid vodíku

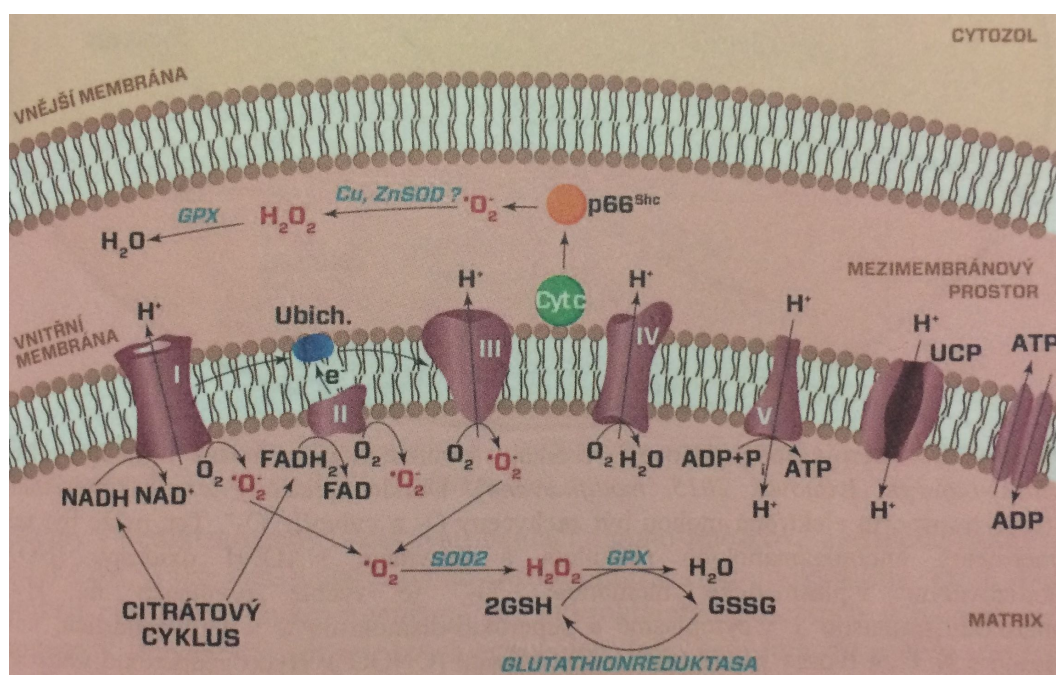
Peroxid vodíku je stabilní reaktivní neradikál vzniklý dvoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku. Je schopný dlouhodobé existence a snadno proniká přes buněčné membrány. Jeho difúze je ale ovlivněna složením membránových lipidů. Peroxid vodíku může též vznikat jako meziprodukt činnosti některých enzymů jako xanthinoxidáza či monoaminoxidáza nebo v mitochondriálním řetězci elektronového řetězce. Peroxid vodíku nepoškozuje jen molekuly v blízkém okolí ale i molekuly vzdálené. Jeho inaktivátorem je glutathionperoxidáza či kataláza. Produkce superoxidu a peroxidu vodíku se s věkem zvyšuje. [13] [14] [17]

## 2.3 Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál vzniká Fentonovou reakcí, má krátkou dobu života a je nesmírně reaktivní v místě svého vzniku. Poškozuje tedy přímo DNA, proteiny a lipidy. Při Fentonově reakci reagují přechodné kovy s peroxidem vodíku za vzniku hydroxylového radikálu  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot} + Fe^{3+}$ . [10] [17]

## 2.4 Tvorba ROS v mitochondriích

Redukované molekuly NADH a  $\text{FADH}_2$  jsou v Krebsově cyklu tvořeny z energetických složek potravy. Přecházejí do dýchacího řetězce, kde se tvoří energeticky bohatá molekula ATP. Do komplexu I přichází NADH a do komplexu II  $\text{FADH}_2$ . V komplexech jsou oxidovány odejmutím vodíku a elektronů, které se později naváží na ubiquinon. Některé elektrony však unikají a reagují s molekulami vody za vzniku superoxidového radikálu. Z komplexu I a II se superoxid uvolní do mitochondriální matrix a z komplexu III se uvolní jak do matrix, tak i do mezimembránového prostoru. Produkce superoxidových radikálů závisí na metabolickém stavu mitochondrií. Superoxidové anionty jsou v mitochondriální matrix rychle dismutovány na peroxid vodíku enzymem MnSOD, v mezimembránovém prostoru pomocí enzymu CuZnSOD. V mitochondriích je peroxid vodíku redukován na vodu pomocí enzymu glutathionperoxidázy či katalázy. Kataláza je ale přítomná pouze v mitochondriích srdce. Glutathionperoxidáza katalyzuje dvouelektronovou redukci peroxidu vodíku a slouží zde jako donor vodíku. [13]



Obr. 2.2: Tvorba ROS při oxidativní fosforylaci v mitochondriích [13]

### 3 Oxidační stres a antibiotika

Mnohá antibiotika způsobují vznik nadměrného množství reaktivních forem kyslíku. Dochází k narušení mitochondriálního řetězce přenosu elektronů, které vede k oxidačnímu poškození. Poškozené mitochondrie jak strukturně, tak funkčně vytvářejí větší produkci ROS. Důsledkem takového poškození je energetická krize, stres a smrt buněk. [18] [19]

Existuje několik tisíc antibiotik, přičemž v medicíně se jich používá pouze sto. Slouží k zabíjení a blokování růstu bakterií. Rozeznáváme dvě skupiny antibiotik – baktericidní a bakteriostatická. Jak baktericidní, tak bakteriostatická antibiotika cílí na mitochondrie, avšak pouze baktericidní vyvolávají mitochondriální dysfunkci a oxidační stres. Mezi nejznámější druhy antibiotik patří  $\beta$ -laktamy (penicilin, cefalosporin), chinolony, aminoglykosidy a makrolidy. Chinolony se zaměřují na bakterie gyrázy a mitochondriální DNA topoizomerázy 2.  $\beta$ -laktamy narušují funkci bakteriální buněčné stěny a aminoglykosidy cílí na bakteriální a mitochondriální ribosomy. [18]

Baktericidní antibiotika využívají vnitřní železo uvolněné z klastru síry železa k tvorbě hydroxylových radikálů zprostředkovaných z Fentonovy reakce. Bakteriostatická antibiotika neprodukují hydroxylové radikály. Baktericidní antibiotika poškozují tkáň uvolňováním mitochondriálních ROS, inhibují zejména aktivitu komplexu I o 16–25 % a komplexu III o 30–40 %. Bakteriostatická antibiotika vykazují inhibiční účinek pouze 5–10 %. Narušení elektronového transportního řetězce vede k snížení mitochondriálního membránového potenciálu, tvorby ATP a celkové metabolické aktivity. Dochází k narušení celkové respirační kapacity buňky. Léčba pomocí schváleného antioxidantu acetylcysteinu úřadem pro kontrolu potravin a léčiv snižuje baktericidní účinek. Baktericidní antibiotikum může být nahrazeno pomocí bakteriostatického antibiotika. [18] [19]

Studie Kalghatgiho a spol. ukázaly, že antibiotika ciprofloxacin, ampicilin a kanamycin, která patří mezi baktericidní antibiotika, indukovala zvýšení produkce ROS, zatímco bakteriostatické antibiotikum tetracyklin nemá na produkci ROS vliv. [19]

#### 3.1 Penicilin-streptomycin

Antibiotika penicilin a streptomycin se používají k prevenci bakteriální kontaminace buněčných kultur díky jejich účinnému kombinovanému působení proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Původně byl penicilin purifikován z houby *Penicillium* a spouští uvolňování enzymů, které mění buněčnou stěnu. Streptomycin byl původně purifikován ze *Streptomyces griseus*. Následkem působení na podjednotku 30S bakteriálního ribozomu dochází k inhibici syntézy proteinů a u citlivých bakterií

k smrti. I přes několik nežádoucích účinků je penicilinový roztok streptomycinu již několik let nejčastěji používané antibiotikum při kultivaci savčích buněk. [20] [21] [22]

Doporučené množství při kultivaci je  $10 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ . Roztok je namíchán tak, aby obsahoval 10 000 jednotek penicilinu a 10 mg streptomycinu  $\cdot \text{ml}^{-1}$ . Při zásaditém pH dochází k rychlému ničení streptomycinu. Penicilin je extrémně nestabilní vůči kyselému i zásaditému pH. Po přidání kultivačního média obsahujícího 3 % FBS aktivita penicilinu okamžitě poklesne alespoň o 30 %. Penicilin ztrácí aktivitu rychleji než streptomycin při všech úrovních pH. Ani jedno z antibiotik nevydrží autoklávování. [20] [21] [22]

## 3.2 Gentamicin

Kvůli svým biologickým a biochemickým vlastnostem je pro použití v tkáňových kulturách výhodnější než penicilin-streptomycin. Je baktericidní pro širokou škálu grampozitivních a gramnegativních bakterií. Proti kvasinkám, houbám a prvokům však baktericidní není. Původně byl purifikován z houby *Micromonospora*. Působení vazbou na podjednotku 30S bakteriálního ribozomu vede k inhibici syntézy proteinů a k smrti u citlivých buněk. [22] [23] [24]

Roztok je připraven smícháním 10 mg gentamicinu a 1 ml deionizované vody. Doporučené množství při kultivaci je  $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ . Při výzkumu bylo zjištěno, že gentamicin je zcela stabilní při všech úrovních pH i při autoklávování, a může být tedy do média přidán ještě před sterilizací. Další výhodou gentamicinu je stabilita vůči širokému rozmezí pH a teploty a nevykazování cytotoxicity. Biologická aktivita u něj po přidání séra neklesá. [22] [23] [24]

## 4 Kultivace

Buněčné kultury patří k základním technikám používaných ve výzkumu a výrobě. Ve výzkumu slouží především jako zdroj materiálu. Řadu buněčných linií lze dobře a snadno kultivovat a získat tak velké množství přesně definovaného a homogenního materiálu. Provádí se na nich řada experimentů, po nichž se buňky zničí. Diskutuje se však o řadě etických problémů. Práce s buněčnými kulturami je nákladná, jelikož laboratoře určené pro práci s buněčnými kulturami musí mít potřebné vybavení, které se musí pravidelně servisovat. Používá se drahý jednorázový spotřební materiál. Je nutné náležité proškolení pracovníků pracujících s buněčnými kulturami, jelikož kultury musí být pěstovány za přesně definovaných podmínek. Důležité je též dodržovat čistotu a přesnost práce. Neopatrná či špatná práce s buněčnými kulturami by mohla vést k znehodnocení dané kultury. Kultivační techniky jsou tedy drahé, náročné na personální zajištění, čas a organizaci. [25] [26]

### 4.1 Typy kultivovaných buněk

Buněčné kultury jsou tvořeny izolovanými buňkami, které se pěstují v plastové či skleněné kultivační nádobě. První kulturu izolovaných buněk označujeme jako *primo* kulturu. Buňky *primo* kultury jsou čerstvě izolované buňky, které se odebraly z organismu chirurgicky nebo enzymaticky. Pro zakládání *primokultury* lze použít normální a nádorové buňky tkání. Nádorové buňky se lépe dělí a snáze kultivují než normální. Normální buňky mají omezenou životnost, dochází u nich k zestárnutí a přestávají se dělit. Nádorové buňky stárnutí skoro nepodléhají. Buňky přežívají jen několik dní a mohou se transformovat do buněčných linií přežívající v podmínkách *in vitro* i několik let. Buňky buněčných linií jsou si velmi podobné, identické ale nejsou. Buněčné linie mají charakter nádorových buněk, dělí se neomezeně a mohou vznikat i izolací z nádorů. Buněčné kmeny vycházejí z primárních kultur. Jedná se o kultury buněk, které se alespoň jednou pasážovaly. Zanikají po 40 až 50 děleních. Po namnožení se buňky nařadí a přenesou do nových kultivačních nádob a vzniká sekundární kultura. Buňky sekundární struktury pěstujeme do té doby, než získáme dostatečné množství potřebného materiálu. [25] [27] [28]

Podle způsobu růstu rozlišujeme buňky *adherentní* a *suspenzní*. *Adherentní* buňky se přichycují na dno kultivační láhve. Médium se mění tak, že se slije staré a vymění se za čerstvé. K uvolnění buněk ze dna kultivační nádoby v průběhu pasážování se používá proteolytický enzym *trypsin* či jiná proteáza. *Suspenzní* buňky se nacházejí volně rozptýlené v médiu. Výměna média nebo pasážování se provádí oddělením média odstředěním. [27]

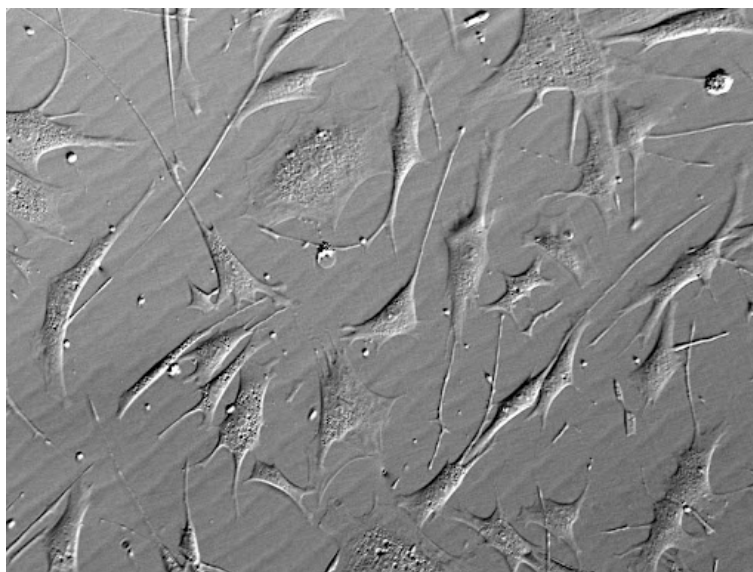
### 4.1.1 Mezenchymální kmenové buňky (MSCs)

Mezenchymální kmenové buňky označované také jako mezenchymální stromální buňky patří mezi nehematopoetické multipotentní kmenové buňky, které se přeměňují pouze do příbuzných buněk daného typu. Mají schopnost sebeobnovy a diference do osteoblastů, chondrocytů, adipocytů, neurocytů a hepatocytů. Ve tkáních se vyskytují v takzvaných nika prostorech. Jedná se o prostředí, kde buňky sídlí a mají zde ideální podmínky pro existenci, jelikož nika prostory zajišťují výživu, zabraňují nadměrné proliferaci a ochraňují před apoptickými signály. V případě porušení či zničení nika ztrácí buňky vlastnosti kmenových buněk a diferencují se do běžných buněk tkáně, ve které se nachází. Současné výzkumy tvrdí, že MSCs hrají roli v regeneraci tkání všech zárodečných listů a vykazují pozoruhodnou plasticitu. [29] [30]

Mezenchymální kmenové buňky mají charakteristický vřetenovitý fibroblastický tvar. Jedná se o velké buňky s jádrem, jadérkem a granulární cytoplazmou. Hlavním zdrojem MSCs je kostní dřev. Pouze 0,001 — 0,01 % z celkového množství buněk v kostní dřev je tvořeno MSCs. Množství a schopnost diferenciac se s věkem snižuje. Nejprve byly izolovány Friedensteinem v 70. letech 20. století z kostní dřev. Dnes se izolují kromě kostní dřev i z tukové tkáně, plodové vody, pupeční šňůry, zubní dřev, endometria a dalších. Obecně platí, že MSC je tak dobrá, jako je její zdroj. Svůj název ale získaly až v roce 1991, kdy je tak pojmenoval Arnold Caplan. O jejich význam se opírá buněčná terapie, regenerativní medicína, léčba autoimunitních onemocnění jako je Crohnova choroba, roztroušená skleróza či Parkinsonova choroba. MSCs potlačují zánětlivou reakci a podporují regeneraci poraněné tkáně. Jejich nevýhodou je potřeba opakovaných ošetření pro udržení vysokého počtu kmenových buněk v těle. MSCs mají schopnost sebeobnovy, imunomodulace, protizánětlivosti, signalizace a diferenciac. [30] [32]

MSCs jsou podle Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii definovány pomocí tří kritérií [31]:

- MSCs musí mít schopnost přilnavosti k plastovému povrchu při kultivaci.
- MSCs musí nést povrchové markery CD105, CD73, CD90, zatímco povrchové markery CD45, CD19, CD34, CD14, CD11b CD79 $\alpha$  či HLA-DR nenesou.
- MSCs musí mít schopnost diferencovat se *in vitro* do adipocytů, chondrocytů a osteoblastů.



