



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO  
PROSTŘEDÍ**

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

**STANOVENÍ VYBRANÝCH CHEMOTERAPEUTIK V  
EXTRACELULÁRNÍCH VESIKULECH POMOCÍ ICP  
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**

ANALYSIS OF CHEMOTHERAPEUTICS IN EXTRACELLULAR VESICLES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Simona Kožnarová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Mgr. Michaela Vašinová Galiová, Ph.D.**

**BRNO 2021**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1575/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Studentka: **Simona Kožnarová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Michaela Vašinová Galiová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Stanovení vybraných chemoterapeutik v extracelulárních vesikulech pomocí ICP hmotnostní spektrometrie

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování literární rešerše zahrnující výzkum v oblasti chemoterapeutik, komunikaci mezi buňkami a využití ICP–MS v této oblasti výzkumu.
2. Optimalizace rozkladu vzorků extracelulárních vesikulů.
3. Příprava metodiky pro analýzu pomocí ICP–MS.
4. Analýza extracelulárních vesikulů a zhodnocení výsledků.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Simona Kožnarová  
student(ka)

-----  
doc. Mgr. Michaela Vašinová Galiová,  
Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Extracelulární vesikuly jsou poměrně nově objeveným způsobem mezibuněčné komunikace. Problematika těchto membránou ohraničených váčků je stále značně neprobádaná, a to především na poli jejich role při nádorových onemocněních. Cílem této pilotní studie bylo pokusit se detekovat platinu ve vesikulech pomocí ICP-MS. Pro tento účel byly použity vzorky z buněčných linií nádorů ovarií, které byly vystaveny platinovým derivátům (typ chemoterapeutika). Tato metoda se ukázala jako schopná nejen platinu detekovat, ale i spolehlivě stanovit její koncentraci. Množství platiny ve vesikulech se pohybovalo kolem 1–2 % z celkově dodanému množství platiny do systému. Výsledky se lišily dle použitého platinového derivátu, buněčné linie a počtu buněk, kterými byly vesikuly uvolňovány. Nejvíce platiny bylo stanoveno ve vesikulech linie SK-OV-3, která je na tuto léčbu přirozeně rezistentní, a to u všech platinových derivátů. Využití ICP-MS je tedy vhodné i pro další výzkum této problematiky.

## **ABSTRACT**

Extracellular vesicles are a newly discovered way of cell-to-cell communication. The issue is still significantly unexplored, especially in the case of cancer. The goal of this pilot study was to attempt to detect platinum contained in extracellular vesicles by ICP-MS. In this study, samples of ovarian cancer cell lines treated with platinum derivatives, a type of chemotherapeutic drug, were used. This method was proved as able to detect platinum, even as able to determine its concentration reliably. The quantity of platinum in vesicles was around 1–2 % of the total platinum added to the system. The results varied according to the used platinum derivative, the cell line and the number of cells releasing the vesicles. Most platinum was determined in vesicles of the SK-OV-3 line, which is naturally resistant to this treatment, for all platinum derivatives. From these results it can be concluded that the use of ICP-MS is also advisable for additional research on this issue.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

extracelulární vesikuly, exosomy, chemoterapeutika, platinové deriváty, ICP-MS, buněčné linie nádorů ovarií, nádorová onemocnění

## **KEYWORDS**

extracellular vesicles, exosomes, chemotherapeutics, platinum derivatives, ICP-MS, ovarian cancer cell lines, cancer

KOŽNAROVÁ, Simona. *Stanovení vybraných chemoterapeutik v extracelulárních vesikulech pomocí ICP hmotnostní spektrometrie*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131353>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Michaela Vašinová Galiová.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych velice poděkovala doc. Mgr. Michaele Vašinové Galiové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Děkuji také doc. Mgr. Romanu Hrstkovi, Ph.D. a Mgr. Petru Voňkovi z Masarykova onkologického ústavu (MOÚ) za přípravu biologických vzorků. Mé poděkování patří též RNDr. Pavlu Coufalíkovi, Ph.D. a Bc. Tadeáši Uhrovi za pomoc s rozklady vzorků. Dále také RNDr. Ondřeji Zvěřinovi, Ph.D. za provedení kontrolního měření pomocí ET-AAS a Mgr. Ing. Lubomíru Prokešovi, Ph.D. za pomoc se statistickým vyhodnocením.

# Obsah

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1	BUŇKY A BUNĚČNÁ KOMUNIKACE .....	10
2.1.1	Buňky jako základní jednotka biologie .....	10
2.1.2	Základní typy komunikace .....	10
2.1.3	Vnitrobuněčné (intracelulární) signální dráhy .....	12
2.1.4	Extracelulární vesikuly .....	12
2.2	EXOSOMY .....	13
2.2.1	Biogeneze .....	13
2.2.2	Funkce .....	14
2.2.3	Role v nádorové biologii .....	15
2.2.4	Izolace .....	16
2.3	CHEMOTERAPEUTIKA .....	17
2.4	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .....	18
2.4.1	Historie .....	18
2.4.2	Hmotnostní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu .....	19
2.4.3	Instrumentace .....	20
2.4.3.1	Zavádění vzorku do plazmatu .....	21
2.4.3.2	Iontový zdroj .....	21
2.4.3.3	Rozhraní mezi iontovým zdrojem a hmotnostním spektrometrem .....	23
2.4.3.4	Iontová optika .....	23
2.4.3.5	Analyzátor .....	24
2.4.3.6	Iontový detektor .....	25
2.4.4	Hmotnostní spektrum .....	25
2.4.4.1	Interference .....	25
2.4.5	Porovnání s jinými metodami .....	27
2.4.5.1	Atomová absorpční spektrometrie .....	27
2.4.5.2	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem .....	28
2.4.6	Využití ICP-MS pro analýzu exosomů .....	29

3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
3.1	Seznam použitých chemikálií .....	30
3.2	Seznam použitých pomůcek a přístrojů .....	30
3.3	Vzorky a jejich příprava.....	32
3.3.1	Kultivační podmínky .....	35
3.3.2	Odebrání vzorků médií a exosomů.....	35
3.4	Pracovní postupy a použitá metodika .....	36
3.4.1	Rozklady vzorků.....	36
3.4.1.1	Nastavení mikrovlnného analyzátoru během rozkladů.....	36
3.4.1.2	Exosomy .....	36
3.4.1.3	Média .....	37
3.4.2	Příprava vzorků pro analýzu exosomů a médií .....	37
3.4.3	Externí kalibrace.....	37
3.4.4	Optimalizace ICP hmotnostního spektrometru.....	38
3.4.5	ICP-MS analýza exosomů .....	39
3.4.6	ICP-MS analýza médií.....	39
3.4.7	Kontrolní měření na ET-AAS.....	40
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	41
4.1	Stanovení Pt v exosomech .....	41
4.1.1	Kalibrace.....	41
4.1.2	Kontrolní měření možné kontaminace .....	42
4.1.3	Stanovení Pt v mineralizovaných vzorcích exosomů a jejich verifikace .....	42
4.2	Stanovení Pt v médiích .....	48
4.2.1	Kalibrace.....	49
4.2.2	Kontrolní měření možné kontaminace .....	49
4.2.3	Stanovení Pt v mineralizovaných vzorcích médií a jejich verifikace.....	50
5	ZÁVĚR.....	57
6	SEZNAM ZKRATEK.....	58
7	ZDROJE .....	59



# 1 ÚVOD

Medicína prošla za poslední století značným pokrokem. S tím šel ruku v ruce i vývoj diagnostických metod a možnosti léčby onkologických onemocnění. Jedním ze způsobů léčby je využití chemoterapeutik. Chemoterapeutika jsou skupinou léků s cytostatickými účinky (utlumování množení především rychle dělících se buněk), které tedy ovlivňují hlavně nádorové buňky a ty zdravé výrazně méně. Jedná se však o poměrně širokou skupinu látek s různorodou organickou strukturou. Jednou z těchto skupin jsou i hojně využívané platinové deriváty, které jsou předmětem této práce.

Dalším posunem v oblasti medicíny a biologie obecně byl objev extracelulárních vesikulů. Tyto membránou ohraničené váčky se zprvu zdáli pouze jako způsob, jakým se buňky zbavují odpadního materiálu. Dnes se však ukazuje, že hrají významnou roli jako jeden ze způsobů, jakým spolu buňky komunikují. Bylo potvrzeno, že jsou přítomny jak u fyziologických, tak u patologických procesů probíhajících lidském těle, například se může jednat o proces imunitní odezvy, kterou mohou ovlivňovat pozitivním i negativním způsobem. Na základě toho lze usuzovat, že mají svou roli i při distribuci chemoterapeutik během léčby, kdy jsou chemoterapeutika z buněk vylučována právě prostřednictvím extracelulárních vesikulů. Konkrétně se předpokládá, že buňky vylučují takzvané exosomy, což je jeden z typů těchto vesikulů.

Tato bakalářská práce je pilotní studií, jejímž cílem je ověřit možnost využití ICP-MS pro detekci platiny v chemoterapeuticích, která jsou vylučována buňkami nádorů ovarií pomocí extracelulárních vesikulů. V případě kladných výsledků se pak pokusit i o stanovení, které by nastínilo, zda jsou některá chemoterapeutika vylučována více než jiná, případně jak se od sebe liší výsledky získané z různých buněčných linií.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 BUŇKY A BUNĚČNÁ KOMUNIKACE

#### 2.1.1 Buňky jako základní jednotka biologie

Vše živé je tvořeno buňkami, výjimku tvoří pouze skupina *nebuněčných*, například viry a viroidy. Jedním ze základních třídění buněk je dělení na *prokaryotické* a *eukaryotické*. **Prokaryota**, například *bakterie* či *sinice*, jsou evolučně velmi staré jednobuněčné organismy bez pravého jádra a v podstatě bez organel. Oproti tomu organismy disponující buňkou (jednobuněční) či více buňkami (mnohobuněční) s jasně ohraničeným *jádrem* se nazývají **eukaryota**. Jednobuněčných eukaryot existuje celá řada, patří mezi ně například prvoci, řasy a kvasinky. Všechny složité mnohobuněčné organismy (houby, rostliny, živočichové) mají těla tvořena výhradně eukaryotickými buňkami, v jejich tělech se buňky specializují na konkrétní funkci. Eukaryotické buňky obsahují kromě *jádra* i další *organely*, mezi ty hlavní patří například *mitochondrie*, *lyzosity*, *ribosomy*, *endoplazmatické retikulum* a *Golgiho aparát*. Tyto organely se nacházejí v *cytoplazmě*, vnitřním prostředí buňky, která je od svého okolí oddělena *cytoplazmatickou membránou*. [1]

V tělech všech živých organismů na Zemi probíhá mnoho složitých metabolických a samoregulačních procesů. Tyto pochody jsou o to komplikovanější v tělech mnohobuněčných organismů, jelikož správné fungování jejich těla vyžaduje schopnost buněk komunikovat mezi sebou. [2]

#### 2.1.2 Základní typy komunikace

Principem komunikace mezi buňkami neboli **buněčné signalizace** je *příjem a transdukce signálu* (převod formy informace ve formu jinou) ze *signalizující buňky* směrem k *buňce cílové*. Proces je zajištěn díky produkci specifických molekul signalizující buňkou a jejich následnému zachycení *receptorovým proteinem* buňky cílové. Receptorové proteiny lze chápat jako převodníky signálu, s jejichž pomocí se signálem přenášená informace dostane až do cílové buňky, kde vyvolá specifickou odpověď. Pokud buňka nedisponuje receptorem pro danou molekulu, vyslaný signál na ni nemá žádný vliv. [2, 3]

Pro signalizaci je buňkami využíváno značné množství různých druhů molekul (proteiny, peptidy, aminokyseliny, nukleotidy, ale i rozpuštěné plyny). Avšak všechny tyto molekuly jsou využívány v rámci několika základních typů komunikace: **endokrinní, parakrinní, neuronová a dotyková**. Přestože buňky mohou využívat stejné signální molekuly při více

typech signalizace, jednotlivé druhy signalizace mají rozdílnou selektivitu a rychlost přenosu signálu k cíli. [2]

**Endokrinní signalizace** představuje nejrozšířenější typ komunikace v lidském těle. Funkci signálních molekul zde plní *hormony*. Jejich produkci zajišťují *endokrinní buňky* žláz s vnitřní sekrecí, které je následně vyloučí do krve nebo lymfatického systému. Hormony jsou dále krevním řečištěm roznášeny po celém těle, tudíž mohou ovlivnit široké spektrum cílových buněk v rozdílných částech těla. Mnoho hormonů ovlivňuje více než jeden typ cílových buněk v různých tkáních, tudíž ovlivňuje více pochodů zároveň. [2–4]

**Parakrinní signalizace** má pouze lokální působení. Signální molekuly, *lokální mediátory*, pronikají do extracelulárního média v okolí signální buňky. Cílovými buňkami tak mohou být pouze buňky nacházející se v jejím sousedství, působení této signalizace je tedy pouze lokální. Mezi příklady použití parakrinní signalizace patří regulace zánětu a proliferace (množení buněk například při hojení ran). [2]

Pojem **neuronová signalizace**, jak již název napovídá, označuje speciální typ komunikace mezi neurony. Neuron se skládá z *těla neuronu*, *axonu* a *dendritů*. Dendrity jsou kratší výběžky přijímající signály, jeden neuron obvykle disponuje větším počtem těchto výběžků. Axon je oproti dendritům dlouhý výběžek vedoucí signál směrem od neuronu, z toho je patrné, že přenos funguje pouze jedním směrem. Dojde-li k aktivaci neuronu signálem z okolí, neuron vyše elektrické impulzy axonem směrem k cílové buňce. Na konci axonu dochází k transdukcii signálu na jeho extracelulární formu, vyloučí se *nervový mediátor*, který difunduje úzkou štěrbinou mezi membránou zakončení axonu a membránou dendritu cílového neuronu. Tento funkční kontakt se nazývá *synapse*. Ačkoli se signál přenáší jen mezi sousedními buňkami, může účinně působit na velké vzdálenosti. Vysoká rychlost této signalizace zajišťuje správné fungování nervového systému. [2, 5]

**Dotyková signalizace** neboli *přímý kontakt* je nejdokonalejším způsobem komunikace ze všech, ale k uskutečnění potřebuje dotyk dvou sousedních buněk. Díky tomu však nevyžaduje uvolnění vylučované molekuly. Buňky spolu komunikují svými povrchy, jež jsou tvořeny plazmatickými membránami, na či ve kterých jsou ukotveny signální molekuly. K přenosu signálu dochází, když se signální molekula naváže k receptoru, který je vsazen v plazmatické membráně buňky cílové. [2]

*Propojení cytoplazmy dvou buněk* umožňuje výměnu malých molekul pomocí kanálků v membránách. Tato komunikace se uplatňuje například při kontrakci srdeční svaloviny. [3]

### 2.1.3 Vnitrobuněčné (intracelulární) signální dráhy

Příjem signálu z okolí je obvykle zprostředkován pomocí *receptorového proteinu*, každá buňka jich má pouze omezené množství, tudíž může reagovat jen na omezený počet signálů současně. Pomocí kombinace signálů lze dosáhnout rozmanitých odpovědí buňky. Jindy může mít naopak jeden signál velké množství účinků, kdy na něj různé buňky reagují různým způsobem. Například acetylcholin způsobí zpomalení srdečního tepu, pokud mu jsou vystaveny buňky srdečního svalstva, pokud se jedná o buňky slinné žlázy, dojde k vylučování složek slin. Po přijetí signálu z okolí receptorem dochází uvnitř buňky k *signálním kaskádám*, tedy k dalšímu přenosu signálu uvnitř buňky. Tento proces je zakončen odpovědí buňky, což může ku příkladu být exprese genu či aktivace cytoskeletu (buněčné kostry). [2]

### 2.1.4 Extracelulární vesikuly

Dalším, nově zkoumaným, typem komunikace mezi buňkami jsou **extracelulární vesikuly (EV)**. Jedná se o membránou ohraničené váčky, jež jsou vylučovány buňkami většiny typů organismů od bakterií a prvoků po rostliny a živočichy včetně člověka. Dříve se předpokládalo, že tyto váčky jsou pouhým buněčným odpadem. Ukázalo se však, že hrají důležitou roli v mnoha oblastech biologie, například v mikrobiologii, imunologii, neurobiologii a biologii krve (konkrétně například při koagulaci a zástavě krvácení). U člověka lze EV najít ve všech tělních tekutinách, což potvrzuje, že jejich význam je nemalý. EV se podílí nejen na fyziologickém fungování organismu, ale svou roli hrají například i u neurodegenerativních či nádorových onemocnění. [6, 7]

EV mohou mít různá dělení například dle jejich specifické funkce či podle buněčného původu. Ačkoli tyto termíny mají své opodstatnění v rámci specializovaného oboru pro obecnější použití je výhodné rozdělení na *ektosomy* a *exosomy*. Bohužel toto rozdělení může mít různé definice, nejčastěji se však používá rozdělení podle mechanismu jejich vzniku. Zatímco **ektosomy** jsou větší o rozměrech 100–1 000 nm a vznikají pučením plazmatické membrány, **exosomy** mají typicky velikost pouhých 40–100 nm a obvykle vznikají vyprázdněním *endosomů* (multivesikulárních tělísek) vzniklých endocytózou (příjem látek buňkou) do vnějšího prostoru buňky. Oba typy obsahují cytoplazmatické proteiny, mediátorovou RNA, další krátké nekódující RNA a případně i další složky, které pak přenášejí mezi buňkami. Tyto dva hlavní typy však nejsou jediné EV, existují například ještě *apoptotická tělíška* vznikající při rozpadu buňky po apoptóze (naprogramovaná buněčná smrt), dosahují velikosti 1–4  $\mu\text{m}$  a obsahují cytoplazmatické proteiny, fragmenty jádra a organel. [6–8]

## 2.2 EXOSOMY

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.4 *exosomy* lze definovat více způsoby. Vedle mechanismu jejich vzniku je lze definovat jako vylučované vesikuly, které "mohou plnit fyziologickou funkci", nebo jako vesikuly, které sedimentují pouze po diferenciální centrifugaci při zrychlení minimálně 70 000–100 000× g. Tyto způsoby rozlišení jsou však méně přesné a méně se používají. [7]

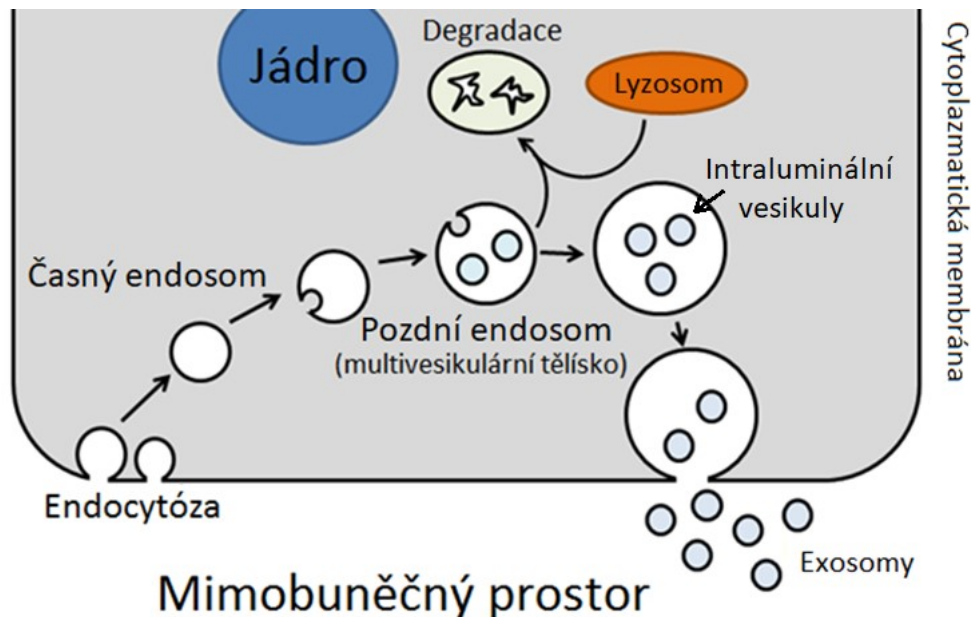
Pojem *exosom* vznikl v 80. letech minulého století a byl původně používán pro vesikuly uvolňované při zrání retikulocytů (nezralé červené krvinky), nicméně jejich původ zůstával nejasný. O deset let později bylo zjištěno, že exosomy jsou obdobnou cestou uvolňovány i B-lymfocyty a dendritickými buňkami. Postupně se ukázalo, že exosomy jsou tvořeny velkým počtem typů buněk a byly izolovány v různých tělních tekutinách (sperma, krev, moč, sliny, mateřské mléko, plodová voda, mozkomíšní mok a žluč). Na přelomu 21. století se přisoudily exosomům a obecně EV konkrétní funkce, navíc byly popsány dva odlišné procesy uvolňování EV z buněk. Tyto odlišné procesy vzniku odlišily *exosomy* a *ektosomy*. Jestliže EV vznikají přímým pučením přímo z cytoplazmatické membrány buňky, jedná se o **ektosomy**. V případě, že EV pochází z membránou ohraničeného *endosomu*, který vznikl endocytózou, po jehož sloučení s cytoplazmatickou membránou dochází k vytlačování EV nazývaného **exosom** z buněčného povrchu. Uvolněné exosomy mohou následně buď zůstat v mimobuněčném prostoru blízko buňky, nebo se dostanou do tělních tekutin a putovat do vzdálených míst. [8–10]

### 2.2.1 Biogeneze

Biogeneze neboli vznik exosomů zahrnuje dva procesy: *formování multivesikulárního tělíska a uvolnění vesikulů*. **Formování multivesikulárního tělíska** začíná *endocytózou*, procesem, kdy buňka absorbuje molekuly či jiný materiál a vede ke vzniku *časného endosomu*, membránového vesikulu uvnitř buňky. Následně dochází k pučení stěny endosomu do jeho vnitřního prostoru, což vede k vytvoření *intraluminální vesikulů* uvnitř endosomu. Tím dochází ke vzniku *multivesikulárního tělíska* neboli *pozdního endosomu*. Na tomto procesu se podílí především *mechanismus ESCRT* (Endosomal Sorting Complex Required for Transport, endosomální třídící komplex nutný pro transport). ESCRT komplexy se podílejí na třídění proteinů a remodelaci membrán. Kromě toho ESCRT zprostředkovávají také pučení. Avšak existují i ESCRT-nezávislé mechanismy vzniku multivesikulárních tělísek. [11, 12]

Multivesikulární tělísko může mít následně dvojí osud. Buď je buňkou určeno k degradaci pomocí *lyzozomu*, což je organela, která se může spojovat s endosomy nebo jinými organelami

a následovně je rozložit po uvolnění do vnitřního prostoru lyzozomu, nebo dojde k **uvolnění vesikulů** pomocí *exocytózy*. *Exocytóza* je proces, kdy v tomto případě dochází ke spojení multivesikulárního tělíska s cytoplazmatickou membránou, které je zprostředkováno vytvořením specifických komplexů SNARE. Poté následuje uvolnění obsahu tělíska do mimobuněčného prostoru. Uvolněné *intraluminální vesikuly* se následně nazývají *exosomy*. Celý proces je schematicky shrnut v Obrázek 1. [11, 12]



Obrázek 1: Schéma biogeneze exosomů (upraveno) [13]

### 2.2.2 Funkce

EV komunikují s jinými buňkami buď uvolněním svých jednotlivých látek krátce po jejich uvolnění, nebo přímým kontaktem s cílovými buňkami, které se mohou nacházet v těsné blízkosti, nebo i v relativně velké vzdálenosti a dostávají se k nim krevním řečištěm či lymfou. Tento kontakt je zprostředkován pomocí receptorů cílové buňky a molekul (například proteinů) vystavených na povrchu exosomu. Důsledky tohoto přenosu mohou být významné obdobně jako při jiných typech mezibuněčné komunikace. Stejně jako na signální molekuly i na exosomy reagují pouze cílové buňky, které mají příslušné receptory. Jako typický příklad signálu, který exosom nese, může být inhibice či stimulace cílové buňky. Jednou z variant kontaktu s cílovou buňkou je „převalování“ exosomů přes povrch buněk. Poté se exosomy zastaví, navážou se na povrch buněčných proteinů a receptorů a přenesou látky dovnitř buněk. Další možností je splynutí cytoplazmatických membrán. [12]

### 2.2.3 Role v nádorové biologii

Kromě normálně fungujících buněk mohou exosomy uvolňovat také nádorové buňky. U pacientů trpících nádorovým onemocněním lze v tělních tekutinách detekovat exosomy pocházející právě z nádoru. Nádorové exosomy mohou nést různé signály. Jedním z efektů, který mohou exosomy u onkologických pacientů mít, je vyšší srážlivost krve. Dále mohou mít signály nesené exosomy jak negativní následky pro pacienta, například: stimulace růstu nádoru, angiogenezi (tvorba cév zásobujících nádor), rozvoj metastáz, tak pozitivní dopad při vyvolání *specifické imunitní odpovědi*. [9, 14, 15]

**Imunitní odpověď v nádorové biologii** může být zprostředkována buď *nespecifickou*, nebo *specifickou imunitou*. **Nespecifická imunita**, tedy imunita vrozená, nemá paměť, tudíž reaguje na všechny antigeny a cizorodé látky stejně. Přestože rakovinné buňky mají podobné složení vnější části cytoplazmatické membrány jako okolní nenádorové buňky, může docházet k nespecifické imunitní odpovědi, při které dochází k rozpoznání nádorových buněk *makrofágy* a *NK (natural killer) buňkami*, které jsou schopny je efektivně likvidovat. [16]

**Specifická imunita** je imunita získaná/adaptivní. Při její aktivaci dochází ke specifické odpovědi na konkrétní antigen. Nádorové buňky mohou na svém povrchu mít specifické antigeny, podobně nádorové exosomy mohou na svém povrchu nést stejné antigeny jako nádorová buňka, což může přispět k dalšímu rozvoji imunitní odpovědi. Tyto antigeny mohou být zachyceny *antigen prezentující buňkou* (APC – antigen presenting cell), například se může jednat o B-lymfocyty či dendritické buňky, které je následně vystaví na svém povrchu. Zde je mohou zachytit T-lymfocyty, které nejen ničí nádorové buňky, ale řídí i celou imunitní odpověď. V důsledku této imunitní reakce může docházet k inhibici růstu nádorů. Tento proces je významný především u počátečních stádií rakoviny. [15–17]