Obr. 4.1: Mezenchymální kmenové buňky [33]

## 4.2 Kultivační médium

Optimálním prostředím pro buňku je kultivační médium napodobující extracelulární tekutinu, kde se nachází dostatečný zdroj živin pro růst buňky. Je přidáváno do kultivačních lahví. Ve složení média nacházíme stabilizátory pH, živiny, glukózu, aminokyseliny, sérum, antibiotika, vitamíny, proteiny, lipidy, růstové faktory, soli a další. Růstové faktory, stopové prvky a vitamíny se do média dostávají i přidáním krevního séra. Nejčastěji se používá bovinní sérum FBS anglicky fetal bovine serum (sérum získané z telecích fetů). V závislosti na stáří jedince se mění jeho složení a koncentrace růstových faktorů a tím i proliferace a diferenciací kultivovaných buněk. Problémem přidání séra může být infekce. Séra se stabilizují filtrací, aby se přenosu bakterií a plísní zabránilo. Anorganické soli se podílejí na udržení osmotického tlaku a pH média. K udržování stálého pH se do médií přidávají i organické pufrы například HEPES a TES. Další složkou kultivačního média je zdroj energie nejčastěji v podobě glukózy nebo energetického substrátu L-glutaminu. Vitamíny, které v kultivačním médiu nacházíme, jsou především ze skupiny B. Občas dochází i k přidání vhodných růstových faktorů, jako je insulin, který se často přidává se selenem a transferinem. Důležité je kontrolovat i osmolaritu. Osmolaritu případně upravíme pomocí přidání či odebrání soli z kultivačního média. Při kultivaci se snažíme udržovat hodnotu pH na 7,4. Pro udržování pH se používá pufr na bázi hydrogen uhličitanu nebo organický HEPES. Při poklesu hodnoty pH pod 6,5 dochází ke zástavě růstu. Jestliže dojde ještě k většímu poklesu, může nastat úmrtí buňky. Aby se určilo množství pH v kultivačním médiu, přidává se do něj fenolová červeň. Pokud se hodnota pH pohybuje okolo 7,4, pak se kultivační médium jeví červeně. Při poklesu pH, které může být

způsobeno spotřebou živin, dochází k změně barvy kultivačního média do žluta. V momentě zbarvení do žluta se musí kultivační médium vyměnit za nové. K jeho výměně za nové dochází většinou 2x—3x týdně. [25] [27] [34]

Do kultivačního média se přidávají antibiotika, aby nedocházelo k šíření a vzniku bakterií. Antibiotika by se měla přidávat s opatrností, jelikož některá antibiotika i v malých koncentracích mohou mít vliv na proliferaci a chování buněk. Nejčastějším používaným antibiotikem je penicilin a streptomycin.[25]

Mezi běžně používané médium patří Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (DMEM). Jedná se o vodný pufr s pH mezi 7,2 a 7,4. DMEM obsahuje soli, sacharidy, lipidy, aminokyseliny, FBS či antibiotika. [35]

## 4.3 Podmínky kultivace

Během práce s buněčnými kulturami je třeba zajistit sterilitu prostředí a dodržovat stanovená pravidla. Pro provádění kultivace potřebujeme mít potřebné vybavení – sterilní hlubokomrazicí box, inkubátor, chladničku k uchovávání roztoků, inverzní mikroskop, kultivační láhve, centrifugy a vodní lázeň. Aby buňky za podmínek *in vitro* přežily, je třeba zajištění vhodných podmínek, jako je povrch kultivační nádoby, složení kultivačního média, teplota média a složení atmosféry. Teplotu inkubátoru je třeba nastavit na hodnotu teploty organismu, ze kterého buňky pochází. U savčích buněk teplotu v inkubátoru nastavujeme na 37 °C. Při použití buněk získaných z chladnokrevných obratlovců se teplota inkubátoru nastavuje na 18 až 25 °C. Atmosféra inkubátoru je obohacena o oxid uhličitý. Obvykle jej obsahuje 5 %. Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého se podílí na udržování pH média s bikarbonátovým pufrem. Aby nedocházelo k odpařování vody z kultivačního média a ke změně koncentrace jeho složek, udržuje se relativní vlhkost atmosféry okolo 90 %. Buňky se pěstují ve speciálních inkubátorech zajišťujících všechny tyto podmínky. Regulují teplotu a řídí koncentraci oxidu uhličitého. Inkubátor musí umožňovat snadné čištění, dezinfekci a sterilizaci povrchů. [25] [34] [35]

## 4.4 Postup kultivace

Buňky se kultivují v kultivačních láhvích. Pro lepší přilnavost adherentních buněk k povrchu kultivační nádoby lze pokrýt její dno fibronectinem či lamininem. Po přidání buněk do kultivační nádoby bude zahájen proces jejich aktivního růstu a dělení. Po několika dnech kultivace buňky zaplní povrch dna nádoby a začnou se vzájemně dotýkat. Dochází ke kontaktní inhibici, během které je nutné buňky pasážovat (subkultivovat) do nové kultivační nádoby. Pasážování probíhá při konfluenci

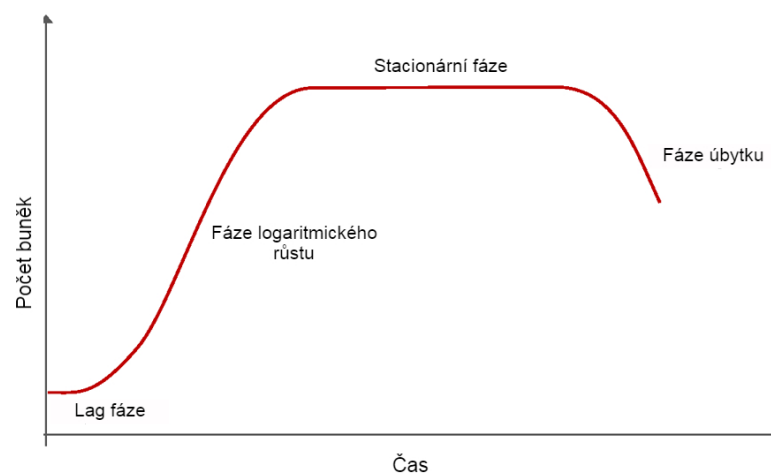


80 – 90 %. Těsně před fází plató se kultura nařadí a převede do nových kultivačních nádob s novým médiem v takové hustotě, aby opět rostla exponenciálně. K uvolnění adherentních buněk se nejčastěji používají enzymy trypsin a akutáza. [25] [27] [34]

Buňky nelze kultivovat neomezeně. Po určitém množství pasážování dochází k zestárnutí, jehož následkem je, že se buňkám mění vlastnosti a přestávají se dělit. Životnost záleží na typu kultivovaných buněk a původu. V některých případech k zestárnutí nedojde a buňky pěstujeme neomezeně. Živé kultivované buňky lze zmrazit pomocí hlubokomrazicího boxu s teplotou okolo  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ve kterém je můžeme uchovávat po dobu několika měsíců či let. Při dlouhodobém zmrazení však ztrácí životaschopnost. Buňky mrazíme pomalu, aby nedocházelo k jejich poškození krystaly vody a přidáváme do kultivačního média kryoprotektivum, nejčastěji dimethylsulfoxid (DMSO). Rozmrazení buněk by mělo být naopak co nejrychlejší. Dojde-li ke kontaminaci, je nejlepším řešením kulturu zlikvidovat. Použití antibiotik brání kontaminaci kultury, ale zvyšuje riziko skryté infekce. [25]

## 4.5 Křivka růstu buněčné kultury

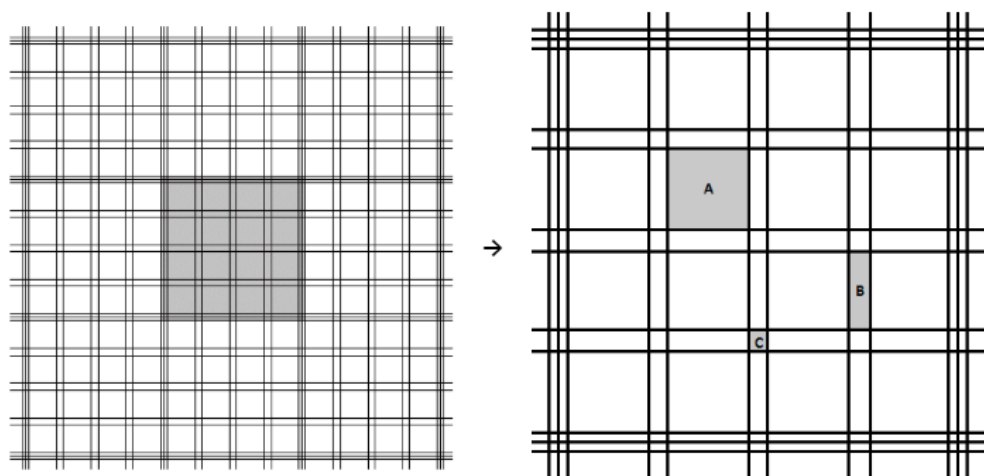
Růstová křivka vyjadřuje závislost počtu buněk na délce kultivace. Buňky rostou do doby dosáhnutí vysokého procenta konfluence. Růstová křivka má několik fází. V lag neboli počáteční fázi si buňky zvykají na nové prostředí a v důsledku toho některé odumřou. Jejich počet tedy nejprve mírně klesá a až později rychle stoupá. Výsledkem je adaptace buněk na kultivační prostředí a jejich příprava na dělení. V log neboli logaritmické fázi počet buněk roste exponenciálně. Nachází se zde nejvíce buněk v mitóze. Ve stacionární fázi začíná rychlost růstu postupně klesat, jelikož dochází k vyčerpávání živin z kultivačního média a spouští se inhibiční mechanismy. Ve fázi úbytku buněk nastává postupné odumírání buněk. Ty mají nedostatek živin, snížilo se pH a došlo k nahromadění toxických produktů buněčného metabolismu. Růst buněk pozorujeme pomocí speciálního inverzního mikroskopu. [26] [27] [28]



Obr. 4.2: Křivka růstu buněčné kultury. Upraveno dle [36]

## 4.6 Počítání buněk

Počet buněk stanovíme pod mikroskopem pomocí speciální počítací Bürkerovy komůrky. Ta je tvořena podložním sklíčkem, ve kterém jsou pomocí laseru vyryté sítě kolmic. Schéma mřížky komůrky lze vidět na Obr. 4.3.



Obr. 4.3: Bürkerova komůrka [37]

Čtverec A s plochou  $0,04 \text{ mm}^2$  se k počítání buněk používá nejčastěji. K počítání mohou být použity i čtverce B a C s plochou  $0,01 \text{ mm}^2$  a  $0,0025 \text{ mm}^2$ . Mezi podložní a krycí sklíčko se napipetuje buněčná suspenze. Takto připravená komůrka se dá pod mikroskop a počítá se počet buněk. Počítají se ale jen ty buňky, které se nachází v prostoru vymezeném čarami nebo se dotýkají dvou libovolně zvolených stran.

Pomocí vzorce lze vypočítat i koncentraci buněk v 1 ml suspenze:

$$X = \frac{a \cdot 1000 \cdot d}{n \cdot V}, \quad (4.1)$$

kde  $a$  stanovuje počet buněk,  $d$  označuje ředění suspenze,  $n$  je počet spočítaných čtverců a  $V$  je objem počítaného útvaru.

K odlišení živých a mrtvých buněk se používá barvivo trypanová modř, které neprochází neporušenou buněčnou membránou nebo je z buňky aktivně transportováno ven. Živé buňky jsou tedy bezbarvé, zatímco neživé buňky se zbarví. Můžeme určit i procentuální životnost buněk dle vzorce [26]:

$$X = \frac{\text{počet živých buněk}}{\text{celkový počet buněk}} \cdot 100. \quad (4.2)$$

## 5 Fluorescenční značení mitochondrií

Struktury buněk lze zobrazit pomocí aplikace určitého druhu fluorescenčního barviva a následného zobrazení ve fluorescenčním mikroskopu. Fluorescenční barviva absorbují světlo určité vlnové délky a vyzařují světlo větší vlnové délky. Existují různé typy komerčně dostupných barviv, které se liší svými vlastnostmi. Barvivo volíme podle toho, jaké struktury chceme v buňky zviditelnit. [3]

Následné typy barviv slouží k vyhodnocení morfologie mitochondrií.

Barvivo MitoLite Red FX600 je kationtové barvivo, které snadno difunduje přes buněčnou stěnu prostřednictvím mitochondriálního membránového potenciálu a dochází k jeho nahromadění v mitochondriích. Fluorescence je v mitochondriích udržována po dlouhou dobu. Může být přizpůsobeno pro širokou škálu fluorescenčních platforem, jako jsou mikrotitrační destičky, imunocytochemie a průtoková cytometrie. Může být použito pro proliferující, neproliferující, suspenzní i adherentní buňky. Excitační maximum má na 580 nm a emisní na 598 nm. [38] [39]

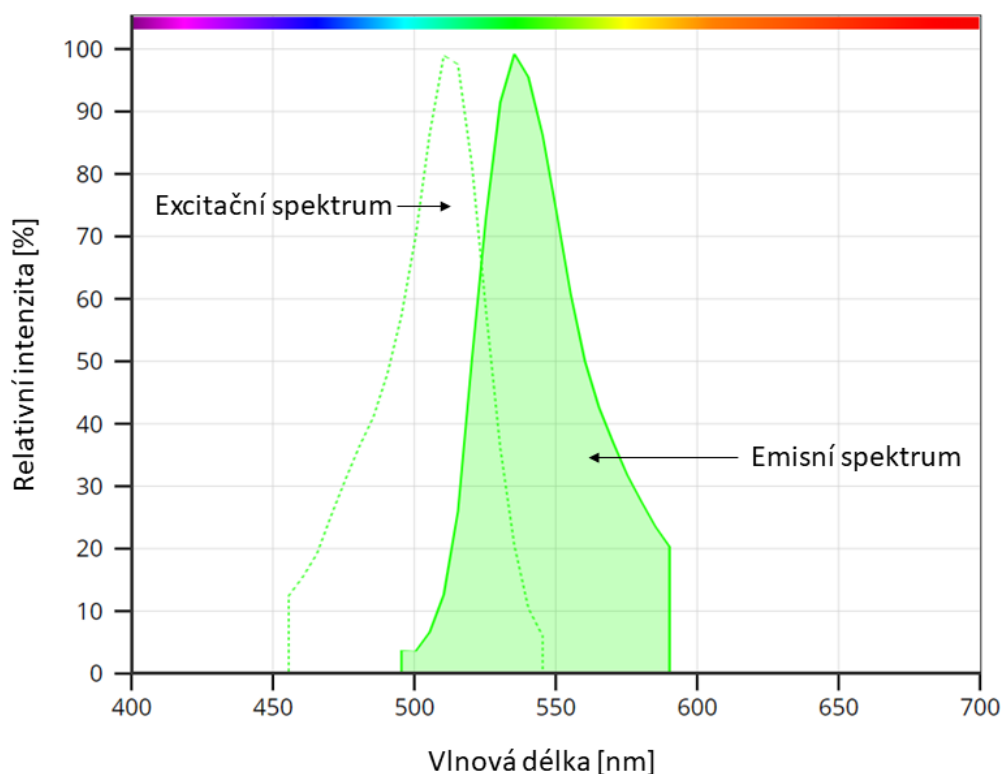
MitoTracker<sup>TM</sup> Red CMXRos je červené fluorescenční barvivo barvící mitochondrie v živých buňkách. Jeho akumulace je závislá na membránovém potenciálu. Toto fluorescenční barvivo je vhodné používat při krátkodobých experimentech, protože během několika hodin fluorescenční signál prudce klesá. Po fixaci aldehydem fluorescenční značení přetrvává, což umožňuje další práci se zkoumaným vzorkem. [40]

Kromě barviv, které slouží pro prosté značení mitochondrií, existují i barviva pro monitorování funkcí mitochondrií.