V pozdějších stádiích se však exosomy mohou podílet i na *imunosupresi* (stav snížené imunity, omezená schopnost reagovat na antigen), jelikož potlačují aktivitu T-lymfocytů a NK, což vede k rozvoji rakoviny. [15]

Kromě toho bylo zjištěno, že nádorové buňky rezistentní na chemoterapii uvolňují exosomy výrazně více než buňky na chemoterapeutika citlivé. Vzhledem k tomu, že exosomy se nacházejí v krevním řečišti, nabízí se tím potenciální cesta k brzkému odhalení vzniku rezistence na chemoterapii během léčby. Předpokládá se, že chemoterapeutika mohou být z buněk prostřednictvím exosomů vylučována, což snižuje jejich účinnost, a je to tak jeden z možných mechanismů rezistence. Na druhé straně se již uvažuje o využití kultivovaných exosomů jako o nástroji umožňujícím doručení léčiva na specifické místo. Navíc často nebývají rozpoznány složkami nespecifické imunity, která by je mohla eliminovat. [9, 18–20]

#### 2.2.4 Izolace

Aby bylo možné exosomy studovat, je nutné je oddělit od zbytku matrice. Toho lze dosáhnout různými způsoby. Standardně se pro izolaci exosomů využívá diferenciální centrifugace, která zahrnuje několik kroků centrifugace a ultracentrifugace. V některých případech se první kroky centrifugace nahrazují mikrofiltračními technikami, což může mít pozitivní vliv na čistotu izolovaných exosomů i rychlost celého procesu. Po ultracentrifugaci může následovat další čištění získaných exosomů například centrifugace se sacharózovým gradientem. Vedle centrifugace lze využít dalších alternativních metod například: mikrofluidní techniky, precipitační metody, filtrační technologie a magnetické kuličky potažené protilátkami. [21]

**Magnetické kuličky potažené protilátkou** lze použít i pro nádorové exosomy, protože na sobě mají buněčně specifické proteiny, které lze použít jako značky pro tuto izolaci. Metoda umožňuje vysoce účinnou a specifickou izolaci exosomů. Je však důležité poznamenat, že tato metoda není vhodná pro velké objemy vzorků a zachycené exosomy si nemusí zachovat svoji funkčnost, i když se úspěšně vymyjí z povrchu kuliček. Pro zmenšení objemu se využívá například předběžná centrifugace či jiná metoda odstranění přebytečné tekutiny. [21]

Pracovní postup se dá zjednodušit do tří kroků. V prvním kroku se odebere médium buněčné kultury. Předběžné obohacení se provádí buď ultracentrifugací, nebo srážením. Používají se také alternativní metody, jako je filtrace nebo rozměrově vylučovací (gelová permeační) chromatografie. Ve druhém kroku se provádí specifický záchyt pomocí povrchových antigenů exosomů. Třetím krokem je eluce samotných exosomů. [22]



## 2.3 CHEMOTERAPEUTIKA

Chemoterapie je vedle chirurgických zákroků, radioterapie a hormonální terapie základní metodou sloužící k léčbě nádorových onemocnění. Chemoterapeutika, tedy léčiva využívaná při chemoterapii, jsou takzvaná *cytostatika* a využívají se především při léčbě zhoubných nádorů. *Cytostatika* jsou cytotoxické látky, které postihují hlavně buňky připravené k dělení, díky tomu působí hlavně na rychle se dělící buňky nádoru. Při tom dochází k poškození procesu dělení, což může u buněk vyvolat i apoptózu (programovaná buněčná smrt). Pomalu se dělící buňky, jež tvoří většinu zdravých tkání, zůstávají z větší části neovlivněny. Pokud se však nádor skládá z diferenciováných buněk, které se dělí pomalu, léčba na něj také nebude mít příliš velký vliv. Kvůli neselektivní povaze chemoterapeutik patří k jejich vedlejším účinkům vypadávání vlasů, poruchy trávicího ústrojí, snížení obranyschopnosti či neplodnost. [23, 24]

Z pohledu mechanismu účinku lze chemoterapeutika rozdělit na: látky vedoucí k inhibici syntézy nukleových kyselin, látky poškozující dělicí vřeténko, látky porušující syntézu proteinů a látky vedoucí k poruše struktury nukleové kyseliny, sem patří i takzvané *platinové deriváty*, jejichž analýzou v exosomech se zabývá tato práce. Kromě platiny se využívají i organokovové sloučeniny na bázi jiných kovů, například železo, titan, ruthenium a zirkonium. Tyto látky se obecně nazývají **metaloceny** a dle svého kovu následně například *ferroceny*, *zirkonoceny* či *rhutenoceny*. [23, 25, 26]

## 2.4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrii (MS – *Mass Spectrometry*) je možno rozdělit na *atomovou MS* tedy anorganickou, jejíž pomocí lze stanovit takřka všechny prvky periodické soustavy (například ICP-MS) a *molekulovou MS* tedy organickou, která umožňuje získání informací i o strukturách stanovovaných molekul pomocí vícestupňové (postupné) ionizace, příkladem může být MALDI (matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace). MS je možno využít jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu, díky tomu se hmotnostní spektrometry pro svoji univerzálnost často využívají například v plynové či kapalinové chromatografii jako detektory. [27, 28]

### 2.4.1 Historie

Základy hmotnostní spektrometrie položil na začátku 20. století anglický fyzik a objevitel elektronu *Joseph John Thompson*. V roce 1907 zhotovil zařízení, jež vytvářelo elektrický oblouk v nádobě obsahující malé množství plynu. Díky elektrickému výboji došlo k uvolnění elektronů z molekul plynu, a tak vznikla řada kladně nabitých iontů o různé hmotnosti. Thompson zjistil, že pomocí elektrického a magnetického pole mohou být ionty urychlovány a lze ovlivňovat jejich trajektorii. Po průchodu magnetickým polem se proud iontů ohnul obdobně jako světlo po průchodu hranolem a po dopadu těchto iontů na fotografickou desku na ní zanechaly jasné pruhy. Tyto pruhy měly charakteristické umístění odpovídající poměru hmotnosti ku náboji, pro různé látky tak byly získány specifické vzory. První funkční hmotnostní spektrometr se sektorovým analyzátozem byl vyvinut v roce 1922 *Francisem Williamem Astonem*. [29, 30]

Zprvu byla hmotnostní spektrometrie využívána pro objevování nových stabilních izotopů a stanovení jejich zastoupení či jejich přesné atomové hmotnosti. Právě změření přesné atomové hmotnosti iontů umožnilo významný objev na poli jaderné chemie (1923). Ukázalo se, že hmotnost jednotlivých izotopů se nerovná pouhému součtu hmotností jednotlivých nukleonů v jádře, ale je charakterizována také pomocí *hmotnostního úbytku jádra*, jež je přímo úměrný vazebné energii jádra. Po naměření přesných hmotností množství izotopů se tak potvrdila Einsteinova rovnice *ekvivalence hmoty a energie*. [31–33]

V roce 1934 došlo k významnému pokroku v anorganické MS díky využití *elektrické jiskry* jako iontového zdroje pro přímou analýzu *elektricky vodivých pevných látek* například kovů či grafitu. Další roky se nesly v duchu snahy dále vylepšit sektorový analyzátor. V roce 1952 Johnson a Nier zkonstruovali sektorový analyzátor s dvojitou fokusací, což umožnilo vysoce přesné měření hmotností izotopů. První komerční sektorový analyzátor s dvojitou fokusací byl

uveden v roce 1957. Tato zařízení byla však značně objemná, proto se vývoj od čtyřicátých let zaměřil také na takzvané „nemagnetické“ hmotnostní spektrometry, kde byl těžký magnet nahrazen *kvadrupólovým analyzátozem*. Tato zařízení disponovala výrazně nižší hmotností, rozměry a cenou, díky čemuž lépe splňovala požadavky chemické analýzy v průmyslu. První komerční kvadrupólový hmotnostní spektrometr byl představen v roce 1968. Ačkoli kvadrupólové hmotnostní spektrometry nejsou tak přesné jako ty sektorové, díky své rychlosti jsou dodnes hojně používané při analýzách v organické i anorganické MS. Při anorganických analýzách se zejména využívá spojení hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem jako iontovým zdrojem. [33]

#### **2.4.2 Hmotnostní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu**

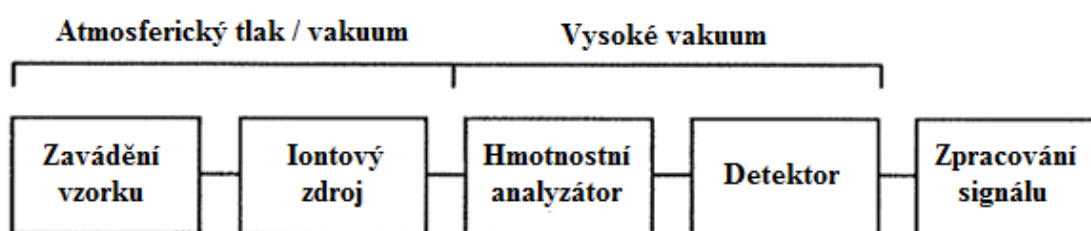
Hmotnostní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu, z anglického *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MS), se řadí do atomové MS. Tato moderní analytická metoda umožňuje stanovení většiny prvků periodického systému s velmi nízkou mezí detekce, řádově se jedná o hodnoty nižší než jednotky  $\mu\text{g/l}$ , v některých případech může rozlišení dosahovat až jednotek  $\text{ng/l}$ , mez detekce se liší v závislosti na stanovovaném prvku a analyzované matrici. Díky využití ICP jakožto iontového zdroje probíhá ionizace naprosté většiny atomů do prvního stupně, separace iontů dle jejich  $m/z$  tedy odpovídá jejich hmotnosti. [27, 35]

ICP-MS je pro svoji vysokou citlivost, univerzálnost a možnost analyzovat více prvků současně jednou z nejefektivnějších metod používaných pro roztokovou analýzu prvků. Právě díky svému vysokému rozlišení při kvantitativní, tak kvalitativní analýze, lze ICP-MS využít pro *stanovení izotopových poměrů*, jelikož tato metoda dokáže rozlišit i nepatrné hmotnostní rozdíly mezi jednotlivými izotopy. [36, 37]

Ačkoli samotné ICP-MS neumožňuje speciální analýzu, při jeho spojení se separačními technikami (například s kapalinovou chromatografií) hraje významnou roli jako prvkově specifický detektor. Běžné detektory používané separačními technikami (UV-VIS, RID, FID atd.) mají prvkově nespécifickou odezvu a nejsou dostatečně citlivé. Využití ICP-MS tak v tomto případě nese několik výhod. Díky tomu, že odezva na detektoru není závislá na konkrétní specii prvku, není nutné mít standard pro tuto konkrétní formu prvku, není-li k dispozici. Lze tak využít jiného standardu o stejné koncentraci stanovovaného prvku. Další výhodou využití ICP-MS je schopnost stanovení více prvků během jedné separační analýzy. [38]

Zjednodušený princip ICP-MS je následující. Molekulám analytu je dodána energie, vzniklé ionty se následně rozdělí dle jejich  $m/z$  tedy hmotnosti ku náboji. Poměr  $m/z$  je bezrozměrný,

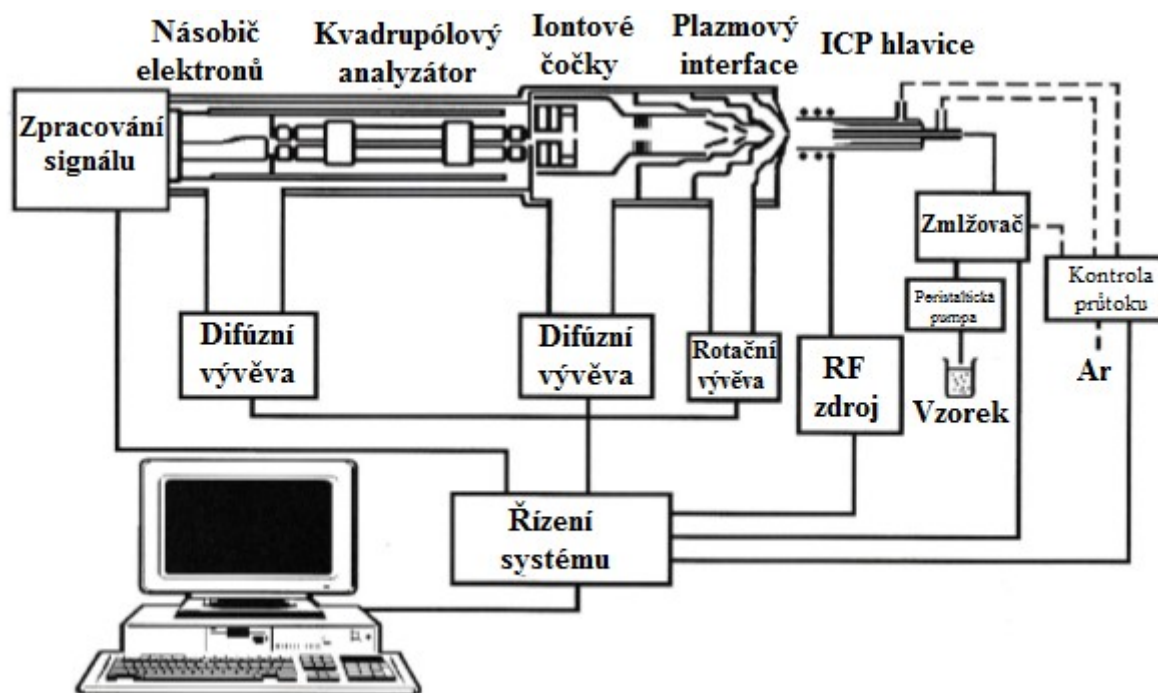
jelikož hmotnostní číslo  $m$  je vyjádřeno v *unifikovaných atomových hmotnostních jednotkách* a nábojové číslo  $z$  se udává jako poměr náboje iontu a náboje elementárního. Separace iontů probíhá ve vakuu, aby se předešlo přenosu energie mezi jednotlivými částicemi, což by ovlivnilo výsledky měření. Rozdělené ionty následně dopadají na převodník, kde jsou v závislosti na svém počtu převedeny na elektrický signál. Získaná odezva se následně vynese do grafu v závislosti na  $m/z$ , tento graf se označuje jako *hmotnostní spektrum*. **Hmotnostní spektrometry** se všeobecně skládají z těchto hlavních částí: *zařízení zajišťující vstup vzorku, vakuový systém, iontový zdroj, analyzátor a detektor iontů*, zjednodušené schéma je na Obrázek 2. [27, 34]



Obrázek 2: Zjednodušené schéma hmotnostního spektrometru (upraveno) [34]

### 2.4.3 Instrumentace

Nejdůležitější části jsou zobrazené na schématickém znázornění přístroje (Obrázek 3). Kapalné vzorky jsou vneseny do indukčně vázaného plazmatu tvořeného argonem pomocí zmlžovače ve formě aerosolu. V ICP dochází k vypaření a následné ionizaci převážně do prvního stupně. Poté ionty prochází do vakuu s elektromagnetickými čočkami, které ionty zaostří do paprsku. Ionty jsou následně v kvadrupólovém analyzátoru filtrovány dle jejich  $m/z$  a poté dochází k jejich dopadání na detektor, který je poté převede na signál. Tento signál je dále zpracován na hmotnostní spektrum. [34, 36]



Obrázek 3: Kvadrupólové ICP-MS – schéma (upraveno) [36]

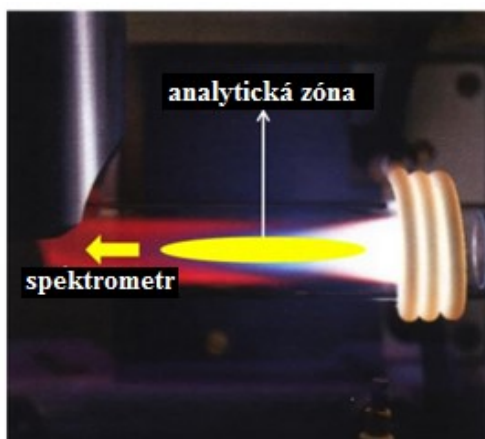
#### 2.4.3.1 Zavádění vzorku do plazmatu

Kapalné vzorky jsou do ICP vnášeny ve formě aerosolu. Toho je docíleno pomocí **zmlžovače**, do kterého je vzorek dopravován *peristaltickou pumpou*. Ve zmlžovači je kapalina injektována do proudu nosného plynu, v tomto případě *argonu*, jež kapalinu rozptýlí na drobné částice. Aerosol poté putuje do **mlžné komory**, která má za cíl eliminovat příliš velké kapky, které by mohly způsobovat *Nespektrální* interference, které jsou blíže uvedeny v kapitole 2.4.4.1, a vyrovnávat pulzy vzniklé kvůli dávkování peristaltickou pumpou. [39, 40]

#### 2.4.3.2 Iontový zdroj

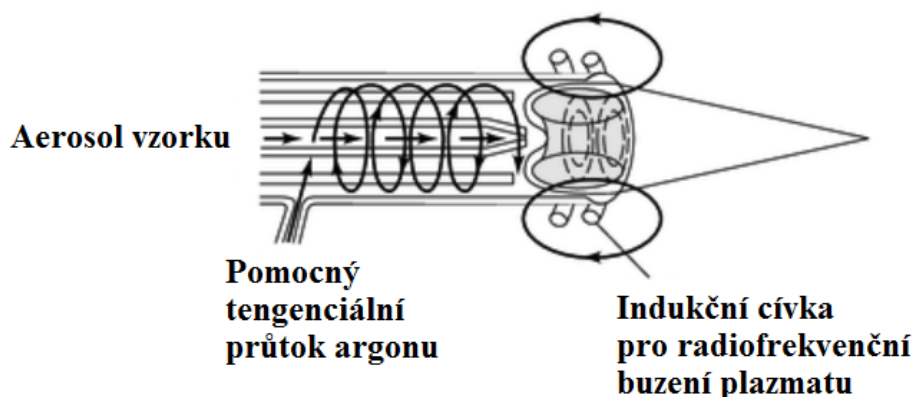
Jako iontový zdroj je využito již zmíněné *indukčně vázané plazma* (ICP). Plazma je z fyzikálního pohledu ionizovaný plyn tvořený ionty, volnými elektrony a případně i neutrálními částicemi, bývá označováno jako *čtvrté skupenství hmoty*. Plazma tvoří 99 % veškeré hmoty ve vesmíru, na Zemi se v přírodě vyskytuje například v kanálech blesků a ionosféře. Plazma lze rozdělit na *homogenní* – záření plazmatu je v termodynamické rovnováze a má všude stejnou teplotu, spektrálními vlastnostmi mu odpovídá analytická zóna *radiálního ICP*, a na *nehomogenní* – vnější část plazmatu je chladnější než ta vnitřní, tomu odpovídá analytická zóna v *axiálním ICP*. V ICP-MS je využíváno pouze axiální geometrie, kdy plazma směřuje svojí osou do spektrometru, ale při optických metodách je využíváno

i *radiální geometrie*, kdy je plazma kolmo ke spektrometru. Axiální geometrie ICP viz Obrázek 4. [40, 41]



Obrázek 4: ICP plazma – axiální geometrie (upraveno) [41]

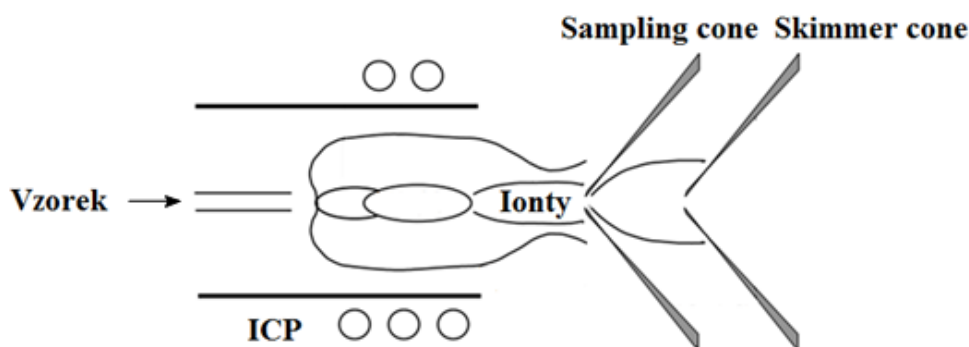
Plazma je tvořeno v takzvané **plazmové hlavici** (schéma viz Obrázek 5) a jeho vznik je podnícen jiskrovým výbojem z Teslova transformátoru, který dodá elektronům energii pro jejich uvolnění. Tyto elektrony jsou následně urychleny elektromagnetickým polem, což vede k *lavinové ionizaci* pracovního plynu – argonu. Ionizovaný plyn dále pokračuje plazmovou hlavici. Plazmovou hlavici tvoří tři soustředné křemenné trubice, v nichž proudí argon o celkovém průtoku 10–15 dm<sup>3</sup>/min. Na konci nejširší trubice je umístěna chlazená indukční cívka, na niž je přiváděn střídavý proud z vysokofrekvenčního generátoru. Vzniklé proměnné elektromagnetické pole dodává dostatek energie pro udržení ICP. Ve středu vzniklého plazmatu se nachází chladnější *analytický kanál*, který je tvořen proudem nosného plynu se vzorkem, který byl do ICP dávkován jako aerosol do centrální trubice. Během průchodu vzorku plazmatem do oblasti analytického kanálu je vystaven teplotě až 6 000–8 000 K. Právě v této části ICP dochází k vysušení, atomizaci a následné ionizaci vzorku. [40, 42]



Obrázek 5: Hlavice ICP (upraveno) [40]

### 2.4.3.3 Rozhraní mezi iontovým zdrojem a hmotnostním spektrometrem

Analýza samotných iontů musí probíhat ve vakuu. Toho je docíleno pomocí rozhraní (anglicky *interface*), které zabezpečuje oddělení hlavního toku argonu od středního toku iontů analyzovaného vzorku. Dvoustupňový interface se skládá ze dvou kuželů (*sampling* a *skimmer cone*) s malými otvory ve vrcholech, průměr těchto otvorů je cca 1 mm, schéma viz Obrázek 6. Kužely jsou z tepelně vodivých materiálů a jsou chlazené vodou. Mezi samotnými kužely od sebe vzdálenými 6–7 mm je vývěvou udržován tlak zhruba 500 Pa, rychlost expandujícího plynu z ICP lehce přesahuje rychlost zvuku a jeho kinetická teplota se blíží nule. Díky tomu je eliminována většina reakcí částic a tok iontů je přesně nasměrován. Dále se v této oblasti tvoří *Machovo diskontinuum*, v této oblasti klesne rychlost proudění pod rychlost zvuku, pokud by byl druhý kužel umístěn v nesprávné vzdálenosti, mohlo by to vyvolat nežádoucí turbulence. Průchodem v otvoru druhého kužele se analyzovaný vzorek dostane do prostření o tlaku cca  $10^{-4}$  Pa a rychlost se opět zvýší na nadzvukovou. [36]



Obrázek 6: Rozhraní ICP/MS (upraveno) [35]

### 2.4.3.4 Iontová optika

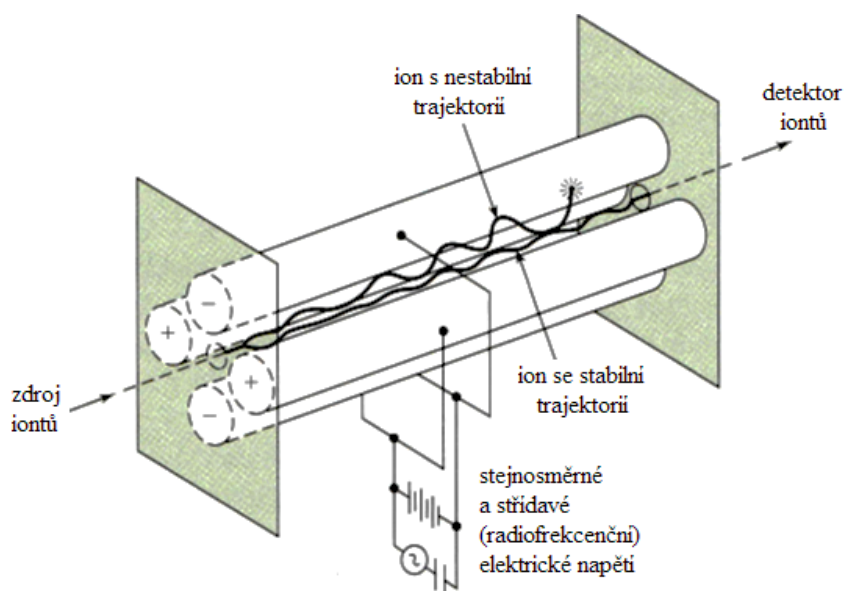
Jelikož je plyn po průchodu do vakua složen nejen z iontů, ale i fotonů a nenabitých atomů, musí být před vstupem do analyzátoru zaostřen do iontového paprsku. Jelikož elektromagnetickým polem jsou ovlivňovány pouze ionty, lze nenabitě atomy a fotony odstranit například pomocí mechanické překážky v jejich dráze. Další možností eliminace přebytečných částic je postavit kužely rozhraní takovým způsobem, aby byl tok vstupujících iontů natočen zhruba  $45^\circ$  oproti ose analyzátoru. Zatímco se přebytečné částice zastaví o absorpční plochu nacházející se v ose vstupního kuželu, dráha analyzovaných iontů je odchýlena přesně tvarovaným elektrickým polem takzvanými *iontovými čočkami*. Tok iontů je nasměrován tím způsobem, aby nebyl zastaven tímto filtrem. Zároveň tak vzniká proud iontů, který dále směřuje

do analyzátoru. Kdyby nedošlo k zaostření a filtraci fotonů, nenabitých atomů a částí iontů, byl by výsledek analýzy ovlivněn zvýšeným *pozadím detektoru* tzv. šumem. [36]