Barvivo JC-10 bylo vyvinuto jako alternativa k barvivu JC-1. Barvivo JC-10 má ve srovnání s JC-1 mnohem lepší rozpustnost ve vodě. Jedná se o kationtové, lipofilní barvivo používané k monitorování změny potenciálu membrány mitochondrií. Mitochondriální membránový potenciál je jedním z klíčových parametrů mitochondrií a slouží jako indikátor zdraví buněk. JC-10 selektivně vstupuje do mitochondrií a reverzibilně v důsledku zvyšování membránových potenciálů mění barvu ze zelené na oranžovou. V zdravých mitochondriích se koncentruje v mitochondriální matrix, kde tvoří oranžové fluorescenční agregáty. V apoptotických a nekrotických buňkách difunduje z mitochondrií, přechází do monomerní formy a způsobuje zelenou fluorescenci buněk. [38] [41]

## 5.1 Cell Meter<sup>TM</sup> Fluorimetric Mitochondrial Superoxide Activity Assay Kit Green Fluorescence

Ke stanovení množství superoxidu v živých buňkách je v této bakalářské práci použita souprava fluorimetrického buněčného měření intracelulárního superoxidu Cell-Meter s unikátním superoxidovým indikátorem MitoROS<sup>TM</sup> 520, testovacím pufrem a dimethylsulfoxidem. MitoROS<sup>TM</sup> 520 jednoduše prostupuje buněčnou membránou a detekuje superoxid v mitochondriích rychle a selektivně. Při reakci se superoxidem vytváří zelenou fluorescenci. Fluorimetrické buněčné měření mitochondriálního superoxidu pomocí této soupravy poskytuje citlivý, jednokrokový fluorimetrický test k detekci mitochondriálního superoxidu v živých buňkách s hodinovou inkubací. MitoROS<sup>TM</sup> 520 má excitační maximum v 513 nm a emisní maximum v 537 nm. [42]

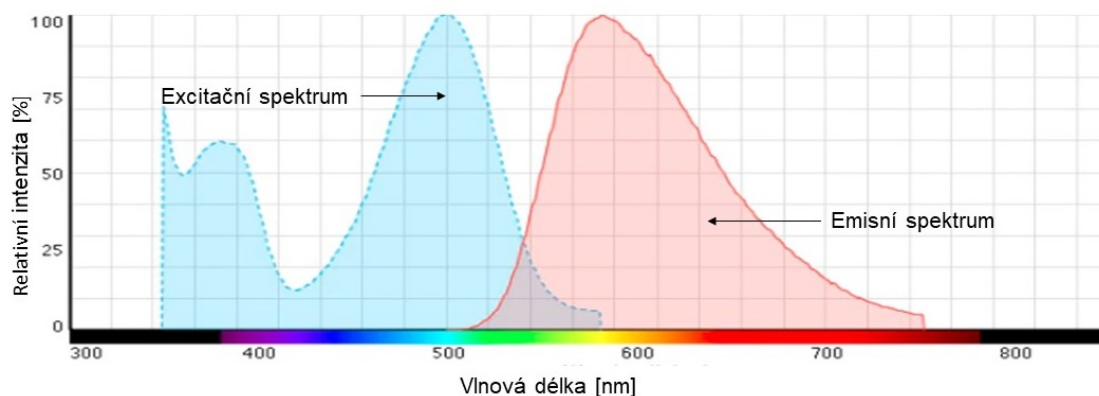


Obr. 5.1: Excitační a emisní spektrum barviva MitoROS<sup>TM</sup> 520. Upraveno dle [42]

## 5.2 MitoSOX<sup>TM</sup> Red Mitochondrial Superoxide Indicator

Ke stanovení množství superoxidu v živých buňkách je v této bakalářské práci kromě výše uvedené soupravy použit i indikátor mitochondriálního superoxidu MitoSOX<sup>TM</sup> Red. Jedná se o fluorogenní barvivo detekující superoxid v mitochondriích živých buněk vysoce selektivně. MitoSOX<sup>TM</sup> Red je permeabilní pro živé buňky. V mitochondriích je oxidováno superoxidem a vytváří červenou fluorescenci. Jinými reaktivními formami kyslíku či dusíku oxidováno není. MitoSOX<sup>TM</sup> Red má excitační maximum v 510 nm a emisní maximum v 580 nm. [43]

Je dodáváno v 10 lahvičkách. Každá lahvička obsahuje 50 µg. Při správném skladování vydrží až 6 měsíců. Skladuje se ve svislé poloze při teplotě menší než 20 °C a je chráněn před světlem. Aby jeho výdrž byla co největší, mělo by se zabránit opakovanému zmrazování a rozmrazování. Je baleno s vakem pohlcující kyslík, čímž se jeho životnost prodlužuje. Lahvičky je třeba před použitím ohřát na pokojovou teplotu. [43]



Obr. 5.2: Excitační a emisní spektrum barviva MitoSOX<sup>TM</sup> Red. Upraveno dle [43]

## 6 Praktická část

Cílem bakalářské práce je sledování mitochondriální produkce superoxidů u MSCs po přidání určitého množství antibiotika — penicilinu-streptomycinu či gentamicinu do kultivačního média.

Jednotlivé kroky bakalářské práce jsou vypsány v těchto bodech:

- Kultivace buněk v základním médiu (s doporučeným obsahem antibiotika).
- Pasáž těchto buněk a vytvoření tří misek. Jedna slouží jako kontrolní, na zbylých dvou je proveden experiment. Buňky kontrolní misky se kultivují v médiu bez antibiotika. Buňky experimentálních misek se kultivují v médiu s doporučeným obsahem antibiotika a dvojnásobným obsahem antibiotika.
- Barvení pomocí fluorescenčního barviva MitoROS<sup>TM</sup> 520 či MitoSOX<sup>TM</sup> Red.
- Snímání buněk konfokálním mikroskopem.
- Návrh algoritmu v programovacím prostředí MATLAB.
- Hodnocení dosažených výsledků a diskuze.

### 6.1 Použité přístroje a pomůcky

V následujícím seznamu jsou uvedeny veškeré přístroje a pomůcky, které byly během experimentu použity:

- Laminární box – Alpina BIO 100
- Laboratorní centrifuga – Hettich EBA 20
- Inkubátor – MEMMERT INCOmed
- Mrazicí skříň – Haier ULT Freezer DW-86L100J
- Chladnička pro laboratorní účely – LIEBHERR
- Vodní lázeň – Julabo ED
- Inverzní mikroskop – ZEISS Axio Observer 5
- Konfokální mikroskop – Leica TCS SP8 X
- Nastavitelné pipety – BioSan 100–1000 µl, BioSan 0.5–10 µl, HTL Discovery comfort 20–200 µl
- Plastové centrifugační zkumavky o objemu 15 ml – Sigma-Aldrich
- Kultivační láhve – Sigma-Aldrich
- Konfokální misky se skleněným dnem o průměru 14 mm – Cellvis D35-14-1.5-N
- Pasteurovy pipety
- Sterilní špičky pro pipety
- Tenký černý fix k označení misek

## 6.2 Kultivační médium a ostatní roztoky

V tomto seznamu jsou uvedeny veškeré používané roztoky:

- Kultivační médium – Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2, C-28009, PromoCell
- Fosfátový pufovaný fyziologický roztok – PBS 79382-50TAB, Sigma-Aldrich
- Akutáza – Accutase in DPBS, 0,5 mM EDTA, SCR005, EMD Millipore
- Gentamicin – Gentamicin solution, 10 mg·mL<sup>-1</sup> in deionized water, liquid 0,1 µm filtered, BioReagent, suitable for cell culture, G1272-50ML, Sigma-Aldrich [23]
- Penicilin-streptomycin – Penicillin-Streptomycin solution, stabilized with 10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin·mL<sup>-1</sup>, 0,1 µm filtered, BioReagent, suitable for cell culture, P4333-100ML, Sigma-Aldrich [20]
- Fibronectin – Fibronectin bovine plasma, powder, BioReagent, suitable for cell culture, F4759-1 mg, Sigma-Aldrich [44]
- Cell Meter<sup>TM</sup> Fluorimetric Mitochondrial Superoxide Activity Assay Kit, 16060 AAT Bioquest [42]
- Hankův balancovaný solný roztok (HBSS) – Hanks' Balanced Salt Solution, Modified, with sodium bicarbonate, without phenol red, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture, H8264-100 mL, Sigma-Aldrich
- MitoSOX<sup>TM</sup> Red Mitochondrial Superoxide Indicator for live-cell imaging, M36008, ThermoFisher [43]

## 6.3 Kultivace a pasážování buněk

Jak již bylo zmíněno, k hodnocení produkce superoxidů byla použita buněčná linie MSCs. Jako základní kultivační médium bylo zvoleno kultivační médium Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 od společnosti PromoCell, které bylo vyvinuto speciálně pro práci s mezenchymálními kmenovými buňkami a nejvíce odpovídá jejich potřebám. Kultivace probíhala v kultivačních láhvích. Pro experiment byly vždy použity 2 kultivační láhve. V první láhvi se kultivují buňky v médiu s doporučeným obsahem penicilinu streptomycinu (10 µl·ml<sup>-1</sup>), v druhé láhvi se kultivují buňky v médiu s doporučeným obsahem gentamicinu (1 µl·ml<sup>-1</sup>). V experimentu docházelo k pasážování buněk ve zmiňovaných láhvích a vytvoření tak tří misek z každé láhve. Jedna miska sloužila jako kontrolní, zatímco na zbylých dvou byl proveden experiment. V kontrolní misce bylo použito základní médium bez obsahu antibiotika. Do jedné testovací misky bylo přidáno médium s doporučeným obsahem antibiotika a do druhé testovací misky bylo přidáno médium s dvojnásobným obsahem antibiotika.



Jako vhodné kultivační parametry byly zvoleny – teplota 37 °C, vlhkost vzduchu 90 % a koncentrace CO<sub>2</sub> 5 %.

Pasážování probíhalo při konfluenci 80–95 %. Než došlo k pasážování buněk, bylo potřeba dezinfikovat povrch laminárního boxu ethanolem, a to včetně všech pomůcek a přípravků, které se v boxu budou používat – pipety, kádinky na odpad, lahvička s akutázou či PBS. Před vložením roztoků do boxu je nutné jejich zahřátí ve vodní lázni na teplotu 37 °C.

V následujících bodech seznamu jsou uvedeny jednotlivé kroky pasážování:

1. Vytažení kultivační láhve s připravenými buňkami z inkubátoru.
2. Kontrola konfluence pod mikroskopem.
3. Sterilizace laminárního boxu a všech přípravků ethanolem.
4. Odsátí starého média z kultivační láhve do odpadní kádinky.
5. Dvojité propláchnutí láhve pomocí 1 ml PBS pro odstranění zbytků starého média a následné odstranění PBS.
6. Přidání do láhve 1 ml akutázy pro odlepení buněk od kultivačního povrchu. Krouživým pohybem dostat akutázu do všech míst láhve. Následné působení akutázy po dobu 2 minut v inkubátoru.
7. Vyjmutí kultivační láhve z inkubátoru a kontrola stavu buněk pod mikroskopem (buňky se musí odlepit ode dna a přejít do suspenze).
8. Přenesení zkontrolovaných buněk zpět do laminárního boxu a přidání 3 ml příslušného kultivačního média do láhve k zastavení účinku akutázy.
9. Resuspendování (6 – 7x) a přenesení suspenzí do centrifugační zkumavky.
10. Centrifugace po dobu 5 min na 800 otáček za minutu.
11. Následné odsátí supernatantu ze zkumavky pomocí pipety. V centrifugační zkumavce zůstává pouze peleta.
12. Přidání 1 ml kultivačního média bez obsahu antibiotik do zkumavky.
13. Určení počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky (viz Kap. 6.3.1).
14. Přidání do nové láhve 5 ml kultivačního média s doporučeným obsahem antibiotik a příslušného množství buněčné suspenze (300  $\mu$ l).
15. Popsání láhve černým fixem – typ buněk, číslo pasáže a datum.
16. K vytvoření misek bylo třeba do misek dát 2 ml zvoleného kultivačního média a příslušné množství buněčné suspenze (200  $\mu$ l). Do kontrolní misky bylo přidáno základní kultivační médium bez obsahu antibiotika, do jedné experimentální misky bylo přidáno médium s doporučeným obsahem antibiotika (10  $\mu$ l·ml<sup>-1</sup> pro penicilin-streptomycin a 1  $\mu$ l·ml<sup>-1</sup> pro gentamicin) a do druhé experimentální misky bylo přidáno médium s dvojnásobnou koncentrací antibiotika (20  $\mu$ l·ml<sup>-1</sup> pro penicilin-streptomycin a 2  $\mu$ l·ml<sup>-1</sup> pro gentamicin).
17. Vložení láhve a misek do inkubátoru.

Po provedení pasážování dochází k opětovnému růstu buněk. Ty začínají adherovat na dno láhve. K vytvoření konfluentní monovrstvy jsou potřeba 3–4 dny.

### 6.3.1 Počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky

Před přidáním buněčné suspenze do nových kultivačních láhví k udržení buněčné kultury a misek je potřeba zjistit koncentraci buněčné suspenze. Návod k zjištění koncentrace buněčné suspenze je uveden níže.

1. Odebrání 20  $\mu$ l buněčné suspenze do nové zkumavky.
2. Přidání 20  $\mu$ l trypanové modři k buněčné suspenzi a resuspendace.
3. Nanesení 20  $\mu$ l směsi na každou počítací mřížku Bürkerovy komůrky.
4. Opatrné překrytí kapky směsi krycím sklíčkem.
5. Vložení komůrky pod mikroskop a spočítání buněk v 16 čtverečcích.
6. Vypočítání množství buněk v 1 ml buněčné suspenze.

Celkem bylo napočítáno 78 buněk v 16 velkých čtverečích o ploše 0,04 mm<sup>2</sup> s objemem 0,004 mm<sup>3</sup>. Číslo zředění bylo 2. K výpočtu byla použita rovnice (4.1).

$$X = \frac{a \cdot 1000 \cdot d}{n \cdot V} = \frac{78 \cdot 1000 \cdot 2}{16 \cdot 0,004} = 2\,437\,500 \text{ buněk} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Na základě spočtené koncentrace bylo přidáno 300  $\mu$ l suspenze do nové láhve pro udržení kultury a 200  $\mu$ l suspenze do každé misky.

### 6.3.2 Coating pomocí fibronektinu

Důvodem provedení coatingu je odlepování buněk ze dna misky v některých případech po přidání barviva. Před přidáním buněčné suspenze do misky bude miska pokryta roztokem fibronektinu. Buněčná adheze k fibronektinu je zprostředkována pomocí centrální buněčné vazebné domény FN prostřednictvím RGD aminokyselinové sekvence. [46] Vytváří se tak vhodné podmínky pro přichycení buněk na dno misky a buňky budou schopné přežít nepříjemné podmínky barvení. Postup jeho provedení je uveden níže.

1. Rozpuštění 1 mg fibronektinu v 1 ml vody při teplotě 37 °C po dobu alespoň 30 minut.
2. Zředění fibronektinu pomocí PBS a potažení povrchu misky.

3. Schnutí misky na vzduchu při pokojové teplotě po dobu alespoň 45 minut. Přebytkový fibronectin lze odstranit aspirací.

Kultivační misky potažené fibronectinem lze skladovat po dobu 2–4 týdnů při teplotě 2–8 °C v uzavřené sterilní nádobě nebo sterilních uzavíratelných sáčcích.

## **6.4 Barvení buněk pomocí sady Cell Meter<sup>TM</sup> Fluorimetric Mitochondrial Superoxide Activity Assay Kit Green Fluorescence**

Tento seznam udává postup barvení:

1. Dle zvoleného stylu byl ve sterilní zkumavce připraven zásobní roztok (anglicky stock solution) smícháním MitoROS<sup>TM</sup> 520 a 50 µl DMSO.
2. Odsátí starého média z kultivačních misek.
3. Příprava pracovního roztoku (anglicky working solution), který vznikne přilítím a smícháním 2 µl připraveného zásobního roztoku do 800 ml testovacího pufru. Takto připravený roztok není stabilní a je potřeba jej připravit těsně před použitím.
4. Přidání 200 µl pracovního roztoku do každé misky.
5. Inkubace misek po dobu 1 hodiny při 37 °C.
6. Snímání misek konfokálním mikroskopem.