### 2.4.3.5 Analyzátor

Analyzátor zajišťuje separaci iontů, a je tak velmi důležitou částí ICP *hmotnostního spektrometru*, protože je zodpovědný za dosaženou rozlišovací schopnost. Rozlišovací schopnost analyzátoru  $R_s$  je definována jako poměr nominální hmotnosti iontu (průměr hmotností sousedních iontů, pro které je rozlišovací schopnost počítána)  $m$  a hmotnostního rozdílu dvou sousedních píků  $\Delta m$  (neboli rozlišení). Nejčastěji se využívá těchto tří typů analyzátorů: kvadrupólový, průletový, sektorový (pomocí magnetického a elektrického pole). Jejich zjednodušený princip separace a jejich rozlišovacích schopností, viz Tabulka 1. Vzhledem k použití **kvadrupólového ICP-MS** je tento analyzátor popsán podrobněji dále. [27]

**Kvadrupólový filtr** je tvořen čtyřmi, odtud název kvadrupól, nebo více tyčemi, elektrodami, kruhového či parabolického průřezu. Elektrody vytváří proměnné elektrické pole tím způsobem, že protilehlé páry tyčí jsou napojeny na stejnosměrnou i střídavou složku napětí. Ionty jsou vlivem elektrického pole rozkmitány tak, aby při určitém napětí a frekvenci radiových vln na elektrodách prošly pouze ionty o určitém  $m/z$ . Hmotnost ( $m/z$ ) propouštěných iontů je lineárně závislá na elektrickém potenciálu elektrod. Díky tomu je možné rychle a jednoduše skenovat přes zvolený rozsah  $m/z$ . Schématické zobrazení kvadrupólového filtru je na Obrázek 7. [27, 36]



Obrázek 7: Kvadrupólový hmotnostní analyzátor – schéma (upraveno) [27]

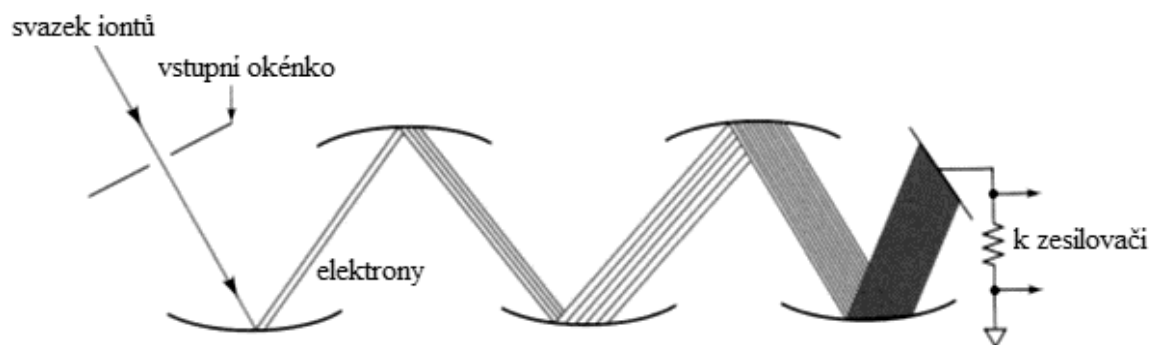


Tabulka 1: Rozdělení analyzátorů dle rozlišovací schopnosti

Analyzátor	Princip separace [27]	Rozlišovací schopnost $m/\Delta m$ [43]
Kvadrupól	Tento analyzátor funguje jako <i>filtr</i> , jelikož podél jeho osy prochází pouze ionty o zvoleném $m/z$ .	400
Průletový <i>Time of flight</i> (TOF)	Rychlost iontů v elektrostatickém poli je nepřímo úměrná jejich hmotnosti, ionty o daném $m/z$ tudíž mají <b>specifickou dobu průletu</b> , která závisí také na délce analyzátoru.	10 000
Sektorový s dvojitou fokusací	Ionty se separují díky <b>zakřivení jejich trajektorie v magnetickém poli</b> dle jejich $m/z$ . Paprsek iontů se následně zaostří v poli elektrostatickém.	20 000

### 2.4.3.6 Iontový detektor

Jako iontový detektor slouží **násobič elektronů s diskretními dynodami** (schéma: Obrázek 8). Po dopadu iontů na katodu násobiče dochází k emisi elektronů, které se následně urychlí systémem dynod za *lavinového znásobení elektronů*.



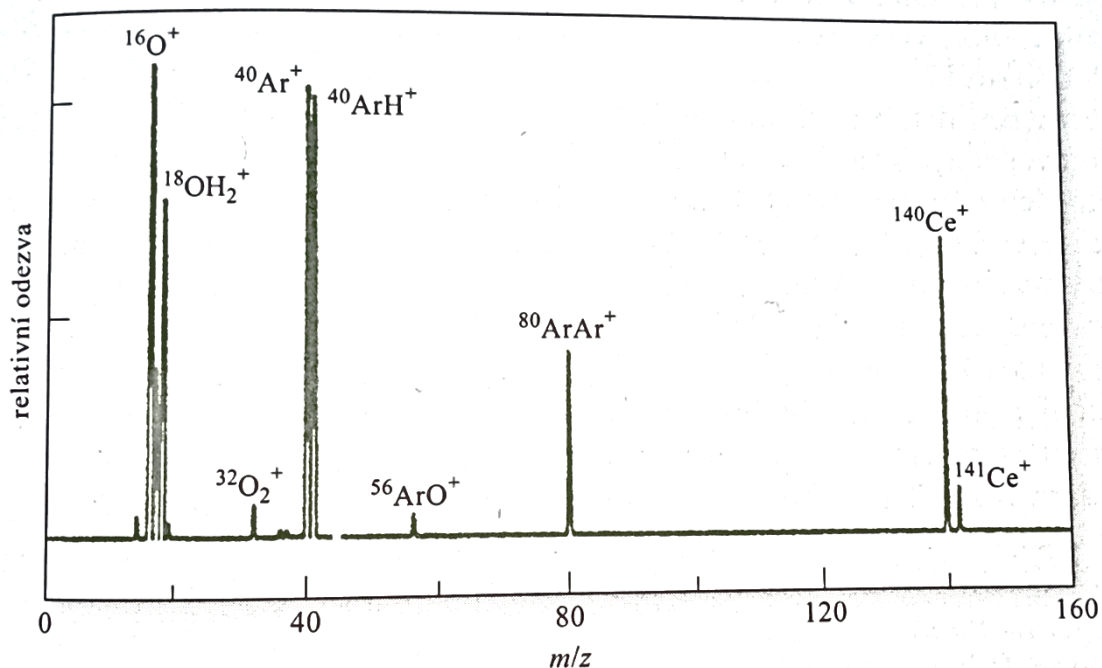
Obrázek 8: Násobič iontů s diskretními dynodami (upraveno) [27]

### 2.4.4 Hmotnostní spektrum

Výsledkem celého procesu je *hmotnostní spektrum*. Toto spektrum je znázorněním závislosti absolutní či relativní intenzity iontů na jejich hodnotě  $m/z$ . Jelikož jsou ionty v převládající většině jednou nabité, odpovídá  $m/z$  jejich hmotnosti. Pro jednotlivé ionty se tak ukazují dílčí píky. [27]

#### 2.4.4.1 Interference

V ideálním případě *hmotnostní spektrum* vyjadřuje pouze zkoumané analyty, které byly získány dokonalým atomizováním vzorku a následnou ionizací do prvního stupně. Přestože v ICP-MS nejsou spektrální *interference* tak výrazné jako u emisních metod, stále zde hrají svou roli, jak lze vidět na Obrázek 9. Rozlišují se dva druhy interferencí: *nespektrální* a *spektrální*.



Obrázek 9: Ukázka hmotnostního spektra; analyt – 10 mg/l Ce (upraveno) [27]

**Nespektrální interference** vznikají vlivem *matrice vzorku*, jelikož její složky, tzv. *interferenty*, mohou ovlivňovat odezvu přístroje, například se může jednat o kyseliny použité při úpravě vzorku nebo snadno ionizovatelné prvky obsažené v matrici. Dochází tedy k rozdílným odezvám analyzovaného roztoku a roztoků kalibrační křivky, kdy mají koncentrace jinou směrnici, než je směrnice kalibrační křivky. Tyto interference mohou například vznikat *při vnášení vzorku do ICP* kvůli rozdílným fyzikálním vlastnostem kalibračních roztoků a roztoku vzorku či přímo *v ICP* může matrice posunovat ionizační rovnováhu. [35, 44]

**Spektrální interference** lze rozdělit dle jejich příčiny: *atomové ionty isobarů, vícenásobně nabitě ionty, molekulové ionty a intenzivní sousední signály*.

*Isobary*, ionty o stejném nukleonovém čísle, a tedy o stejné hmotnosti nominální hmotnosti, způsobují překryv signálu, například  $^{40}\text{Ar}^+$  a  $^{40}\text{Ca}^+$ .

Má-li ion *náboj* 2+ či vyšší může se následně jevit jako jiný prvek například  $^{88}\text{Sr}^{2+}$  jako  $^{44}\text{Ca}^+$  tedy jako prvek o hmotnosti odpovídající *m/z*. Vzhledem k vyšší ionizační energii pro dvakrát nabitě ionty se tyto ionty vyskytují v menšině oproti jednou nabitým iontům.

*Polyatomické interference* neboli interference vzniklé vlivem *molekulových iontů* vznikají důsledkem interakcí atomů vzorku s majoritními prvky osnova vzorku, atomy rozpouštědla a s pracovním plynem (argonem). Vzhledem k vyšší koncentraci posledních dvou zmíněných zdrojů je i jejich příspěvek k interferencím významnější. Například se může jednat o záměnu  $^{56}\text{Fe}^+$  s molekulovým iontem  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ .

Je-li signál odpovídající zastoupení iontů o hmotnosti  $m$  velice intenzivní, může docházet k rušení, tzv. *chvostování*, signálů odpovídajících hmotnostem  $m_{\pm 1}$ . [35]

Jednou z možností, jak eliminovat interference je použití **kolizně-reakční cely**, která se v hmotnostním spektrometru nachází mezi *iontovou optikou* a *analyzátozem*. Jedná se o *multipól* (kvadrupól či multipól vyššího řádu, například hexapól), do kterého je přiváděn pracovní plyn o nízkém tlaku. Pomocí srážek *interferentů* s atomy pracovního plynu dochází k eliminaci *polyatomických interferencí*. Díky cele dochází také k vyššímu zaostření paprsku iontů, nevýhodou však je snížení intenzity signálu na detektoru. [45]

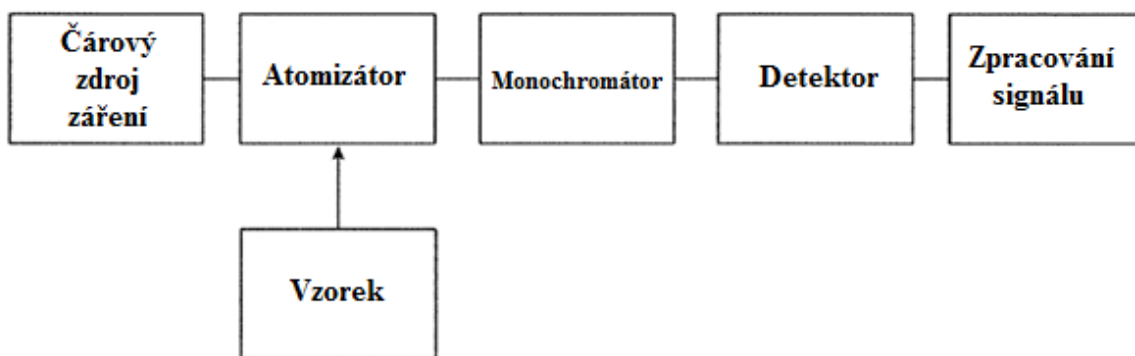
## 2.4.5 Porovnání s jinými metodami

Vedle ICP-MS se pro prvkovou analýzu roztoků často využívá i *optických metod atomové spektroskopie*, které lze dle jejich principu rozdělit na *absorpční* a *emisní*. Dále je blíže popsána *atomová absorpční spektrometrie* a *optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem*. [40]

### 2.4.5.1 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je jednou z nejrozšířenějších technik prvkové analýzy umožňující stanovit přes 70 prvků periodické soustavy, a to především kovů a některých polokovů. Základní princip je založen na platnosti *Lambert-Beerova zákona* pro absorpci záření volnými atomy stanovovaného prvku v plynném stavu v oblasti vlnových délek 190–900 nm. Pro analýzu se převážně využívají tzv. *rezonanční přechody* neboli přechody mezi základní a některou z vyšších energetických hladin. Po absorpci záření charakteristického pro daný prvek dochází k excitaci jeho valenčních elektronů. Prošlé záření má tedy nižší intenzitu, protože se část jeho energie spotřebovala při excitaci, pokles intenzity je závislý na koncentraci stanovovaného prvku v analytu. [40, 46]

*Atomový absorpční spektrometr* se skládá ze *zdroje záření*, *atomizátoru*, *monochromátoru* a *detektoru*. *Atomizátor* zajišťuje přechod vzorku do plynného stavu a vznik volných atomů, zároveň plní funkci absorpčního prostředí. Dle způsobu *atomizace* můžeme AAS rozlišovat na *plamenovou AAS* s možností stanovení v rozsahu  $10^{-1}$ – $10^2$  mg/l a *AAS s elektrotermickou atomizací*, která umožňuje stanovení až  $10^{-1}$ – $10^2$  µg/l. Zjednodušené schéma AAS viz Obrázek 10. [46]

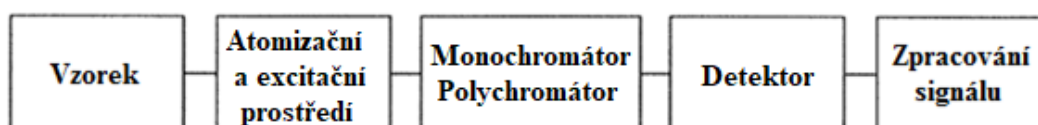


Obrázek 10: Blokové schéma AAS (upraveno) [46]

Ačkoli AAS neumožňuje analýzu tak nízkých koncentrací jako ICP-MS, lze tuto metodu využít pro potvrzení správnosti měření ICP-MS pro některé prvky při jejich dostatečné koncentraci pro toto stanovení.

#### 2.4.5.2 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) funguje na principu detekce charakteristického záření daného prvku, které je emitováno excitovanými atomy v plynném stavu. V *excitačním prostředí*, v tomto případě ICP, dochází za vysokých teplot k atomizaci a excitaci valenčních elektronů stanovovaného prvku. Obecné schéma emisního spektrometru viz Obrázek 11. Po *deexcitaci*, přechodu elektronů zpět na základní energetickou hladinu, je emitováno záření, jež je charakteristické pro daný analyt. Při *kvalitativní analýze* se využívá rozdílných *vlnových délek* emisního záření, *kvantitativní* je měřena na základě *intenzity emitovaného záření*. [46]



Obrázek 11: Obecné schéma emisního spektrometru [46]

ICP-OES má horší mez detekce než ICP-MS, obvykle o 3 řády. Nižší rozlišovací schopnost ICP-OES je způsobena vyšším pozadím zapříčiněného *spojitým rekombinačním zářením argonu*, které je nedílnou součástí *emisního spektra* a není možné jej odstranit. Využití ICP-OES v tandemu například se separačními technikami má oproti ICP-MS značně omezené využití. Výhodou této metody oproti ICP-MS jsou však nižší investiční náklady. [35]

#### 2.4.6 Využití ICP-MS pro analýzu exosomů

V současné době se ICP-MS rutinně používá v různých oblastech jako je geochemie, vědy o životním prostředí, průmysl, forenzní vědy a archeologie. Na základě širokého spektra aplikací se uplatnění této techniky dále rozšiřuje i v biologickém výzkumu, jelikož umožňuje detekci heteroatomů a jejich kvantifikaci. Pomocí ICP-MS lze například detekovat a kvantifikovat velké množství proteinů nesoucích heteroprvky, jako jsou S, P, Se či kovy (Zn, Fe, Mn, Cu, Ni, Mo, Cr), což potvrzuje potenciál ICP-MS v oblasti výzkumu biologie. Vedle zmlžování vzorků ve formě roztoku umožňuje ICP-MS spřažení s laserovou ablací. Laserová ablace je vzorkovací technika umožňující analýzu pevné fáze, takzvanou *in situ* analýzu. Při využití ablace odpadá nutnost rozkladu vzorku a umožňuje sledovat prostorovou distribuci sledovaného prvku ve specifické oblasti vzorku. Toho lze například využít při sledování distribuce chemoterapeutika (stanovení pomocí příslušného kovu kupříkladu cisplatina: stanovení Pt, který se jinak v těle běžně nevyskytuje) v nádoru. Pro analýzu této práce byly vzorky exosomů převedeny do roztoku a byla stanovována průměrná koncentrace v jednotlivých vzorcích. [47, 48]

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Seznam použitých chemikálií

*Deionizovaná voda*

*HNO<sub>3</sub>* (>65%; Suprapur, Merck; Německo) – mineralizace vzorků

*HNO<sub>3</sub>* (67-69%; Analytika, spol. s r.o.; Česká republika) – příprava kalibračních roztoků

*Kapalný Ar* (čistota  $\geq 99,996$  %; SIAD; Česká republika)

*Ladicí roztok pro ICP-MS* (10  $\mu\text{g/l}$  Ce, Co, Li, Tl, Y ve 2% HNO<sub>3</sub>; Agilent Technologies; USA)

*Ladicí PA roztok 1 pro ICP-MS* (20 mg/l Zn, Be, Cd, As; 10 mg/l Ni, Pb, Mg; 5 mg/l Tl, Na, Al, U, Cu, Th, Ba, Co, Sr, V, Cr, Mn, <sup>6</sup>Li, Sc, In, Lu, Bi; 2,5 mg/l Y, Yb; v 5% HNO<sub>3</sub>; Agilent Technologies; USA)

*Ladicí PA roztok 2 pro ICP-MS* (10 mg/l Mo, Sb, Sn, Ge, Ru, Pd; 5 mg/l Ti, Ir; ve směsi 10% HCl, 1% HNO<sub>3</sub> a stopové množství HF; Agilent Technologies; USA)

*Standardní vodný roztok Pt* (1,000  $\pm$  0,002 g/l v 5% HCl (v/v); Astasol; Česká republika)

### 3.2 Seznam použitých pomůcek a přístrojů

*Automatické pipety* (Eppendorf; různé rozsahy)

*Polypropylenové sterilní uzavíratelné zkumavky* (VWR<sup>®</sup>: 15 ml, 50 ml; metal free)

*Běžné laboratorní vybavení* (kádinky, stojan na centrifugační zkumavky atd.)

*Merck Milli-Q<sup>®</sup> Academic* – přístroj pro přípravu deionizované vody

*New Brunswick<sup>™</sup> Innova<sup>®</sup> U360* – chladič zařízení (až -80 °C) pro uchování vzorků

*Analytik Jena ContraA 800G* – absorpční spektrometr s elektrotermickým atomizátorem. Zařízení je vybaveno vysokotlakou xenonovou výbojkou, echelle monochromátorem a CCD detektorem.

*MILESTONE ultra WAVE* – mikrovlnné rozkladné zařízení s vysokotlakovým rozkladným systémem, jež umožňuje současný rozklad 15 až 24 vzorků a při minimálním riziku vzájemné kontaminace vzorků mezi sebou. Samotný rozklad probíhá v křemenných zkumavkách, které jsou uzavřeny polytetrafluorethylenovými (PTFE) víčky (Obrázek 12).



Obrázek 12: Rozkladné mikrovlnné zařízení MILESTONE ultra WAVE  
autor obrázku: Bc. Tadeáš Uher

**Agilent SPS 4 Autosampler** – autosampler kompatibilní se zařízením Agilent 7900 ICP-MS i po softwarové stránce (program Mass Hunter). Díky této kompatibilitě lze kromě přesného dávkování vzorků v zadaném pořadí také nastavit například hloubku zanoření kapiláry a délku či počet proplachů mezi vzorky. Zařízení, které bylo použito pro měření této práce, má držáky pro 3krát 60 vzorků a jednu 21 vzorků.

**Agilent 7900 ICP-MS** – kvadrupólový hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem (Obrázek 13). Zavádění vzorku je zajišťováno **peristaltickou pumpou** s nízkou pulzací a vysokou přesností. Díky pumpě se vzorek dostává do **zmlžovače MicroMist (Glass) U – series 1/p** s nízkým průtokem vzorku (~0,2 ml/min). Na zmlžovač je napojena **Scottova mlžná komora**. **Plazma** je produkováno pomocí **radiofrekvenčního generátoru** s variabilním přizpůsobením impedance a rozsahem výkonu 500-1 600 W. Kompaktní **plazmová hlavice** je tvořena křemenným injektorem o vnitřním průměru 2,5 mm. **Interface** sestává ze dvou niklových kuželů, přičemž vnější má průměr 1 mm a vnitřní 0,54 mm. Konstrukce **iontové optiky** zahrnuje **extrakční čočku**, která zaostřuje ionty do svazku po průchodu interface, a **mimoosou čočku** zajišťující eliminaci přebytečných částic, čímž přispívá k nízkému šumu pozadí. **Kolizně-reakční cela** je opatřena **oktapólem**, který umožňuje odstranění interferencí pomocí inertního plynu v cele, typicky se jedná o helium. Jako **hmotnostní analyzátor** je zde

využit *kvadrupól* tvořený tyčemi hyperbolického průřezu. Tento analyzátor pracuje v rozsahu hmotností 2-260 amu. **Detektor** v tomto zařízení je *elektronásobič*, jež využívá analogového zesilovače, který pracuje se stejnou *integrační dobou* v pulzním i analogovém režimu.



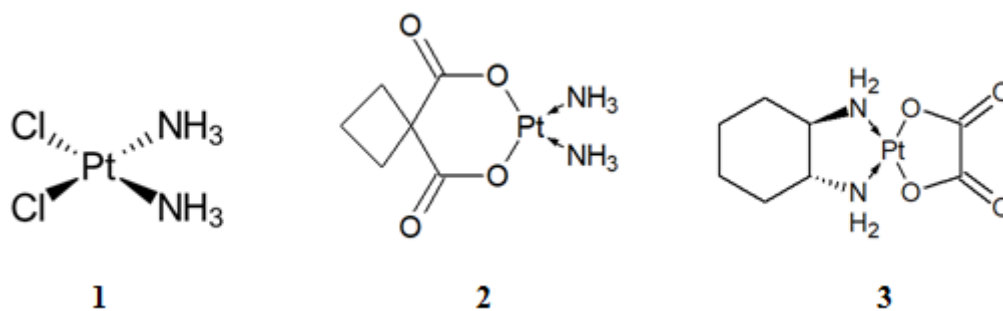
Obrázek 13: ICP hmotnostní spektrometr Agilent 7900

### 3.3 Vzorky a jejich příprava

Vzorky exosomů a médií byly připraveny na Masarykově onkologickém ústavu (MOÚ) v Regionální centrum aplikované molekulární onkologie (RECAMO) Mgr. Petrem Voňkou pod vedením doc. Mgr. Romana Hrstky, Ph.D. Vzorky byly připravovány pro vybrané Pt deriváty, konkrétně se jednalo o cisplatinu (cisPt), karboplatinu (cbPt) a oxaliplatinu (oxPt). Seznam vzorků, ze kterých byly připravovány exosomy a média, je znázorněn v



Tabulka 2, kde jsou uvedeny i navážky exosomů odpovídající 1/20 alikvotního podílu. Vzorce použitých léčiv jsou znázorněny na Obrázek 14.



Obrázek 14: Vzorce vybraných platinových derivátů:  
1 – cisPt; 2 – cbPt; 3 – oxPt

Tabulka 2: Seznam vzorků, počet buněk v linii a navážky vzorků exosomů

Buněčná linie	Léčivo	Replikát	Počet buněk v linii	m <sub>navážka exosomů</sub> [mg]
SK-OV-3	Kontrola	1	2364450	15,9
		2	2767950	19,5
		3	2527200	16,1
	cisPt	1	1478100	8,2
		2	1725300	13,5
		3	1366150	12,4
	cbPt	1	1664545	12,6
		2	1636500	12,5
		3	1117450	13,3
	oxPt	1	1276300	13,7
		2	1603350	18,7
		3	1416500	21,3
A2780	Kontrola	1	3250600	5,8
		2	2930500	13,2
		3	3699500	14,8
	cisPt	1	2481750	16,5
		2	2217700	20,9
		3	1937900	12,9
	cbPt	1	3450610	9,9
		2	4098531	16,9
		3	3845609	9,8
	oxPt	1	3675100	10,2
		2	2682150	10,6
		3	3911300	8,2
A2780cis	Kontrola	1	3798000	11,2
		2	4372000	12,7
		3	4060000	13,3
	cisPt	1	2733000	5,4
		2	2412000	9,0
		3	2461000	11,9
	cbPt	1	4306000	9,5
		2	4480000	6,0
		3	3471000	8,4
	oxPt	1	2721000	10,3
		2	2189000	14,0
		3	1571000	16,8

### 3.3.1 Kultivační podmínky

V rámci experimentu byly použity buněčné linie odvozené od karcinomu ovaria (SK-OV-3, A2780 a A2780cis). Buněčná linie SK-OV-3 byla kultivována v médiu McCoy's 5A (katalogové číslo: M4892; Merck KGaA, Darmstadt, Spolková republika Německo), které bylo doplněno o 10% (v/v) FBS (angl. fetal bovine serum; katalogové číslo: 10270106; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Spojené státy americké) a 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin (katalogové číslo: RAL-001-100ML; SERANA, Pessin, Spolková republika Německo). Buněčné linie A2780 a A2780cis byly kultivovány v médiu RPMI-1640 (katalogové číslo: R4130; Merck KGaA, Darmstadt, Spolková republika Německo), které bylo doplněno o 10% (v/v) FBS (angl. fetal bovine serum; katalogové číslo: 10270106; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Spojené státy americké), dále obsahovalo 2 mmol/l L-glutamin (katalogové číslo: 25030081; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA), 100 U/ml penicilin a 100 µg/ml streptomycin (katalogové číslo: RAL-001-100ML; SERANA, Pessin, Spolková republika Německo). Kultivace buněk probíhala v inkubátoru se vzdušnou vlhkostí při 37 °C v 5% (v/v) CO<sub>2</sub> atmosféře. Všechny buněčné linie byly získány z ATCC (American Type Culture Collection). Pro experimenty byly použity buňky, které byly pasážovány maximálně 20krát.