Po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm buňky emitují světlo v zeleném spektru (500 – 560 nm). Pro sledování označených buněk byl využit konfokální mikroskop. Excitace a detekce byla nastavena dle protokolu barviva pro fluorescenční mikroskopii.

## **6.5 Barvení buněk pomocí MitoSOX<sup>TM</sup> Red Mitochondrial Superoxide Indicator**

Tento seznam udává postup barvení:

1. Příprava 5 mM zásobního roztoku činidla MitoSOX<sup>TM</sup> rozpuštěním obsahu jedné lahvičky MitoSOX<sup>TM</sup> (50 µg) ve 13 µl dimethylsulfoxidu (DMSO).
2. Naředění 5 mM zásobního roztoku činidla MitoSOX<sup>TM</sup> v HBSS k vytvoření 5 µM pracovního roztoku MitoSOX<sup>TM</sup>.
3. Odsátí starého média z kultivačních misek a jejich dvojité propláchnutí pomocí HBSS.

4. Přidání 0,320 ml 5  $\mu$ M pracovního roztoku do každé misky k pokrytí buněk.
5. Inkubace misek po dobu 10 minut při 37 °C.
6. 3x promytí buněk každé misky pomocí HBSS.
7. Přidání 1,5 ml HBSS do každé misky.
8. Snímání misek konfokálním mikroskopem.

Koncentrace pracovního roztoku činidla MitoSOX<sup>TM</sup> by neměla přesáhnout 5  $\mu$ M. Zvýšená koncentrace by mohla vyvolat cytotoxické účinky včetně morfologických změn mitochondrií či redistribuci fluorescence do jader a cytosolu.

Po ozáření světlem o vlnové délce 510 nm buňky emitují světlo v červeném spektru (550 – 620 nm). Pro sledování označených buněk byl využit konfokální mikroskop. Excitace a detekce byla nastavena dle protokolu barviva pro fluorescenční mikroskopii.

## 6.6 Nastavení měření

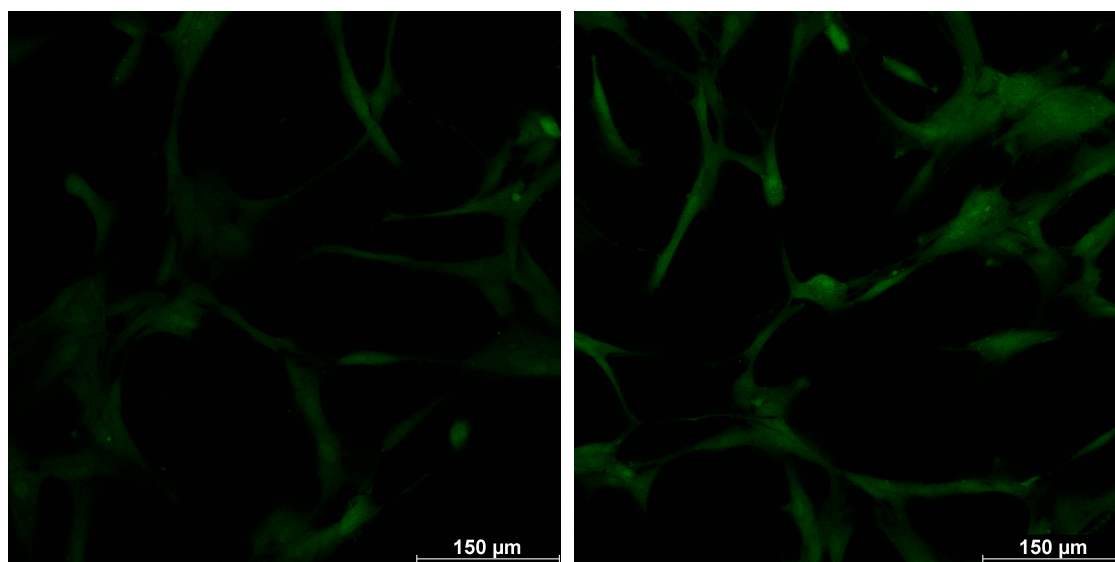
Konfokální mikroskop byl nastaven do sekvenčního módu. Dle protokolu k barvivu MitoROS<sup>TM</sup> 520 byla nastavena hodnota excitace na 488 nm. Fluorescenční pásmo k detekci emise bylo nastaveno na 500–560 nm. Pro barvivo MitoSOX<sup>TM</sup> byla nastavena hodnota excitace na 510 nm. Fluorescenční pásmo k detekci emise bylo nastaveno na 550–620 nm. Intenzita excitačního laserového paprsku byla nastavena pomocí experimentální misky s dvojnásobným obsahem antibiotika tak, aby výsledný obraz nebyl přesvícen a neměl přexponované pixely. Následně tato stanovená intenzita laseru byla využita pro snímání jak experimentálních misek, tak i kontrolní misky. V režimu live k sledování fluorescence bylo použito rozlišení 512x512 pixelů a rychlost skenování 400 Hz. V režimu live docházelo k posouvání stolku s preparátem do námi zvolené pozice pomocí joysticku. Jakmile byl nalezen vhodný snímek, zastavil se režim live. Dále proběhlo skenování obrazu při rychlosti 100 Hz s rozlišením 2048x2048 pixelů.

## 7 Výsledky bakalářské práce

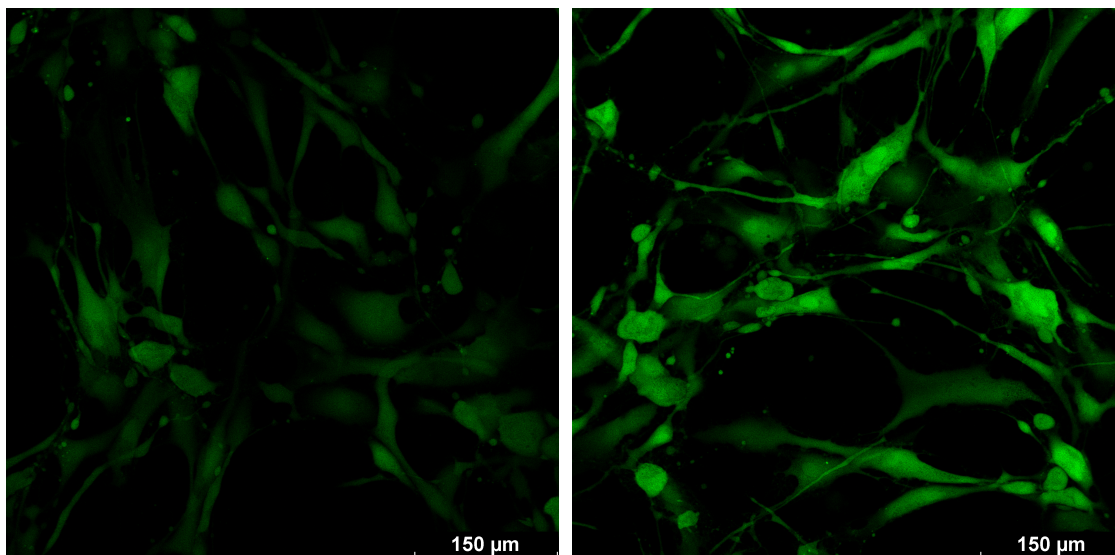
V této kapitole dokládám nasnímané snímky konfokálním mikroskopem Leica TCS SP8 X. Jak již bylo zmíněno, skenování snímků proběhlo rychlostí 100 Hz s rozlišením 2048x2048 pixelů. Snímky byly ukládány ve formátu tif. Jde o grafický rastrový formát, ve kterém jsou snímky uloženy ve vysoké kvalitě.

Při provádění experimentů byla použita dvě fluorescenční barviva – MitoROS<sup>TM</sup> 520 a MitoSOX<sup>TM</sup> Red. Na Obr. 7.1, Obr. 7.2 a Obr. 7.3 lze pozorovat ukázky snímků z provedených experimentů s barvivem MitoROS<sup>TM</sup> 520, se kterým se pracovalo především v semestrální práci kvůli níže uvedeným důvodům. Také došlo k změně průběhu experimentu. V semestrální práci byly vytvářeny pouze misky kontrolní s doporučeným obsahem antibiotika a misky experimentální s dvojnásobným obsahem antibiotika. Následně byl však ještě experiment doplněn o vytvoření třetí misky sloužící jako kontrolní, jelikož se v ní MSCs kultivovaly v kultivačním médiu bez obsahu antibiotika.

Zde jsou vedle sebe zobrazeny snímky experimentální kultivační misky s dvojnásobným obsahem antibiotika (vpravo) a kontrolní misky s doporučeným obsahem antibiotika (vlevo). Jako první jsou předkládány snímky experimentální kultivační misky a kontrolní misky s penicilinem-streptomycinem. Další snímky zobrazují experimentální kultivační misku a kontrolní misku s gentamicinem.

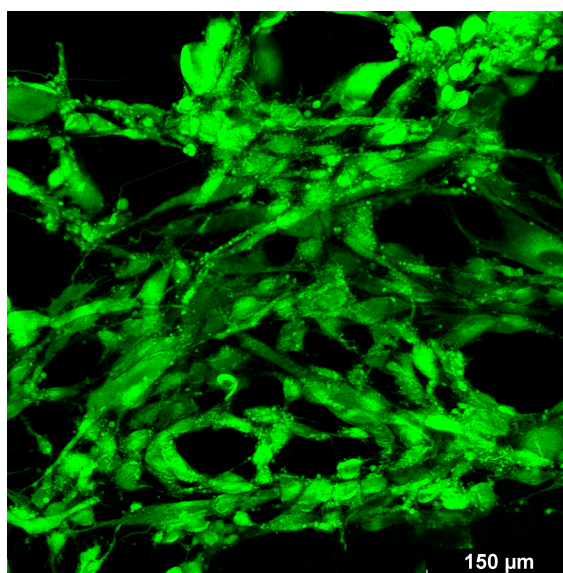


Obr. 7.1: Srovnání kontrolní a experimentální misky s penicilinem-streptomycinem



Obr. 7.2: Srovnání kontrolní a experimentální misky s gentamicinem

Během praktického ověření experimentu v buněčné laboratoři se v některých případech po přidání fluorescenčního barviva MitoROS<sup>TM</sup> 520 ze sady CellMetru<sup>TM</sup> začaly buňky odlepovat ze dna misky. Odlepování buněk lze vidět na Obr. 7.3. Mohlo to být dáno reaktivitou roztoku nebo nevhodností materiálu použitých konfokálních misek pro adhezi buněk zvoleného typu. Proto byl proveden coating – před přidáním buněčné suspenze do misky byla miska pokryta roztokem fibronektinu. Ten vytvořil vhodné podmínky pro přichycení buněk na dno misky a buňky tak byly schopné přežít nepříjemné podmínky barvení. Ze snímku je zřejmé, že spousta buněk neměla charakteristický vřetenovitý tvar, ale kulatý.

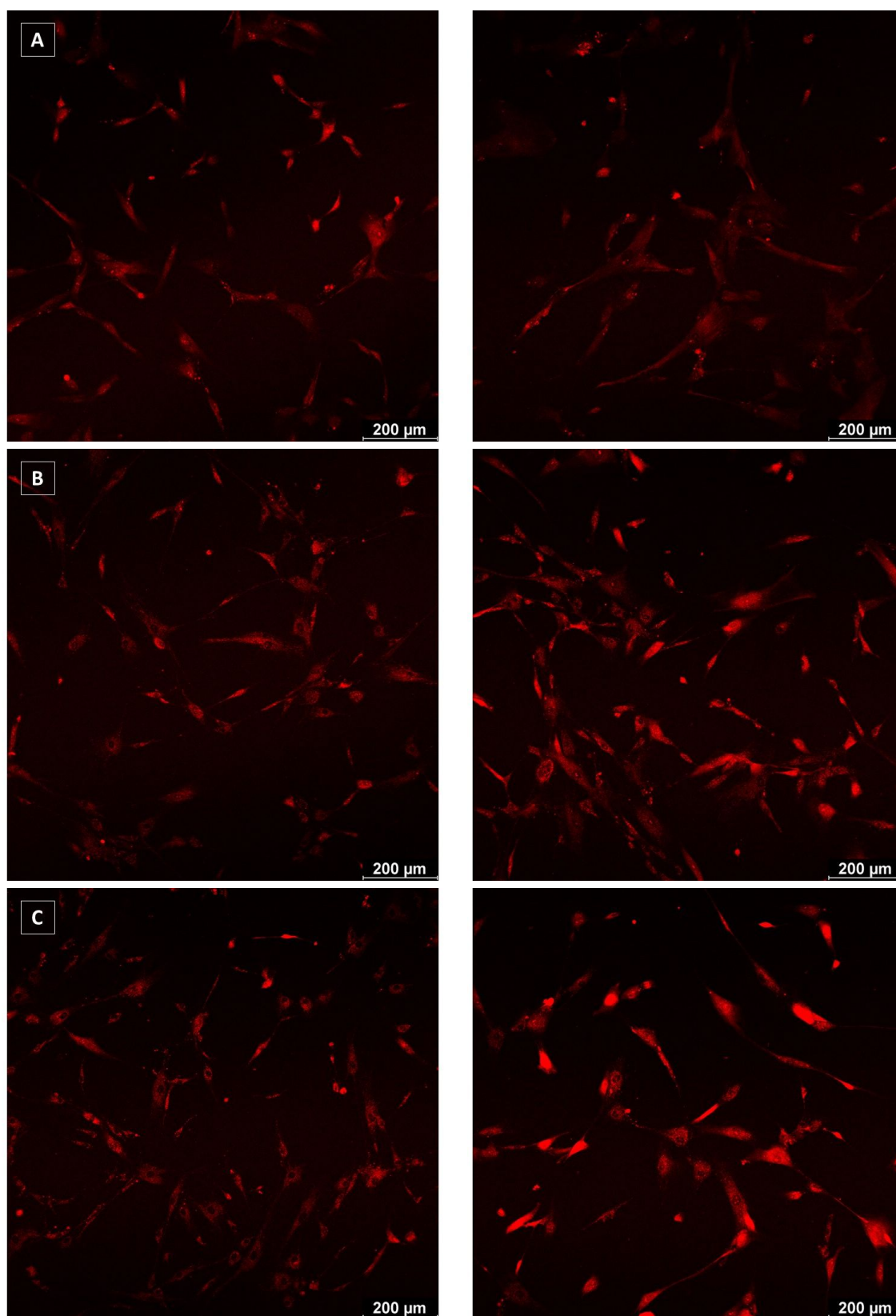


Obr. 7.3: Ukázka odlepování MSCs ze dna misky

MSCs se po obarvení pomocí fluorescenčního barviva MitoROS<sup>TM</sup> 520 neprojevovaly dle očekávání, a proto bylo pořízeno nové fluorescenční barvivo MitoSOX<sup>TM</sup> Red od firmy ThermoFisher, které se při sledování mitochondriální produkce superoxidů v buněčných experimentech používá nejčastěji. Fluorescenční barvivo MitoSOX<sup>TM</sup> Red má oproti fluorescenčnímu barvivu MitoROS<sup>TM</sup> 520 řadu předností. Největší výhodou je mnohem kratší délka inkubace. Po obarvení fluorescenčním barvivem MitoSOX<sup>TM</sup> Red není třeba čekat hodinu, jako tomu bylo u fluorescenčního barviva MitoROS<sup>TM</sup> 520, ale pouze 10 minut. Délka prováděného experimentu se díky tomu výrazně zkrátí. Fluorescenční barvivo MitoSOX<sup>TM</sup> Red má jednodušší přípravu než fluorescenční barvivo MitoROS<sup>TM</sup> 520. U fluorescenčního barviva MitoSOX<sup>TM</sup> Red dochází po 10minutové inkubaci k promytí misky s MSCs teplým pufrem, což má ve výsledku velký vliv na podíl šumu v obraze. Další nevýhoda fluorescenčního barviva MitoROS<sup>TM</sup> 520 spočívá v objevování shluků v kultivačním médiu. Poslední nevýhodou fluorescenčního barviva MitoROS<sup>TM</sup> 520 je odlepování MSCs ze dna misky po jeho přidání do misky, a proto musel být proveden coating, kdy byl povrch misky potažen tenkou vrstvou fibronektinu. Tento problém u fluorescenčního barviva MitoSOX<sup>TM</sup> Red během prováděných experimentů nenastal.

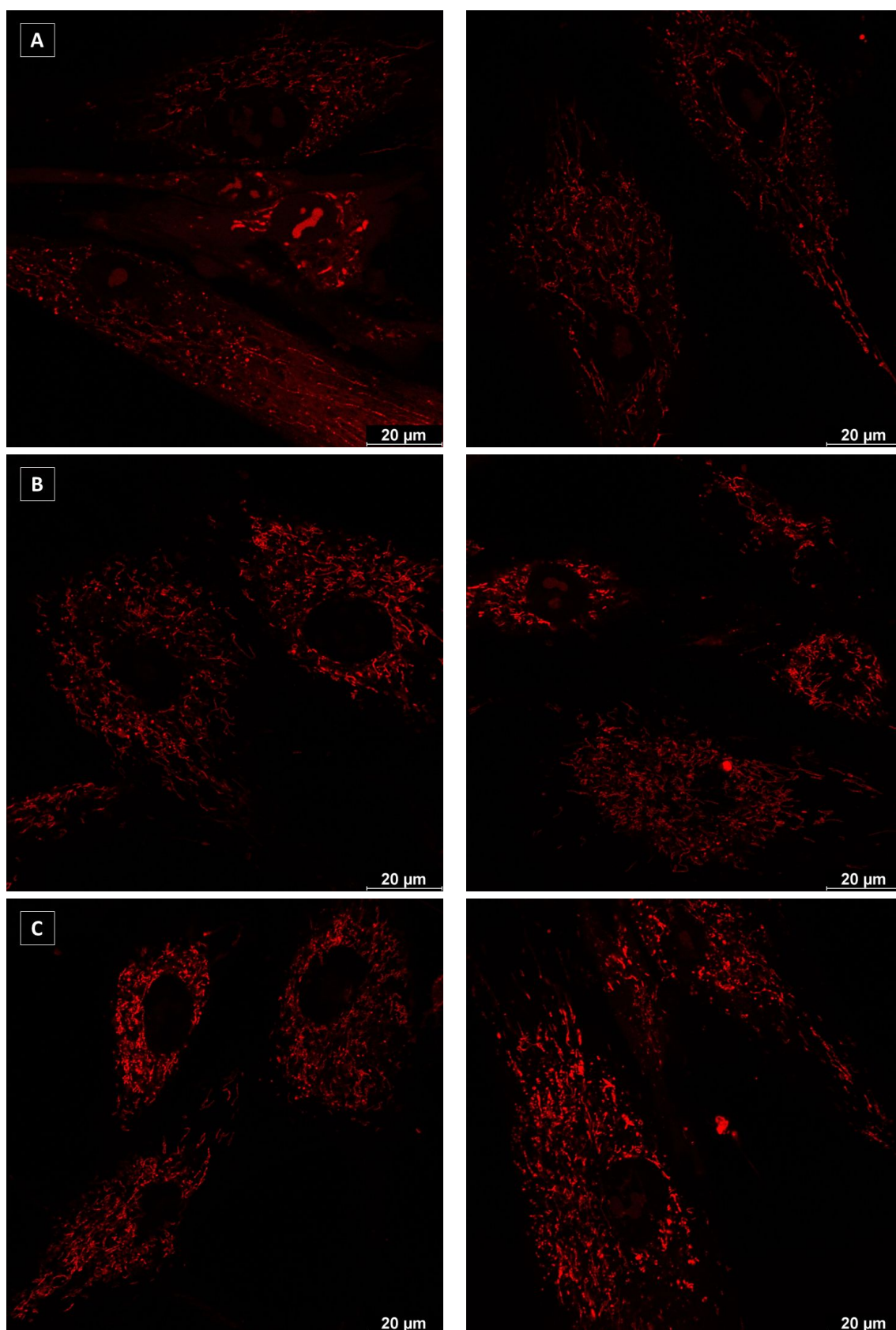
Z výše uvedených důvodů nebylo v experimentu s fluorescenčním barvivem MitoROS<sup>TM</sup> 520 pokračováno a přešlo se na experimenty s fluorescenčním barvivem MitoSOX<sup>TM</sup> Red. Proto nebude pro experiment s MitoROS<sup>TM</sup> 520 prováděna výsledná analýza.

Na následujících snímcích (Obr. 7.4 a Obr. 7.5) jsou vedle sebe zobrazeny snímky jednotlivých misek prvního experimentu s fluorescenčním barvivem MitoSOX<sup>TM</sup> Red k srovnání intenzity fluorescence u obou antibiotik. Vlevo se vždy nacházejí snímky misek s antibiotikem penicilinem-streptomycinem a vpravo snímky misek s gentamicinem. Nahoře jsou předkládány snímky kontrolních misek. Snímky uprostřed zobrazují experimentální kultivační misky s doporučeným obsahem antibiotika. Dole jsou překládány snímky experimentálních kultivačních misek s dvojnásobným obsahem antibiotika.



Obr. 7.4: Nasnímané snímky prvního experimentu s penicilinem-streptomycinem (vlevo) a gentamicinem (vpravo): (A) kontrolní miska, (B) miska s doporučeným obsahem antibiotika, (C) miska s dvojnásobným obsahem antibiotika





Obr. 7.5: Nasnímané snímky prvního experimentu s penicilinem-streptomycinem (vlevo) a gentamicinem (vpravo): (A) kontrolní miska, (B) miska s doporučeným obsahem antibiotika, (C) miska s dvojnásobným obsahem antibiotika, zvětšeno 100x

Z výše uvedených snímků MSCs obarvených fluorescenčním barvivem MitoSOX<sup>TM</sup> Red lze pozorovat, že množství daného antibiotika v kultivačním médiu při kultivaci má vliv na výslednou intenzitu fluorescence, a tedy i na výslednou produkci superoxidů v mitochondriích. MSCs experimentálních misek s dvojnásobným obsahem antibiotika vykazují jednoznačně největší fluorescenci, naopak MSCs kontrolních misek vykazují nejmenší fluorescenci. MSCs lze detailněji pozorovat na snímcích nasnímaných pomocí objektivu se zvětšením 100x na Obr. 7.5. Výraznou fluorescenci vykazují buňky se známkami apoptózy, protože v nich dochází k akumulaci barviva. Ze snímků je patrné, že antibiotika mají vliv i na tvar buněk. V některých případech v experimentálních miskách MSCs nemají charakteristický vřetenovitý tvar a dochází k jejich zmenšení. Také lze ze snímků vidět, že gentamicin bude pro MSCs více toxický než penicilin-streptomycin.

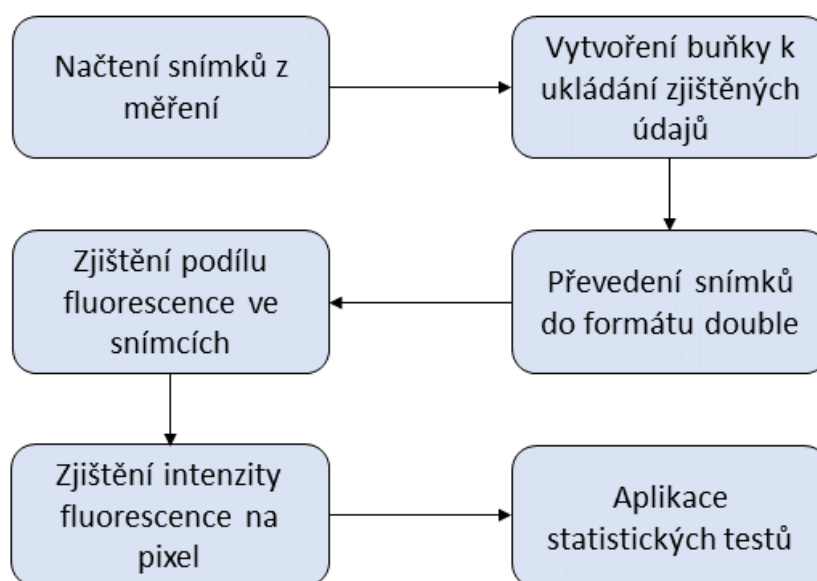
Výše uvedené závěry budou následně ověřeny pomocí statistických testů.

## 8 Zpracování dat

Cílem zpracování nasnímaných snímků pořízených během tří experimentů pro každé antibiotikum je určení intenzity fluorescence. Na základě tohoto parametru bude porovnána mitochondriální produkce superoxidů MSCs kultivovaných ve třech typech kultivačních médií (kultivační médium bez obsahu antibiotika, kultivační médium s doporučeným obsahem antibiotika a kultivační médium s dvojnásobným obsahem antibiotika). Podle výsledné produkce superoxidů bude porovnána toxicita antibiotik penicilinu-streptomycinu a gentamicinu na MSCs. Pomocí statistických testů budou vyhodnoceny výsledky experimentu.

### 8.1 Popis navrženého algoritmu v programovacím prostředí MATLAB

Za účelem analýzy nasnímaných snímků byl navržen algoritmus v programovacím prostředí MATLAB (verze R2020a), jehož schéma je zobrazeno níže na Obr. 8.1.



Obr. 8.1: Schéma navrženého algoritmu v programovacím prostředí MATLAB

Nejprve musí být zvolena cesta k nasnímaným snímkům z experimentu a vytvořeno pole buněk, do něhož se budou ukládat zjištěné parametry – název snímku a intenzita fluorescence na pixel. Snímky, na něž je aplikován výše uvedený algoritmus, jsou v šedotónové podobě. Pro všechny experimenty bylo nasnímáno 25 mikroskopických snímků pro každou misku. Dohromady bylo během jednoho experimentu nasnímáno 150 mikroskopických snímků. Algoritmus pomocí *for* cyklu

následně prochází všechny snímky daného experimentu ve formátu tif. Během cyklu jsou zjištěny rozměry snímku (dány nastavením rozlišení, *size*) a snímek je převeden do formátu double (*double*). V dalším kroku je zvýšena intenzita snímku (*imadjust*) a odstraněn šum (*activecontour*). Ve zmíněném *for* cyklu nalezneme vnořený *for* cyklus procházející jednotlivé pixely snímku. Ten slouží k určení celkové vykazované fluorescence buněk a počtu pixelů, které buňky ve snímku zaujímají. Celková intenzita fluorescence je dále přepočtena na intenzitu fluorescence na pixel vydělením celkové intenzity fluorescence počtem pixelů, které zaujímají buňky.

Algoritmus byl celkem spuštěn třikrát, jelikož byly provedeny 3 experimenty. Číselné hodnoty intenzit fluorescence na pixel pro jednotlivá měření u obou antibiotik jsou zapsány do následujících tabulek (Tab. 8.1 – Tab. 8.6).

Tab. 8.1: 1. měření pro antibiotikum penicilin-streptomycin

| 1. experiment - penicilin-streptomycin |                                 |                                           |                                            |
|----------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Snímek                                 | Kontrolní miska                 | Miska s doporučeným množstvím antibiotika | Miska s dvojnásobným množstvím antibiotika |
|                                        | Intenzita fluorescence na pixel | Intenzita fluorescence na pixel           | Intenzita fluorescence na pixel            |
| 1                                      | 13,766                          | 18,768                                    | 16,091                                     |
| 2                                      | 14,268                          | 16,544                                    | 15,597                                     |
| 3                                      | 14,548                          | 16,794                                    | 18,470                                     |
| 4                                      | 13,663                          | 17,632                                    | 16,724                                     |
| 5                                      | 13,980                          | 18,129                                    | 19,133                                     |
| 6                                      | 13,353                          | 15,007                                    | 18,088                                     |
| 7                                      | 13,520                          | 16,809                                    | 17,763                                     |
| 8                                      | 12,893                          | 16,932                                    | 17,990                                     |
| 9                                      | 12,007                          | 17,572                                    | 16,014                                     |
| 10                                     | 12,866                          | 15,232                                    | 16,151                                     |
| 11                                     | 15,253                          | 17,079                                    | 18,143                                     |
| 12                                     | 14,797                          | 16,644                                    | 19,671                                     |
| 13                                     | 13,173                          | 14,997                                    | 18,726                                     |
| 14                                     | 12,886                          | 17,017                                    | 17,344                                     |
| 15                                     | 14,752                          | 18,594                                    | 17,650                                     |
| 16                                     | 15,084                          | 14,481                                    | 18,085                                     |
| 17                                     | 16,652                          | 17,565                                    | 18,109                                     |
| 18                                     | 12,785                          | 16,436                                    | 17,374                                     |
| 19                                     | 12,120                          | 17,306                                    | 16,606                                     |
| 20                                     | 13,068                          | 17,678                                    | 18,593                                     |
| 21                                     | 12,224                          | 17,226                                    | 17,179                                     |
| 22                                     | 12,999                          | 15,048                                    | 16,290                                     |
| 23                                     | 14,067                          | 16,573                                    | 16,333                                     |
| 24                                     | 13,154                          | 18,219                                    | 19,542                                     |
| 25                                     | 14,198                          | 16,537                                    | 16,546                                     |

Tab. 8.2: 1. měření pro antibiotikum gentamicin

| 1. experiment - gentamicin |                                 |                                           |                                            |
|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Snímek                     | Kontrolní miska                 | Miska s doporučeným množstvím antibiotika | Miska s dvojnásobným množstvím antibiotika |
|                            | Intenzita fluorescence na pixel | Intenzita fluorescence na pixel           | Intenzita fluorescence na pixel            |
| 1                          | 13,791                          | 17,793                                    | 27,219                                     |
| 2                          | 14,453                          | 18,773                                    | 27,564                                     |
| 3                          | 14,277                          | 19,152                                    | 26,873                                     |
| 4                          | 13,658                          | 16,179                                    | 30,569                                     |
| 5                          | 11,431                          | 18,384                                    | 32,217                                     |
| 6                          | 12,663                          | 20,197                                    | 28,986                                     |
| 7                          | 12,306                          | 16,998                                    | 34,427                                     |
| 8                          | 11,441                          | 20,113                                    | 31,262                                     |
| 9                          | 13,560                          | 16,439                                    | 22,669                                     |
| 10                         | 13,035                          | 16,259                                    | 26,501                                     |
| 11                         | 12,938                          | 17,231                                    | 24,651                                     |
| 12                         | 12,851                          | 16,021                                    | 31,998                                     |
| 13                         | 13,481                          | 18,704                                    | 33,246                                     |
| 14                         | 12,462                          | 17,362                                    | 28,705                                     |
| 15                         | 13,935                          | 19,066                                    | 25,218                                     |
| 16                         | 12,675                          | 19,675                                    | 25,510                                     |
| 17                         | 12,511                          | 21,343                                    | 37,061                                     |
| 18                         | 12,939                          | 15,982                                    | 29,603                                     |
| 19                         | 12,729                          | 18,469                                    | 26,341                                     |
| 20                         | 12,284                          | 18,447                                    | 26,920                                     |
| 21                         | 11,469                          | 17,373                                    | 36,050                                     |
| 22                         | 13,400                          | 17,663                                    | 30,092                                     |
| 23                         | 11,605                          | 16,468                                    | 32,102                                     |
| 24                         | 11,721                          | 17,323                                    | 27,400                                     |
| 25                         | 13,179                          | 18,586                                    | 32,046                                     |