### 3.3.2 Odebrání vzorků médií a exosomů

Pro přípravu vzorků byly buněčné linie kultivovány v 10ml kultivačních miskách (katalogové číslo: 93100; TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko), v hustotě 1 000 000 buněk/miska pro buněčnou linii SK-OV-3 a 1 500 000 buněk/miska pro buněčné linie A2780 a A2780cis. Druhý den byly k buňkám přidány platinové deriváty, kterými byly cisplatina (číslo šarže: 21239103; PLIVA-Lachema, a.s., Brno, Česká republika), karboplatina (číslo šarže: 21372003; PLIVA-Lachema, a.s., Brno, Česká republika) nebo oxaliplatina (číslo šarže: 533-52-14; PLIVA-Lachema, a.s., Brno, Česká republika), rozpuštěné v 0,9% (m/m) NaCl (katalogové číslo: 7647-14-5; Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika) ve finální koncentraci 10 µmol/l. Jako kontrola byly použity buňky ošetřené 0,9% (m/m) NaCl.

Po 24 hodinách expozice vybranými cytostatiky byly připraveny jednotlivé vzorky. Z média o celkovém objemu 10 ml byl vždy odebrán jednak 1 ml jako vzorek média a dále 0,5 ml média pro izolaci exosomů. Takto připravené dvě sady vzorků byly následně stočeny po dobu 30 minut při 2000× g a 4 °C. Vzorky médií (první sada) byly uloženy ve 4 °C. Z druhé sady vzorků byly izolovány exosomy pomocí komerčního kitu (katalogové číslo: 4478359;

Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, Spojené státy americké). Izolované exosomy byly skladovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4 Pracovní postupy a použitá metodika

#### 3.4.1 Rozklady vzorků

Mineralizace vzorků byla provedena na Akademii věd ČR (Oddělení analytické chemie životního prostředí) společně s Bc. Tadeášem Uhrem na zařízení MILESTONE ultra WAVE pod vedením RNDr. Pavla Coufalíka, Ph.D.

##### 3.4.1.1 Nastavení mikrovlnného analyzátoru během rozkladů

V počátečním bodě mineralizace byl tlak inertní atmosféry v reaktoru nastaven na 40 bar a teplota na  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Další změny teploty během rozkladu jsou uvedeny v Tabulka 3. Po ochlazení (35 minut od začátku procesu) dochází k posupnému snižování tlaku a dalšímu snížení teploty, tato fáze trvá přibližně 10 minut. Doba celého cyklu rozkladu tedy celkem trvá zhruba 45 minut. Tento program byl použit pro exosomy i média.

Tabulka 3: Teplotní program mineralizace vzorků s biologickou maticí

Krok	Čas [min]	Teplota mineralizace [ $^{\circ}\text{C}$ ]
1	0,03	100
2	10	120
3	15	200
4	18	250
5	25	250
6	35	65

##### 3.4.1.2 Exosomy

Vzorky exosomů bylo nejdříve potřeba pro roztokovou analýzu mineralizovat. Při rozkladech bylo nezbytné dosáhnout ideálního konečného objemu, kdy bude vzorek dokonale rozložen, nedojde k přílišnému zředění, avšak výsledného roztoku bude dostatečné množství pro provedení analýzy pomocí ICP-MS a kontrolního měření na AAS. Přesný postup (viz dále) byl zvolen na základě předchozích zkušeností mineralizace obdobných vzorků.

Zkumavky vhodné pro rozklad nebylo možné centrifugovat, proto byly vzorky z MOÚ na AVČR dopraveny v eppendorfkách. Do předem zvážených křemenných zkumavek o vyhovujících parametrech pro rozklad (odolnost při vysokém tlaku a teplotě) byly vzorky převedeny pomocí pipety. Následným zvážením byla stanovena hmotnost navážky vzorků exosomů. Poté bylo přidáno  $100\text{ }\mu\text{l}$  65%  $\text{HNO}_3$  a 1 ml deionizované vody. Zkumavky byly

uzavřeny PTFE víčky a byl proveden rozklad v mikrovlnném zařízení. Po proběhnutí rozkladu bylo znovu provedeno vážení zkumavek. Kromě vzorků byly stejným způsobem připraveny 3 slepé pokusy. U výsledných roztoků vzorků byla několikrát stanovena hustota pomocí odebrání a zvážení přesného objemu vzorku (100  $\mu$ l). Údaje hmotností prázdných zkumavek a naplněných zkumavek po rozkladu byly využity pro stanovení výsledných hmotností roztoků jednotlivých vzorků a jejich následnému přepočtení na přesné objemy pomocí stanovené hustoty.

### **3.4.1.3 Média**

Do předem zvážených zkumavek vhodných pro rozklad bylo napipetováno 100  $\mu$ l vzorku média, poté bylo provedeno další vážení. Následně byl přidán 1 ml 65%  $\text{HNO}_3$ . Po rozkladu byl výsledný objem zředěn 3 ml deionizované vody, tudíž výsledný objem činil přibližně 4,1 ml. Kromě vzorků médií byly připraveny stejným způsobem i tři kontroly kultivačních médií (McCoy's 5A a RPMI-1640) a tři slepé pokusy. Po provedení rozkladů byla stanovena hustota roztoků na 1,10 g/ml stejným způsobem jako u exosomů. Tyto údaje byly opět využity pro výpočet přesného objemu jednotlivých vzorků.

### **3.4.2 Příprava vzorků pro analýzu exosomů a médií**

Pro měření exosomů i médií byly připraveny 3 slepé pokusy pro vyloučení možnosti kontaminace během rozkladu. Mezi roztoky médií bylo obsaženo i 6 kontrolních roztoků připravených z kultivačních médií (McCoy's 5A a RPMI-1640), aby bylo možné vyloučit potenciální kontaminaci vzniklou při kultivaci buněk na MOÚ. Vzorky byly následně rozděleny do takzvaných sad dle jednotlivých buněčných linií (sada SK-OV-3, A2780, A2780cis). Každá sada obsahovala 3 replikáty kontrolních vzorků, cisPt, cbPt i oxPt.

Do sterilních propylenových zkumavek o objemu 15 ml bylo napipetováno 600  $\mu$ l deionizované vody a přidáno 500  $\mu$ l rozloženého vzorku exosomů.

V případě médií bylo do 15ml sterilních propylenových zkumavek bylo převedeno 1 200  $\mu$ l deionizované vody a následně bylo napipetováno 1 000  $\mu$ l vzorku média po rozkladu.

### **3.4.3 Externí kalibrace**

Stanovení obsahu platiny bylo vyhodnoceno pomocí metody externí kalibrace. Pro tento účel byla připravena sada kalibračních roztoků obsahující Pt, které byly ředěny 1%  $\text{HNO}_3$  z důvodu použití této kyseliny při rozkladech. Standardní vodný roztok platiny o koncentraci 1,000 g/l byl zředěn na 100  $\mu$ g/l Pt. Tento roztok byl následně využit pro přípravu samotných roztoků

pro externí kalibraci. Celkem se jednalo o 11 roztoků. Koncentrace roztoků pro externí kalibraci činily [ $\mu\text{g/l}$ ]: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 5; 10; 15 a 20.

### 3.4.4 Optimalizace ICP hmotnostního spektrometru

Před samotným měřením je třeba provést základní ladění vybraných parametrů ICP hmotnostního spektrometru jakou jsou: pozice plazmové hlavice, odezva detektoru, intenzita a stabilita signálu či vybrané parametry iontové optiky. Pro tento účel se využívá takzvaný ladicí roztok (10  $\mu\text{g/l}$  Ce, Co, Li, Tl, Y ve 2%  $\text{HNO}_3$ ; Agilent Technologies; USA) zředěný na 1  $\mu\text{g/l}$ . Ladění probíhá pro nízké ( ${}^7\text{Li}^+$ ), střední ( ${}^{87}\text{Y}^+$ ) a vysoké ( ${}^{205}\text{Tl}^+$ ) hmotnosti a sleduje se odezva přístroje. Dále také dochází ke kontrole dvakrát nabitých iontů ( ${}^{140}\text{Ce}^{2+}$ ), kdy je sledovaný poměr hodnot  $m/z$  70/140, a oxidů ( ${}^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+$ ), kontrolovaný poměr hodnot  $m/z$  je v tomto případě 156/140. Konkrétní hodnoty optimálních podmínek jsou uvedeny v Tabulka 4 a Tabulka 5.

Tabulka 4: Parametry ladění ICP-MS

Parametr	Hodnota parametru
Oxidy (156/140)	0,970 %
Dvakrát nabité ionty (70/140)	4,481 %
Fixní parametry při ladění	
Příkon	1550 W
Hloubka vzorkování	8,0 mm
Optimalizované parametry	
Průtok zmlžovacího plynu	1,07 l/min
Horizontální pozice plazmové hlavice	0,2 mm
Vertikální pozice plazmové hlavice	0,0 mm

Tabulka 5: Hodnoty intenzity a stability signálu vybraných izotopů

Ion	Intenzita [counts/s]	RSD [%]
${}^7\text{Li}^+$	6 139	2,960
${}^{89}\text{Y}^+$	48 609	1,731
${}^{205}\text{Tl}^+$	31 675	1,810

Dále je laděno napětí na detektoru pro pulzní a analogový režim detektoru pomocí směsi dvou ladicích PA roztoků. Směs je připravena smícháním 0,5 ml roztoku 1 a 0,5 ml roztoku 2 doplněných na 40 ml.

Vzhledem k vysoké atomové hmotnosti  ${}^{195}\text{Pt}^+$ , a tudíž velice nízké pravděpodobnosti vzniku interferencí, nebyla u měření použita kolizně-reakční cela, díky čemuž byla získána lepší odezva detektoru.

### 3.4.5 ICP-MS analýza exosomů

Vhodnost naladěných parametrů specificky pro  $^{195}\text{Pt}^+$  byla následně ověřena přímo v metodě pomocí jednoho z kalibračních roztoků. V případě analýzy této práce byl pro tento účel zvolen kalibrační roztok 1  $\mu\text{g/l}$  Pt. Hodnoty pro měření exosomů viz Tabulka 6.

Tabulka 6: Parametry ICP-MS při měření exosomů

Parametr	Hodnota parametru
Analyzovaný ion	$^{195}\text{Pt}^+$
Integrační čas	0,1 s
Příkon	1550 W
Hloubka vzorkování	10,0 mm
Průtok zmlžovacího plynu	1,08 l/min

Pro dávkování roztoků byl použit autosampler (Agilent SPS 4 Autosampler). Všechny vzorky byly po rozkladu zředěny 2,2krát. Na začátku měření byla změřena kalibrační křivka, poté proběhlo měření příslušných slepých pokusů. Následně bylo provedeno měření samotných vzorků exosomů, přičemž kontrolní vzorky byly umístěny na začátek sad jednotlivých linií. Po měření každé sady byla provedena kontrola vymývání pomocí proměření deionizované vody a 3%  $\text{HNO}_3$ . V daných časových intervalech bylo provedeno kontrolní měření dvou bodů kalibrační křivky (1  $\mu\text{g/l}$  a 10  $\mu\text{g/l}$ ) pro ověření stability přístroje. Na závěr měření byla opětovně změřena celá kalibrační řada.

### 3.4.6 ICP-MS analýza médií

Bylo provedeno ověření naladění ICP-MS pro stanovení  $^{195}\text{Pt}^+$ , hodnoty jsou stejné jako při měření exosomů (Tabulka 6). Mineralizáty byly opět zředěny 2,2krát. Na začátku měření byla proměřena kalibrační křivka, následně proběhla analýza slepých pokusů a vzorků kultivačních médií. Vzorky, které sloužily jako kontroly, byly měřeny vždy na začátku sady pro danou buněčnou linii. Po změření každé sady následovala kontrola vymývání mezi vzorky proměření deionizované vody a 3%  $\text{HNO}_3$ . Podobně jako u exosomů bylo v polovině měření mezi sadami provedeno měření dvou bodů kalibrační křivky, konkrétně se jednalo o 1  $\mu\text{g/l}$  a 10  $\mu\text{g/l}$ . Na konci měření byla přeměřena kalibrační řada.

### **3.4.7 Kontrolní měření na ET-AAS**

Pro ověření správnosti měření bylo využito atomové absorpční spektrometrie s vysokým rozlišením a s kontinuálním zdrojem záření. Toto stanovení bylo provedeno RNDr. Ondřejem Zvěřinou, Ph.D. na Ústavu ochrany a podpory zdraví Lékařské fakulty Masarykovy univerzity.

Při měření bylo pokaždé dávkováno 20  $\mu$ l vzorku na grafitovou kyvetu. Použitý teplotní program probíhal vždy následovně: sušení při 110 °C, pyrolýza při 1 300 °C a atomizace při 2 350 °C. Pro sledování absorpce platiny byla vybrána primární analytická čára, která má pro platinu hodnotu 265,945 nm.