Tab. 8.3: 2. měření pro antibiotikum penicilin-streptomycin

| <b>2. experiment - penicilin-streptomycin</b> |                                    |                                                  |                                                   |
|-----------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Snímek</b>                                 | <b>Kontrolní miska</b>             | <b>Miska s doporučeným množstvím antibiotika</b> | <b>Miska s dvojnásobným množstvím antibiotika</b> |
|                                               | Intenzita fluorescence<br>na pixel | Intenzita fluorescence<br>na pixel               | Intenzita fluorescence<br>na pixel                |
| 1                                             | 13,195                             | 13,920                                           | 18,149                                            |
| 2                                             | 12,722                             | 15,975                                           | 18,216                                            |
| 3                                             | 13,347                             | 17,416                                           | 18,163                                            |
| 4                                             | 13,127                             | 17,816                                           | 18,277                                            |
| 5                                             | 15,994                             | 16,555                                           | 16,816                                            |
| 6                                             | 13,236                             | 13,815                                           | 16,990                                            |
| 7                                             | 14,312                             | 16,010                                           | 16,397                                            |
| 8                                             | 12,096                             | 17,303                                           | 15,648                                            |
| 9                                             | 13,528                             | 15,135                                           | 20,334                                            |
| 10                                            | 13,614                             | 15,477                                           | 19,005                                            |
| 11                                            | 13,588                             | 15,186                                           | 17,362                                            |
| 12                                            | 14,294                             | 15,256                                           | 17,024                                            |
| 13                                            | 12,957                             | 14,792                                           | 16,285                                            |
| 14                                            | 13,438                             | 15,415                                           | 21,164                                            |
| 15                                            | 13,804                             | 17,708                                           | 15,201                                            |
| 16                                            | 13,189                             | 14,341                                           | 17,753                                            |
| 17                                            | 12,423                             | 16,655                                           | 18,483                                            |
| 18                                            | 13,740                             | 14,846                                           | 15,609                                            |
| 19                                            | 13,152                             | 14,296                                           | 15,554                                            |
| 20                                            | 13,934                             | 16,083                                           | 17,133                                            |
| 21                                            | 13,432                             | 15,601                                           | 14,726                                            |
| 22                                            | 13,100                             | 13,998                                           | 16,733                                            |
| 23                                            | 14,102                             | 13,527                                           | 14,706                                            |
| 24                                            | 14,206                             | 15,301                                           | 14,533                                            |
| 25                                            | 12,809                             | 14,532                                           | 15,636                                            |

Tab. 8.4: 2. měření pro antibiotikum gentamicin

| <b>2. experiment - gentamicin</b> |                                    |                                                  |                                                   |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Snímek</b>                     | <b>Kontrolní miska</b>             | <b>Miska s doporučeným množstvím antibiotika</b> | <b>Miska s dvojnásobným množstvím antibiotika</b> |
|                                   | Intenzita fluorescence<br>na pixel | Intenzita fluorescence<br>na pixel               | Intenzita fluorescence<br>na pixel                |
| 1                                 | 12,655                             | 15,353                                           | 20,081                                            |
| 2                                 | 12,824                             | 12,937                                           | 17,616                                            |
| 3                                 | 11,751                             | 14,128                                           | 27,794                                            |
| 4                                 | 12,365                             | 18,271                                           | 15,874                                            |
| 5                                 | 11,536                             | 17,292                                           | 24,924                                            |
| 6                                 | 11,004                             | 14,029                                           | 23,456                                            |
| 7                                 | 11,909                             | 14,571                                           | 20,979                                            |
| 8                                 | 11,837                             | 14,319                                           | 21,904                                            |
| 9                                 | 12,224                             | 16,132                                           | 15,582                                            |
| 10                                | 11,375                             | 16,947                                           | 22,665                                            |
| 11                                | 11,131                             | 14,535                                           | 15,265                                            |
| 12                                | 12,167                             | 15,475                                           | 19,354                                            |
| 13                                | 12,757                             | 14,507                                           | 19,222                                            |
| 14                                | 12,152                             | 14,378                                           | 18,543                                            |
| 15                                | 11,780                             | 15,752                                           | 17,611                                            |
| 16                                | 12,648                             | 15,844                                           | 17,391                                            |
| 17                                | 12,783                             | 18,606                                           | 18,269                                            |
| 18                                | 11,249                             | 16,751                                           | 14,874                                            |
| 19                                | 11,993                             | 15,555                                           | 21,278                                            |
| 20                                | 11,201                             | 15,051                                           | 16,262                                            |
| 21                                | 12,248                             | 13,753                                           | 15,770                                            |
| 22                                | 11,330                             | 13,858                                           | 15,634                                            |
| 23                                | 13,308                             | 13,094                                           | 19,042                                            |
| 24                                | 12,064                             | 16,137                                           | 17,909                                            |
| 25                                | 12,390                             | 13,545                                           | 15,526                                            |



Tab. 8.5: 3. měření pro antibiotikum penicilin-streptomycin

| <b>3. experiment - penicilin-streptomycin</b> |                                    |                                                  |                                                   |
|-----------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Snímek</b>                                 | <b>Kontrolní miska</b>             | <b>Miska s doporučeným množstvím antibiotika</b> | <b>Miska s dvojnásobným množstvím antibiotika</b> |
|                                               | Intenzita fluorescence<br>na pixel | Intenzita fluorescence<br>na pixel               | Intenzita fluorescence<br>na pixel                |
| 1                                             | 10,499                             | 14,338                                           | 15,526                                            |
| 2                                             | 10,829                             | 14,106                                           | 14,932                                            |
| 3                                             | 10,298                             | 14,778                                           | 15,946                                            |
| 4                                             | 11,030                             | 15,010                                           | 14,911                                            |
| 5                                             | 11,049                             | 13,082                                           | 16,446                                            |
| 6                                             | 10,377                             | 14,077                                           | 16,738                                            |
| 7                                             | 10,886                             | 14,423                                           | 17,986                                            |
| 8                                             | 10,797                             | 15,007                                           | 18,005                                            |
| 9                                             | 11,239                             | 15,301                                           | 17,450                                            |
| 10                                            | 10,781                             | 13,178                                           | 14,557                                            |
| 11                                            | 10,867                             | 14,326                                           | 17,259                                            |
| 12                                            | 11,146                             | 14,237                                           | 17,434                                            |
| 13                                            | 11,181                             | 14,729                                           | 16,400                                            |
| 14                                            | 11,965                             | 14,653                                           | 16,159                                            |
| 15                                            | 12,463                             | 14,536                                           | 15,653                                            |
| 16                                            | 11,267                             | 15,103                                           | 16,841                                            |
| 17                                            | 10,911                             | 15,880                                           | 18,178                                            |
| 18                                            | 11,075                             | 14,454                                           | 15,050                                            |
| 19                                            | 10,676                             | 14,954                                           | 15,004                                            |
| 20                                            | 10,472                             | 13,674                                           | 15,231                                            |
| 21                                            | 10,625                             | 13,839                                           | 17,303                                            |
| 22                                            | 10,757                             | 14,349                                           | 17,554                                            |
| 23                                            | 10,779                             | 15,248                                           | 16,829                                            |
| 24                                            | 10,492                             | 15,220                                           | 16,475                                            |
| 25                                            | 10,794                             | 14,223                                           | 14,769                                            |

Tab. 8.6: 3. měření pro antibiotikum gentamicin

| 3. experiment - gentamicin |                                    |                                           |                                            |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Snímek                     | Kontrolní miska                    | Miska s doporučeným množstvím antibiotika | Miska s dvojnásobným množstvím antibiotika |
|                            | Intenzita fluorescence<br>na pixel | Intenzita fluorescence<br>na pixel        | Intenzita fluorescence<br>na pixel         |
| 1                          | 12,074                             | 14,262                                    | 14,713                                     |
| 2                          | 12,160                             | 14,801                                    | 16,156                                     |
| 3                          | 12,525                             | 14,591                                    | 15,439                                     |
| 4                          | 11,721                             | 14,812                                    | 18,608                                     |
| 5                          | 11,865                             | 15,982                                    | 15,191                                     |
| 6                          | 12,551                             | 14,171                                    | 17,122                                     |
| 7                          | 11,689                             | 15,862                                    | 15,721                                     |
| 8                          | 11,523                             | 18,255                                    | 15,644                                     |
| 9                          | 11,886                             | 15,106                                    | 15,639                                     |
| 10                         | 11,455                             | 13,738                                    | 14,282                                     |
| 11                         | 12,441                             | 15,350                                    | 15,780                                     |
| 12                         | 11,341                             | 14,693                                    | 16,777                                     |
| 13                         | 11,881                             | 15,949                                    | 16,059                                     |
| 14                         | 11,939                             | 16,422                                    | 16,696                                     |
| 15                         | 13,005                             | 14,996                                    | 17,591                                     |
| 16                         | 12,688                             | 16,323                                    | 15,314                                     |
| 17                         | 12,787                             | 16,268                                    | 18,107                                     |
| 18                         | 11,794                             | 14,857                                    | 16,539                                     |
| 19                         | 13,136                             | 14,005                                    | 13,875                                     |
| 20                         | 11,558                             | 14,676                                    | 14,215                                     |
| 21                         | 10,819                             | 13,822                                    | 14,344                                     |
| 22                         | 11,656                             | 14,246                                    | 15,136                                     |
| 23                         | 12,125                             | 14,553                                    | 14,802                                     |
| 24                         | 11,570                             | 13,830                                    | 16,446                                     |
| 25                         | 11,854                             | 14,426                                    | 15,904                                     |

## 9 Statistické vyhodnocení dat

Celkově byly provedeny tři experimenty s oběma antibiotiky a u každého byla zjištěna hodnota intenzity fluorescence na pixel. Ty jsou uvedeny ve výše uvedených tabulkách (Tab. 8.1 – Tab. 8.6). Byly zjištěny aplikací navrženého algoritmu na nasnímané snímky. Tyto hodnoty jsou důležité ke zhodnocení experimentu pomocí statistických testů. Statistická analýza je rozdělena na dvě části. V první části se zkoumá, jestli má množství daného antibiotika v kultivačním médiu vliv na výslednou fluorescenci, a tedy i množství mitochondriální produkce superoxidů. Druhá část je věnována toxicitě zvolených antibiotik - hodnocení vlivu typu zvoleného antibiotika na mitochondriální produkci superoxidů.

### 9.1 Hodnocení vlivu obsahu daného antibiotika v kultivačním médiu na mitochondriální produkci superoxidů

Ve všech testovacích skupinách (MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika) bude porovnána intenzita fluorescence na pixel. Bude ověřeno, jestli je střední hodnota intenzity fluorescence na pixel zhruba stejná ve všech testovacích skupinách.

Pro tento typ ověření se hodí použít analýzu rozptylu (ANOVA - Analysis of Variance), která umožňuje porovnat tři a více testovacích skupin. Jedná se tedy o rozšíření t-testu pro více než 2 testovací skupiny. Zvolena byla jednofaktorová ANOVA (one-way ANOVA, *anova1*), jelikož byl sledován účinek jednoho faktoru (množství daného antibiotika přidaného do kultivačního média na výslednou fluorescenci, tedy na výslednou mitochondriální produkci superoxidů). Jelikož se jedná o parametrickou metodu, musí být pro její použití splněny určité předpoklady, jinak musí být na data aplikován neparametrický Kruskalův-Wallisův test. Předpoklady, které musí být splněny k použití ANOVA testu:

- nezávislost testovacích skupin
- normální rozdělení dat ve všech testovacích skupinách
- shodný rozptyl ve všech testovacích skupinách

Pro ověření normálního rozdělení a shody rozptylů dat v testovacích skupinách byl v MATLABU použit vícevýběrový test o homogenitě rozptylů (*vartestn*). Jeho nulová hypotéza zní, že data mají normální rozdělení a jejich rozptyly jsou homogenní a může být na ně aplikován parametrický test. Alternativní hypotéza zní, že

data buď nemají normální rozložení, nebo nemají shodný rozptyl a musí být na ně aplikován neparametrický test. Výsledkem testu je p-hodnota, která je určující k zamítnutí či nezamítnutí nulové hypotézy. Nejčastěji se porovnává s hodnotou hladiny významnosti 0,05 či 0,01. Pokud je p-hodnota menší než zvolená hladina významnosti, nulová hypotéza se zamítá a platí tak hypotéza alternativní.

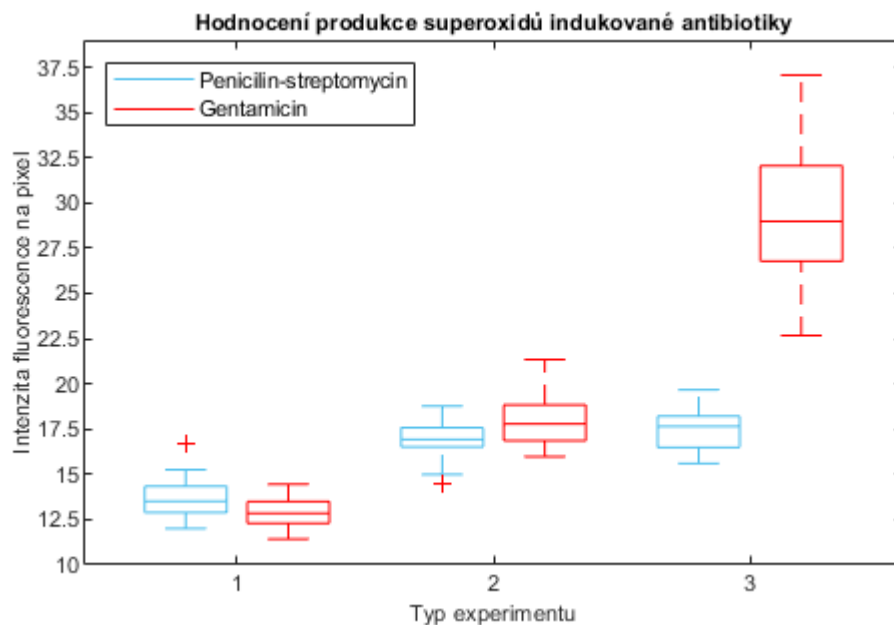
ANOVA či Kruskalův-Wallisův test prověřuje nulovou hypotézu, že se střední hodnoty všech testovacích skupin mezi sebou neliší. Podle alternativní hypotézy se alespoň jedna dvojice střední hodnotou liší. Z výsledku provedeného testu nelze zjistit, jaké testovací skupiny se liší. K vyhledání dvojic testovacích skupin s odlišnou střední hodnotou slouží post-hoc test.

V tabulce Tab. 9.1 jsou vypsány výsledné p-hodnoty vícevýběrového testu, výsledné použité testy na data z jednotlivých měření a jejich výsledná p-hodnota a s ní i platná hypotéza pro dané měření. Dle platné hypotézy je z tabulky zřejmé, že nebyly prokázány stejné střední hodnoty intenzity fluorescence ve všech skupinách jednotlivých měření. P-hodnota zvolených testů je ve všech měřeních menší než zvolená hladina významnosti 0,05. Bylo tedy prokázáno, že množství antibiotika v kultivačním médiu během kultivace MSCs má vliv na výslednou intenzitu fluorescence, tedy mitochondriální produkci superoxidových radikálů.

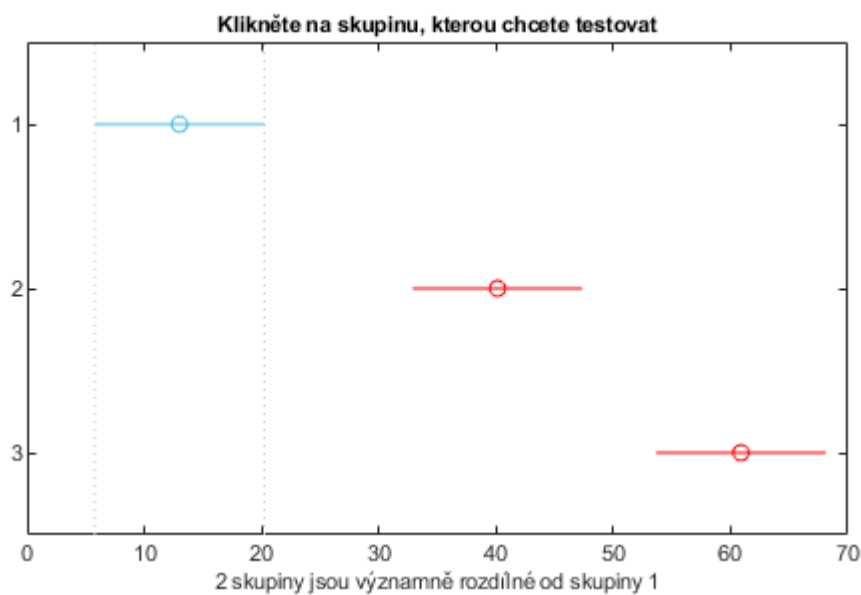
Tab. 9.1: Tabulka výsledných p-hodnot vícevýběrového testu, použitých testů, výsledných p-hodnot zvolených testů a platných hypotéz u jednotlivých měření první části statistické analýzy

| experiment                             | p-hodnota<br>vícevýběrového testu | použitý test       | p-hodnota              | platná hypotéza |
|----------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------|-----------------|
| 1. experiment - penicilin-streptomycin | 0,963                             | ANOVA              | $3,034 \cdot 10^{-19}$ | alternativní    |
| 2. experiment - penicilin-streptomycin | $9,434 \cdot 10^{-4}$             | Kruskalův-Wallisův | $4,283 \cdot 10^{-11}$ | alternativní    |
| 3. experiment - penicilin-streptomycin | $9,758 \cdot 10^{-5}$             | Kruskalův-Wallisův | $6,648 \cdot 10^{-14}$ | alternativní    |
| 1. experiment - gentamicin             | $5,533 \cdot 10^{-11}$            | Kruskalův-Wallisův | $9,473 \cdot 10^{-11}$ | alternativní    |
| 2. experiment - gentamicin             | $1,430 \cdot 10^{-12}$            | Kruskalův-Wallisův | $4,283 \cdot 10^{-11}$ | alternativní    |
| 3. experiment - gentamicin             | 0,001                             | Kruskalův-Wallisův | $6,648 \cdot 10^{-14}$ | alternativní    |

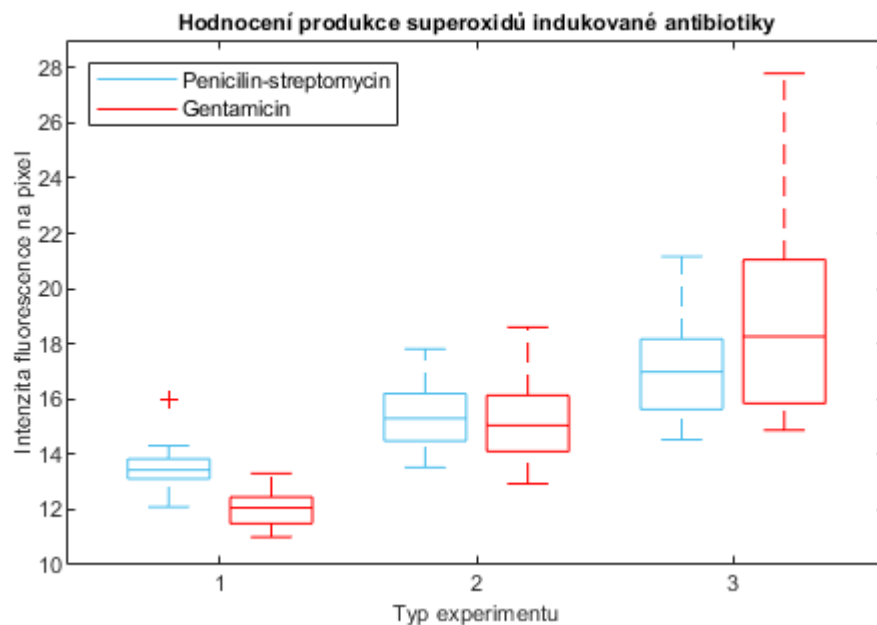
Na následujících obrázcích (Obr. 9.1 a Obr. 9.2) lze pozorovat grafické výstupy statistického testu konkrétně pro 1. experiment. Již ze znázornění rozložení dat pomocí krabicového grafu též boxplotu (Obr. 9.1) je zřejmé, že hodnoty intenzity fluorescence se v jednotlivých testovacích skupinách výrazně liší. Na Obr. 9.2 je znázorněn výstup post-hoc testu prvního experimentu s penicilinem-streptomycinem. Například při vybrání první testovací skupiny si lze všimnout, že zbylé dvě testovací skupiny jsou významně rozdílné. Na obrázcích Obr. 9.3 a Obr. 9.5 jsou zobrazeny krabicové grafy druhého a třetího experimentu. Post-hoc testy druhého a třetího experimentu s penicilinem-streptomycinem nalezneme na obrázcích Obr. 9.4 a Obr. 9.6



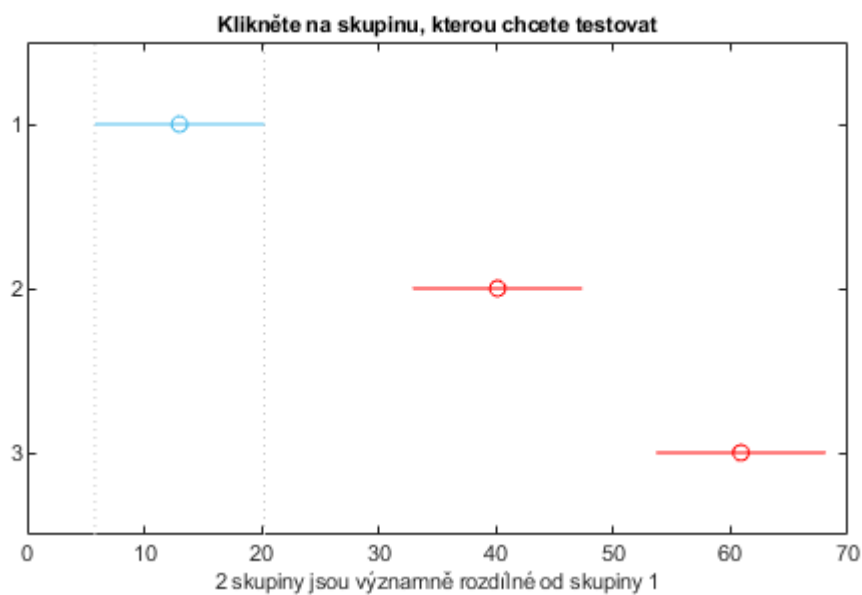
Obr. 9.1: Krabicový graf intenzity fluorescence na pixel prvního experimentu: (1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika



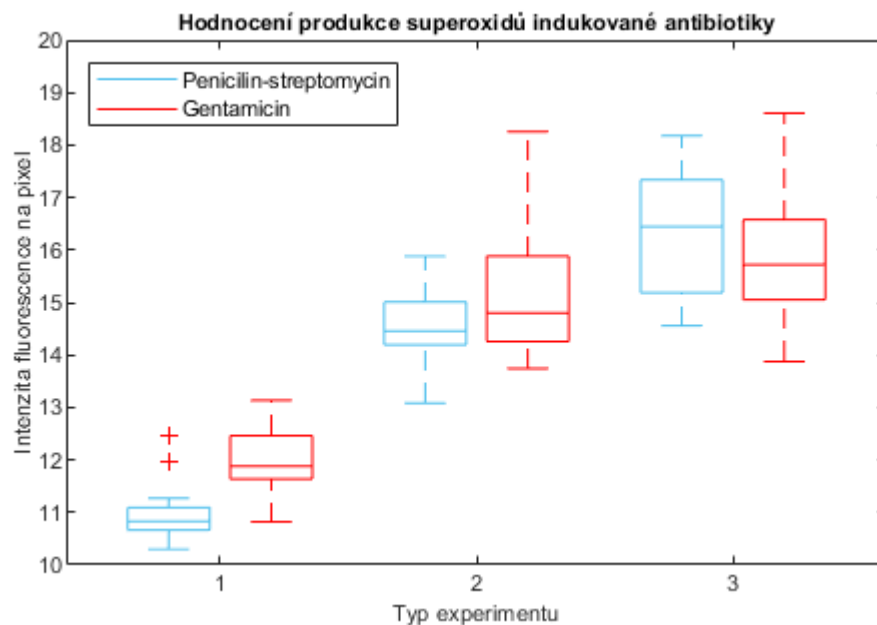
Obr. 9.2: Post-hoc test prvního experimentu s penicilinem-streptomycinem: (1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika



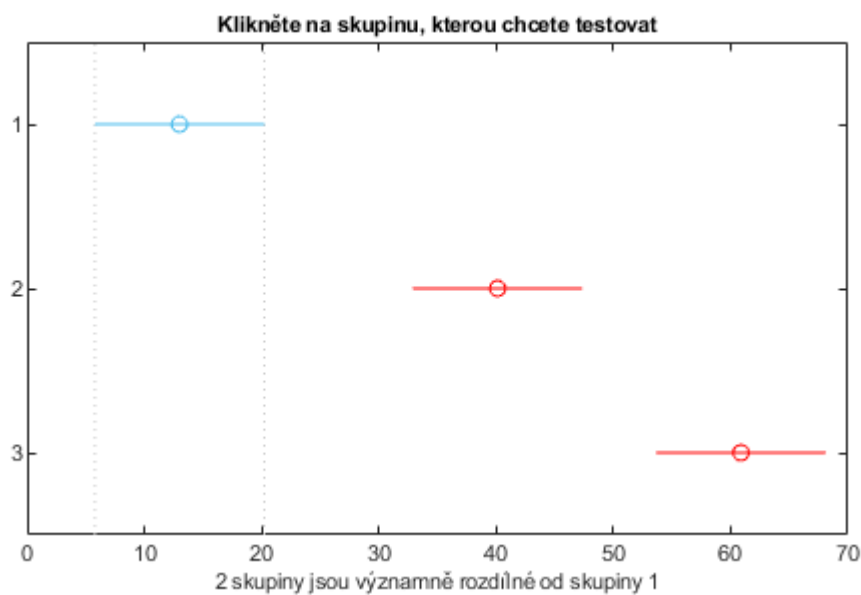
Obr. 9.3: Krabicový graf intenzity fluorescence na pixel druhého experimentu: (1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika



Obr. 9.4: Post-hoc test druhého experimentu s penicilinem-streptomycinem: (1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika



Obr. 9.5: Krabicový graf intenzity fluorescence na pixel třetího experimentu: (1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika



Obr. 9.6: Post-hoc test třetího experimentu s penicilinem-streptomycinem: (1) MSCs kultivované v kultivačním médiu bez antibiotika, (2) MSCs kultivované v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, (3) MSCs kultivované v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika

## 9.2 Hodnocení vlivu typu zvoleného antibiotika na mitochondriální produkci superoxidů

V této části statistické analýzy chceme zjistit, zda se fluorescence u jiných typů antibiotik liší, konkrétně chceme dokázat, zda se liší mitochondriální produkce superoxidů po přidání penicilinu-streptomycinu anebo gentamicinu do média při kultivaci buněk. Zde budou porovnány pouze testovací skupiny MSCs kultivovaných v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika a MSCs kultivovaných v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika. Analýza kontrolních skupin je nesmyslná.

K analýze je vhodné použít nepárový t-test (*ttest2*). Opět se jedná o parametrický test s určitými předpoklady k jeho použití. Alternativou je neparametrický Mannův-Whitneyův test. Použití parametrického nepárového t-testu má 2 předpoklady:

- normální rozdělení dat v rámci testovacích skupin
- shodný rozptyl v obou testovacích skupinách

První předpoklad lze ověřit pomocí p-hodnoty Shapirova-Wilkova testu (*swtest*). Jelikož tento test není v MATLABU naimplementován, byl stažen jako funkce z jeho webové stránky pod názvem Shapiro-Wilk and Shapiro-Francia normality tests ve verzi 1.1.0.0 od Ahmeda BenSaïda [45]. Druhý předpoklad lze ověřit pomocí F-testu (*vartest2*). Pokud se pomocí p-hodnoty Shapirova-Wilkova testu či p-hodnoty F-testu prokáže, že nelze použít parametrický test, musí být použit test neparametrický. Aby byl použit neparametrický test, stačí prokázat nenormální rozložení dat v alespoň jedné testovací skupině či zamítnutí shody rozptylu v obou testovacích skupinách. Jelikož v MATLABU není naimplementován Mannův-Whitneyův test, musela by být použita jeho alternativa Wilcoxonův test hmotnostního součtu (*ranksum*).

Nulová hypotéza nepárového t-testu či Wilcoxonova testu hmotnostního součtu říká, že jsou průměry obou testovacích skupin stejné. V případě alternativní hypotézy se průměry obou testovacích skupin liší. Podle p-hodnoty zvoleného testu pak zamítáme či nezamítáme nulovou hypotézu o shodě průměrů.

V tabulce Tab. 9.2 jsou vypsány výsledné p-hodnoty Shapirova-Wilkova testu k ověření normálního rozdělení intenzity fluorescence na pixel pro penicilin-streptomycin a gentamicin. Také v ní nalezneme výslednou p-hodnotu F-testu ověřující shodnost rozptylu v obou testovacích skupinách. Z výsledných p-hodnot testů lze vyčíst, že pro první porovnání antibiotik v doporučeném množství v kultivačním médiu lze použít parametrický nepárový t-test, jelikož jsou všechny výsledné p-hodnoty větší než zvolená hladina významnosti 0,05. Parametrický nepárový t-test nelze použít v případě třetího porovnání antibiotik v doporučeném množství v kultivačním mé-



diu, jelikož není splněn předpoklad normálního rozdělení intenzity fluorescence na pixel u gentamicinu a zároveň není splněn i předpoklad shodného rozptylu v obou testovacích skupinách.

Tab. 9.2: Tabulka p-hodnot Shapirova-Wilkova testu pro penicilin-streptomycin a gentamicin a p-hodnot F-testu k ověření předpokladů použití parametrického nepárového t-testu druhé části statistické analýzy

| porovnání antibiotik                                                | p-hodnota SW testu<br>pro penicilin-streptomycin | p-hodnota SW testu<br>pro gentamicin | p-hodnota F-testu     |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1. porovnání antibiotik v doporučeném množství v kultivačním médiu  | 0,174                                            | 0,368                                | 0,277                 |
| 2. porovnání antibiotik v doporučeném množství v kultivačním médiu  | 0,343                                            | 0,352                                | 0,344                 |
| 3. porovnání antibiotik v doporučeném množství v kultivačním médiu  | 0,639                                            | 0,014                                | 0,023                 |
| 1. porovnání antibiotik v dvojnásobném množství v kultivačním médiu | 0,4577                                           | 0,777                                | $3,090 \cdot 10^{-7}$ |
| 2. porovnání antibiotik v dvojnásobném množství v kultivačním médiu | 0,356                                            | 0,005                                | 0,002                 |
| 3. porovnání antibiotik v dvojnásobném množství v kultivačním médiu | 0,155                                            | 0,708                                | 0,758                 |

V tabulce Tab. 9.3 jsou vypsány výsledné použité testy na jednotlivá porovnání toxicity zvolených antibiotik, jejich p-hodnota a s ní i platná hypotéza pro dané porovnání. Dle platné hypotézy je z tabulky zřejmé, že nebyla zcela prokázána shoda průměrů obou testovacích skupin jednotlivých porovnání. P-hodnota zvolených testů ve třech případech byla vyšší než zvolená hladina významnosti 0,05. Lze říci, že pokud se MSCs kultivují v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, ať už penicilinu-streptomycinu či gentamicinu, tak typ zvoleného antibiotika nemá vliv na výslednou intenzitu fluorescence, a tedy na mitochondriální produkci superoxidu. Jestliže se MSCs kultivují v kultivačním médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika, ať už penicilinu-streptomycinu či gentamicinu, tak typ zvoleného antibiotika může mít vliv na výslednou intenzitu fluorescence, a tedy na mitochondriální produkci superoxidů.

Tab. 9.3: Tabulka použitých testů, výsledných p-hodnot zvolených testů a platných hypotéz druhé části statistické analýzy

| porovnání antibiotik                                                | použitý test    | p-hodnota             | platná hypotéza |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| 1. porovnání antibiotik v doporučeném množství v kultivačním médiu  | nepárový t-test | 0,003                 | alternativní    |
| 2. porovnání antibiotik v doporučeném množství v kultivačním médiu  | nepárový t-test | 0,533                 | nulová          |
| 3. porovnání antibiotik v doporučeném množství v kultivačním médiu  | Wilcoxonův test | 0,1206                | nulová          |
| 1. porovnání antibiotik v dvojnásobném množství v kultivačním médiu | Wilcoxonův test | $1,416 \cdot 10^{-9}$ | alternativní    |
| 2. porovnání antibiotik v dvojnásobném množství v kultivačním médiu | Wilcoxonův test | 0,040                 | alternativní    |
| 3. porovnání antibiotik v dvojnásobném množství v kultivačním médiu | nepárový t-test | 0,137                 | nulová          |

Na výše uvedených krabicových grafech (Obr. 9.1, Obr. 9.3 a Obr. 9.5) v kapitole 9.1 lze pozorovat rozložení intenzity fluorescence na pixel v obou testovacích skupinách pro jednotlivá měření. Je z nich patrné, že typ antibiotika obsaženého v kultivačním médiu má vliv na výslednou fluorescenci, čím se částečně potvrdil výsledek zvolených statistických testů. V případech, kdy byla platná nulová hypotéza, jsou hodnoty intenzity fluorescence na pixel u gentamicinu ve větším rozsahu. Patrnější rozdíl v intenzitě fluorescence na pixel u zvolených antibiotik lze pozorovat u MSCs kultivovaných s dvojnásobným množstvím antibiotika. Z výsledných krabicových grafů lze usoudit, že gentamicin je pro MSCs více toxický než penicilin-streptomycin.

# Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit, že při přidání antibiotika do kultivačních misek dojde k zvýšení fluorescence, jelikož přidání antibiotika způsobuje zvýšení produkce superoxidů v mitochondriích.

Bakalářská práce je členěna na dvě základní části - teoretickou a praktickou. V teoretické části byla provedena literární rešerše týkající se role mitochondrií, oxidačního stresu a antibiotik. Závěr teoretické části je věnován kultivaci buněk, popisu mezenchymálních kmenových buněk a fluorescenčním barvivům - konkrétně MitoROS<sup>TM</sup> 520 a MitoSOX<sup>TM</sup> Red.

V praktické části byl navržen vhodný experiment. V této části jsou vypsány postupy jednotlivých kroků navrženého experimentu. Experiment spočíval v kultivaci buněčné linie MSCs v kultivačním médiu s doporučeným obsahem antibiotika, v následné pasáži těchto buněk a přípravy misek. Jedna miska sloužila jako kontrolní, kde byly buňky kultivovány v médiu bez obsahu antibiotika. Na dalších dvou miskách byl proveden experiment. Buňky první experimentální misky byly kultivovány v médiu s doporučeným obsahem antibiotika. Buňky druhé experimentální misky byly kultivovány v médiu s dvojnásobným obsahem antibiotika. Antibiotika použítá v této bakalářské práci byla penicilin-streptomycin a gentamicin. Následně byly tyto buňky obarveny pomocí fluorescenčních barviv. Ze zmíněných důvodů v kapitole 7 bylo použito především fluorescenční barvivo MitoSOX<sup>TM</sup> Red. Po obarvení buněk byly tyto buňky snímány pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 X. Experiment byl otestován s dostatečným počtem opakování. Celkem byly provedeny tři experimenty pro každé antibiotikum. Pro každou misku všech experimentů bylo nasnímáno 25 mikroskopických snímků. V rámci jednoho experimentu tedy šlo o akvizici 150 mikroskopických snímků.

K analýze nasnímaných snímků byl vytvořen algoritmus v programovacím prostředí MATLAB, jehož schéma lze vidět na Obr. 8.1. Cílem algoritmu byla analýza úrovně fluorescence v nasnímaných snímcích. Získané hodnoty fluorescence na pixel u všech typů misek byly analyzovány pomocí statistických testů.

První analýza byla věnována sledování množství produkovaných superoxidů na základě obsahu antibiotika v kultivačním médiu. K hodnocení fluorescence na pixel u jednotlivých testovacích skupin byla využita parametrická ANOVA či neparametrický Kruskalův-Wallisův test. Byla porovnána střední hodnota fluorescence všech testovacích skupin. Z výsledků statistických testů je patrné, že se průměrná hodnota fluorescence ve všech testovacích skupinách liší a mezi testovacími skupinami lze pozorovat významný rozdíl. Lze konstatovat, že množství antibiotika v kultivačním médiu má vliv na výslednou fluorescenci, a tedy i množství produkce superoxidů v mitochondriích. Pomocí statistických testů byl tedy potvrzen fakt, že při přidání

antibiotika do kultivačních misek dochází k zvýšení fluorescence, jelikož přidání antibiotika způsobuje zvýšení produkce superoxidů v mitochondriích.

Druhá analýza byla věnována toxicitě zvolených antibiotik. K hodnocení toxicity zvolených antibiotik u testovacích skupin byl využit parametrický nepárový t-test či neparametrický Wilcoxonův test hmotnostního součtu. Na základě výsledků testů lze říci, že i typ zvoleného antibiotika může mít vliv na výslednou fluorescenci. Gentamicin je pro MSCs více toxický než penicilin-streptomycin. Jako důkaz slouží výsledné hodnoty testů a i fakt, že MSC v experimentálních miskách měnily svůj tvar. MSCs kultivované v gentamicinu byly oproti MSCs kultivovaných v penicilinu-streptomycinu menší a často neměly charakteristický vřetenovitý tvar. Také se v těchto experimentálních miskách nacházelo větší množství buněk vykazující známky apoptózy, u nichž docházelo k akumulaci barviva a jejichž fluorescence byla značná.

# Literatura

- [1] SCHEFFLER, Immo E. *Mitochondria*. 2nd ed. San Diego: Wiley-Blackwell, 2007. ISBN 9780470040737.
- [2] NEWMAN, Tim. What are mitochondria? *MEDICAL NEWS TODAY* [online]. February 2018 [cit. 2021-10-06]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/320875#aging>
- [3] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-0-4.
- [4] *Genetika-Biologie* [online]. [cit. 2021-10-08]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/genetika-mitochondrii>
- [5] CHEN, Yuxin, Zhongyang ZHOU a Wang MIN. Mitochondria, Oxidative Stress and Innate Immunity. *Frontiers in Physiology* [online]. 2018, 9 [cit. 2021-10-08]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: [doi:10.3389/fphys.2018.01487](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01487)
- [6] Dýchací řetězec a tvorba ATP. *Funkce buněk a lidského těla* [online]. [cit. 2021-10-13]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/7-dychaci-retezec-a-tvorba-atp/>
- [7] DOSTÁL, Jiří. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-5020-4.
- [8] Dýchací řetězec. *www.studiumbiochemie.cz* [online]. [cit. 2021-10-13]. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/dr.html>
- [9] *Dýchací řetězec* [online]. [cit. 2021-10-14]. Dostupné z: [https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002\\_v1/hesla/retezec\\_dychaci.html](https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/retezec_dychaci.html)
- [10] DEAVALL, Damian G., Elizabeth A. MARTIN, Judith M. HORNER a Ruth ROBERTS. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology* [online]. 2012, 2012, 1-13 [cit. 2021-10-17]. ISSN 1687-8191. Dostupné z: [doi:10.1155/2012/645460](https://doi.org/10.1155/2012/645460)
- [11] ROKYTA, Richard, Václav HOLEČEK, Petr NOHEL a René VLASÁK. Oxidační stres: jeho stanovení, nemoci jím způsobené a jeho snižování antioxidanty. *Vesmír* [online]. 2011, 2011(6) [cit. 2021-10-18]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2011/cislo-6/oxidacni-stres.html>

- [12] ROKYTA, Richard, Václav HOLEČEK a Pavel STOPKA. Volné radikály: Nemoci, které lze ovlivnit antioxidanty. *Vesmír* [online]. 2006, 2006(10) [cit. 2021-10-21]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2006/cislo-10/volne-radikaly.html>
- [13] STRATIL, Pavel a Vlastimil KUBÁŇ. *Reaktivní kyslíkové radikály, přírodní antioxidanty a jejich zdravotní účinky*. Český Těšín: 2 THETA, 2018. ISBN 978-80-86380-91-9.
- [14] MUDR. JAN, Pláteník, PhD. *Reaktivní formy kyslíku v lidském těle, Výzbroj fagocytů* [online]. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1.LF UK [cit. 2021-10-22]. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/1928/ros-cze1516-dent1b.pdf>
- [15] SCIALÓ, Filippo, Daniel J. FERNÁNDEZ-AYALA a Alberto SANZ. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Frontiers in Physiology* [online]. 2017, 8 [cit. 2021-10-21]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: [doi:10.3389/fphys.2017.00428](https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00428)
- [16] HATFIELD, Spring. Oxidative Stress: Will Future Solutions Launch Antioxidant Therapies for Dentistry? *Today's RDH* [online]. October 2019 [cit. 2021-11-18]. Dostupné z: <https://www.todaysrdh.com/oxidative-stress-will-future-solutions-launch-antioxidant-therapies-for-dentistry/>
- [17] RACEK, Jaroslav. *Oxidační stres a jeho ovlivnění*. Praha: Galén, c2003. Repetitorium. ISBN 8072622315.
- [18] GUILLOUZO, André a Christiane GUGUEN-GUILLOUZO. Antibiotics-induced oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology* [online]. 2020, 20-21, 23-28 [cit. 2021-11-01]. ISSN 24682020. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cotox.2020.03.004](https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.03.004)
- [19] KALGHATGI, Sameer, Catherine S. SPINA, James C. COSTELLO, et al. Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. *Science Translational Medicine* [online]. 2013, 5(192) [cit. 2021-11-01]. ISSN 1946-6234. Dostupné z: [doi:10.1126/scitranslmed.3006055](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006055)
- [20] *Penicillin-Streptomycin* [online]. [cit. 2021-11-11]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/p4333?context=product>
- [21] *Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)* [online]. [cit. 2021-11-11]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15140122>

- [22] SCHAFFER, Thomas W., Andrea PASCALE, Gerard SHIMONASKI a Paul E. CAME. Evaluation of Gentamicin for Use in Virology and Tissue Culture. *Applied Microbiology* [online]. 1972, 23(3), 565-570 [cit. 2021-11-01]. ISSN 0003-6919. Dostupné z: doi:10.1128/am.23.3.565-570.1972
- [23] *Gentamicin solution* [online]. [cit. 2021-11-11]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/g1272?context=product>
- [24] *Gentamicin (50 mg/mL)* [online]. [cit. 2021-11-11]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15750078>
- [25] VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury* [online]. [cit. 2021-10-22]. Dostupné z: <https://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
- [26] SLABÝ, Ondřej. *Molekulární medicína*. Praha: Galén, c2015. ISBN 978-80-7492-121-6.
- [27] Buněčné a tkáňové kultury. *Biologie a genetika pro bakaláře* [online]. [cit. 2021-10-23]. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-bunecne\\_a\\_tkanove\\_kultury&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-bunecne_a_tkanove_kultury&lang=cz)
- [28] *Kultivace buněk in vitro* [online]. [cit. 2021-10-23]. Dostupné z: [https://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky\\_MM09.pdf](https://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky_MM09.pdf)
- [29] ČEDÍKOVÁ, M., K. KRAKOROVÁ, M. MIKLÍKOVÁ, M. HRONOVÁ, A. BALANDOVÁ, P. PITULE a M. KRÁLÍČKOVÁ. *On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů* [online]. 2012 [cit. 2021-11-12]. Dostupné z: [http://histologie.lfp.cuni.cz/wp-content/files/On-line\\_atlas\\_kmenovych\\_bunek.pdf](http://histologie.lfp.cuni.cz/wp-content/files/On-line_atlas_kmenovych_bunek.pdf). Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.
- [30] CONA, Louis A. *What are Mesenchymal Stem Cells (MSCs)?* [online]. May 2021 [cit. 2021-11-12]. Dostupné z: <https://www.dvcstem.com/post/what-are-mesenchymal-stem-cells>
- [31] GOMEZ-SALAZAR, Mario, Zaniah N. GONZALEZ-GALOFRE, Joan CASAMITJANA, Mihaela CRISAN, Aaron W. JAMES a Bruno PÉAULT. Five Decades Later, Are Mesenchymal Stem Cells Still Relevant? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2020, 8 [cit. 2021-11-12]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00148

- [32] PAVLÍKOVÁ, Michaela. *Role vybraných buněčných populací a molekul při zánětlivé a odhojovací reakci* [online]. Praha, 2012 [cit. 2021-11-13]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/41132>. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie. Vedoucí práce RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.
- [33] Isolation of MSCs from Neonatal and Adult Tissues. *Creative Cell* [online]. [cit. 2021-11-13]. Dostupné z: [http://www.creativecell.hu/stemcell\\_msc\\_isol.html](http://www.creativecell.hu/stemcell_msc_isol.html)
- [34] Úvod do živočišných buněčných kultur. *Baria* [online]. [cit. 2021-10-23]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/uvod-do-zivocisnych-bunecnych-kultur/>
- [35] NOVÁK, Jiří. *Studium buněk I kultivace* [online]. 2015 [cit. 2021-10-23]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/podzim2015/Bi5596/um/METHODS-Class03-cell\\_lines\\_I.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/podzim2015/Bi5596/um/METHODS-Class03-cell_lines_I.pdf)
- [36] How to do a Proper Cell Culture Quick Check. *Leica* [online]. [cit. 2021-11-07]. Dostupné z: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/>
- [37] BEZUCHA, Hynek Jindřich. Testy životaschopnosti a Počítání buněk. *DOCPLAYER* [online]. [cit. 2021-11-12]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/23611390-Tema-testy-zivotaschopnosti-a-pocitani-bunek.html>
- [38] Mitochondria. *AAA Bioquest* [online]. [cit. 2021-11-07]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/catalog/cell-structures-and-organelles-mitochondria>
- [39] MitoLite Red FX600. *AAA Bioquest* [online]. [cit. 2021-11-07]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/products/mitolite-red-fx600>
- [40] MitoTracker Red CMXRos. *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2021-11-07]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M7512>
- [41] JC-10 Superior alternative to JC-1. *AAA Bioquest* [online]. [cit. 2021-11-07]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/products/jc-10-superior-alternative-to-jc-1>
- [42] Cell Meter Fluorimetric Mitochondrial Superoxide Activity Assay Kit Green Fluorescence. *AAA Bioquest* [online]. [cit. 2021-10-28]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/products/cell-meter-fluorimetric-mitochondrial-superoxide-activity-assay-kit-green-fluorescence>



- [43] MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator, for live-cell imaging. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M36008>
- [44] Fibronectin bovine plasma. *Merck* [online]. [cit. 2022-03-25]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/f4759>
- [45] BENSÁIDA, Ahmed. Shapiro-Wilk and Shapiro-Francia normality tests. In: *Math Works* [online]. [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/13964-shapiro-wilk-and-shapiro-francia-normality-tests>
- [46] Human Fibronectin Coating. *Corning* [online]. [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://www.corning.com/in/en/products/life-sciences/products/surfaces/fibronectin.html>

## Seznam symbolů a zkratek

|                         |                                                            |
|-------------------------|------------------------------------------------------------|
| <i>TOM</i>              | Vnější proteinová translokáza                              |
| <i>TIM</i>              | Vnitřní proteinová translokáza                             |
| <i>ATP</i>              | Adenosintrifosfát                                          |
| <i>ADP</i>              | Adenosindifosfát                                           |
| <i>CoA</i>              | Acetylkoenzym A                                            |
| <i>NADH</i>             | Nikotinamidadenindinukleotid                               |
| <i>FADH<sub>2</sub></i> | Flavinadenindinukleotid                                    |
| <i>CoQ</i>              | Koenzym Q                                                  |
| <i>CoQH<sub>2</sub></i> | Ubichinol                                                  |
| <i>FMN</i>              | Flavinmononukleotid                                        |
| <i>FMNH<sup>-</sup></i> | Flavinmononukleotid                                        |
| <i>CoQ<sup>-</sup></i>  | Semichinon                                                 |
| <i>CoQH<sup>·</sup></i> | Ubisemichinon                                              |
| <i>ROS</i>              | Reaktivní formy kyslíku                                    |
| <i>LDL</i>              | Nízkodenzitní lipoprotein                                  |
| <i>MnSOD</i>            | Managan superoxiddismutáza                                 |
| <i>CuZnSOD</i>          | Měď–zinek superoxiddismutáza                               |
| <i>FBS</i>              | Fetální bovinní sérum                                      |
| <i>PBS</i>              | Fosfátový pufr                                             |
| <i>HEPES</i>            | Kyselina N'–2–hydroxyethylpiperazin–N'–2 ethansulfonová    |
| <i>TES</i>              | N–Tris(hydroxymethyl)methyl–2–aminoethansulfonová kyselina |
| <i>DMEM</i>             | Dulbecco modifikované Eaglovo médium                       |
| <i>MSC</i>              | Mezenchymální kmenové buňky                                |
| <i>HBSS</i>             | Hankův balancovaný solný roztok                            |

..