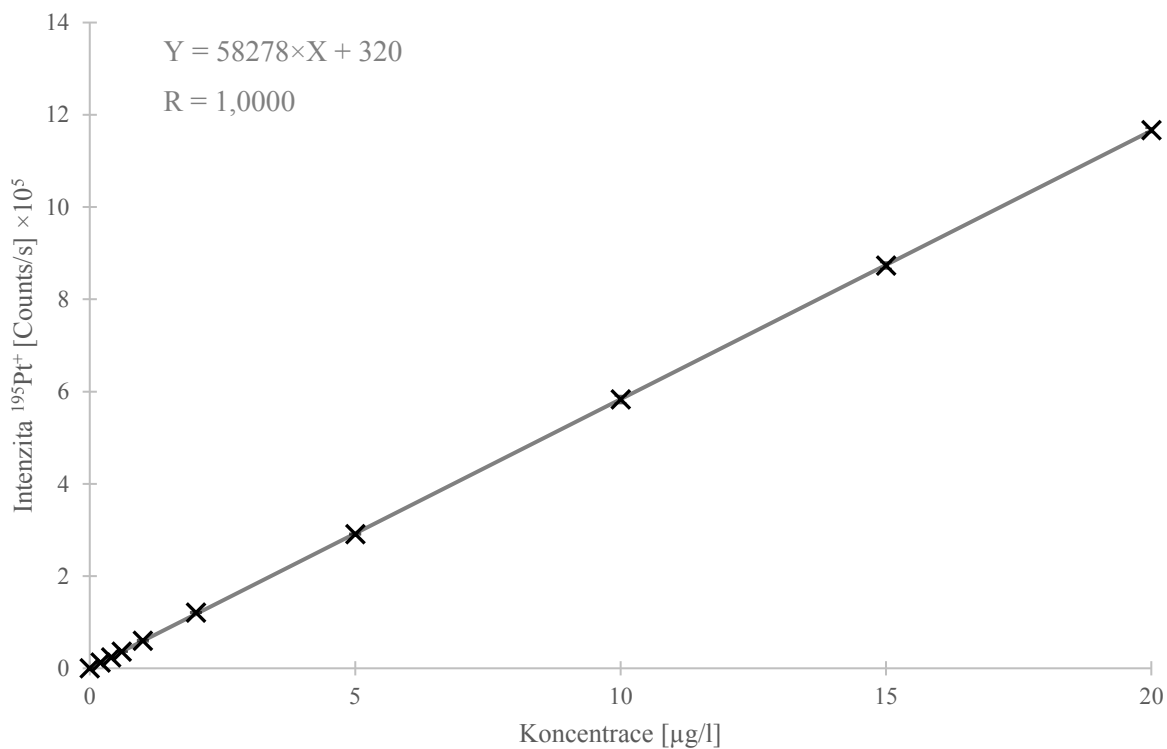
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Stanovení Pt v exosomech

Cílem této bakalářské práce je ověření vhodnosti ICP-MS pro detekci Pt derivátů v exosomech a v případě pozitivního výsledku i stanovení obsahu Pt. Výzkum v oblasti exosomů a extracelulárních vesikulů celkově stále odhaluje nové informace. Ačkoli je předpokládáno, že jsou léčiva buňkami vylučována pomocí exosomů v rámci měření se může jednat i o další typy EV (například ektosomy). Ačkoli ICP-MS dosahuje velice nízkých limitů detekce, nebylo jasné, zda půjde vylučovaná Pt vůbec detekovat, jelikož možné hodnoty koncentrací nebyly známy.

#### 4.1.1 Kalibrace

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.4.3, byla připravena kalibrační závislost (koncentrace [ $\mu\text{g/l}$ ]: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 1; 2; 5; 10; 15 a 20). Celé měření proběhlo v pulzním režimu detektoru. Z Obrázek 15: Kalibrační je patrné, že křivka je lineární až do koncentrace 20  $\mu\text{g/l}$ . Při měření bylo dosaženo limitu detekce (LOD) 0,0050  $\mu\text{g/l}$ . Chybové úsečky odpovídající směrodatným odchylkám měření ( $n = 3$ ) jsou velmi malé, a nejsou tak příliš dobře vidět.



Obrázek 15: Kalibrační závislost použitá pro stanovení Pt ve vzorcích exosomů

#### **4.1.2 Kontrolní měření možné kontaminace**

Po kalibraci byly proměřeny slepé pokusy, které byly připraveny obdobně jako vzorky a byly podrobeny stejným podmínkám a rozkladnému procesu. Cílem bylo odhalit možnou kontaminaci způsobenou během rozkladů například uvolněním z rozkladných zkumavek nebo použité kyseliny. Výsledky měření byly pod LOD, čímž bylo potvrzeno, že při rozkladech nedošlo k detekovatelné kontaminaci.

#### **4.1.3 Stanovení Pt v mineralizovaných vzorcích exosomů a jejich verifikace**

Koncentrace Pt byla stanovena pomocí ICP-MS při nastavení viz kapitola 3.4.4. Bylo provedeno i ověření správnosti měření na ET-AAS. Naměřené hodnoty z ICP-MS i ET-AAS jsou uvedeny v

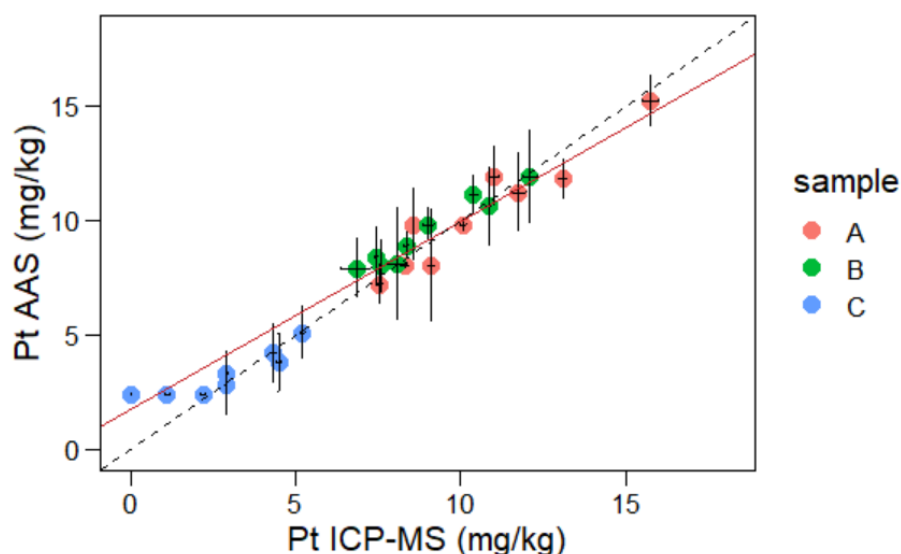
Tabulka 7, rozdíl mezi stanovenými koncentracemi různými metodami nebyl statisticky významný, pokud nebyly blízko LOD.

Koncentrace kontrolních vzorků byly vždy pod limitem detekce obou metod, čímž byla vyloučena kontaminace při kultivaci linií.

Tabulka 7: Koncentrace Pt ve vzorcích exosomů stanovené metodami ICP-MS a ET-AAS

Buněčná linie	Léčivo	Replikát	ICP-MS		ET-AAS		
			c <sub>Pt</sub> [μg/l]	SD [μg/l]	c <sub>Pt</sub> [μg/l]	SD [μg/l]	
SK-OV-3	Kontrola	1	<0,0050	~	<2,4	~	
		2	<0,0050	~	<2,4	~	
		3	<0,0050	~	<2,4	~	
	cisPt	1	8,551	0,009	9,80	1,1	
		2	11,00	0,09	11,9	0,9	
		3	7,56	0,06	7,2	0,6	
	cbPt	1	11,76	0,14	11,2	1,2	
		2	15,73	0,17	15,2	0,8	
		3	13,08	0,09	11,8	0,6	
	oxPt	1	9,11	0,05	8,0	1,7	
		2	8,31	0,08	8,0	0,1	
		3	10,07	0,07	9,8	0,2	
	A2780	Kontrola	1	<0,0050	~	<2,4	~
			2	<0,0050	~	<2,4	~
			3	<0,0050	~	<2,4	~
cisPt		1	9,02	0,11	9,8	0,5	
		2	10,39	0,07	11,1	0,6	
		3	10,84	0,05	10,6	1,2	
cbPt		1	8,35	0,05	8,9	0,4	
		2	7,57	0,04	8,0	0,8	
		3	7,44	0,02	8,4	0,9	
oxPt		1	12,09	0,16	11,9	1,4	
		2	6,8	0,3	7,9	0,9	
		3	8,1	0,2	8,1	1,7	
A2780cis		Kontrola	1	<0,0050	~	<2,4	~
			2	<0,0050	~	<2,4	~
			3	<0,0050	~	<2,4	~
	cisPt	1	12,137	0,012	<2,4	~	
		2	12,04	0,05	3,7	0,6	
		3	4,49	0,04	3,8	0,9	
	cbPt	1	2,19	0,06	<2,4	~	
		2	2,89	0,02	2,8	0,9	
		3	1,10	0,05	<2,4	~	
	oxPt	1	5,20	0,05	5,1	0,8	
		2	2,91	0,02	3,3	0,7	
		3	4,32	0,08	4,2	0,9	

Hodnoty koncentrací zjištěné oběma metodami jsou zobrazeny proti sobě v Obrázek 16, kde čárkovaná přímka ukazuje, kde by ležely body, u kterých by byla oběma metodami zjištěna stejná hodnota koncentrace, jedná se o přímku s jednotkovou směrnicí a nulovým úsekem. Odlišný průběh regresní přímky je způsoben body odpovídající nízkým koncentracím (v grafu vlevo dole) v důsledku vyššího LOD u ET-AAS. Tato regresní přímka byla získána metodou **Demingovy regrese**, která je jednou z variant takzvané orthogonální regrese. V grafu (Obrázek 16) je tato přímka označena červeně. Jelikož jsou experimentální chybou zatíženy nezávislé i závislé proměnné, není možné použít klasický regresní odhad pomocí metody nejmenších čtverců.



Obrázek 16: Porovnání hodnot získaných metodami ICP-MS a ET-AAS pomocí Demingovy regrese  
A – SK-OV-3; B – A2780; C – A2780cis

Z těchto výsledků bylo zjištěno, že vypočtená hodnota *směrnice* je na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  statisticky významně odlišná od 1, což je důsledek vyššího LOD u ET-AAS oproti ICP-MS. Ostatní body, kromě hodnot pohybujících se kolem LOD a odlehlých bodů, ve velké míře přímku s jednotkovou směrnicí a nulovým úsekem respektují.

Vypočtená hodnota *úseku* na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  je také statisticky významně odlišná od 0, to poukazuje na přítomnost systematické konstantní chyby. Nejspíš je to však také způsobeno vysokou hodnotou LOD u ET-AAS.

Ke srovnání výsledků obou metod byl proto použit i **Bland-Altmanův graf** a **modifikovaný Bland-Altmanův graf** (Obrázek 17). Kladná hodnota průměru rozdílů koncentrací změřených ET-AAS a ICP-MS (průměr = 0,71; respektive medián = 0,49) naznačuje, že měření na ET-AAS je zatíženo konstantní systematickou chybou.

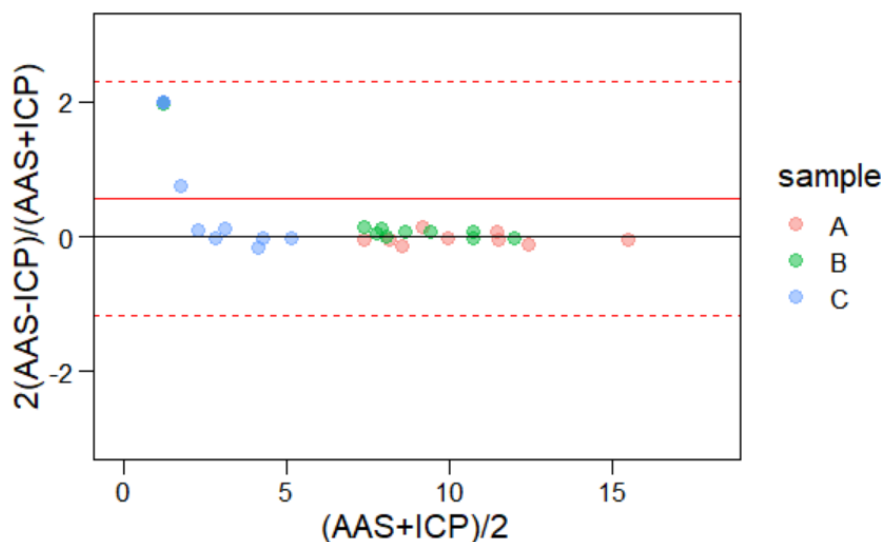
K otestování statistické významnosti mezi spočtenou střední hodnotou rozdílů a ideální hodnotou byl použit jednosouborový oboustranný *Wilcoxonův test*.

Hodnota  $p$  je významně nižší než 0,05 (hladina významnosti), což ukazuje na statisticky významný rozdíl, a tudíž i na existenci významnější konstantní chyby v případě metody ET-AAS. To zřejmě opět souvisí s vysokou hodnotou LOD u ET-AAS v porovnání s ICP-MS.

Rozdíly koncentrací, zejména pro vyšší hodnoty, jsou rozptýleny kolem střední hodnoty, což svědčí o nepřítomnosti systematické proporcionální chyby.

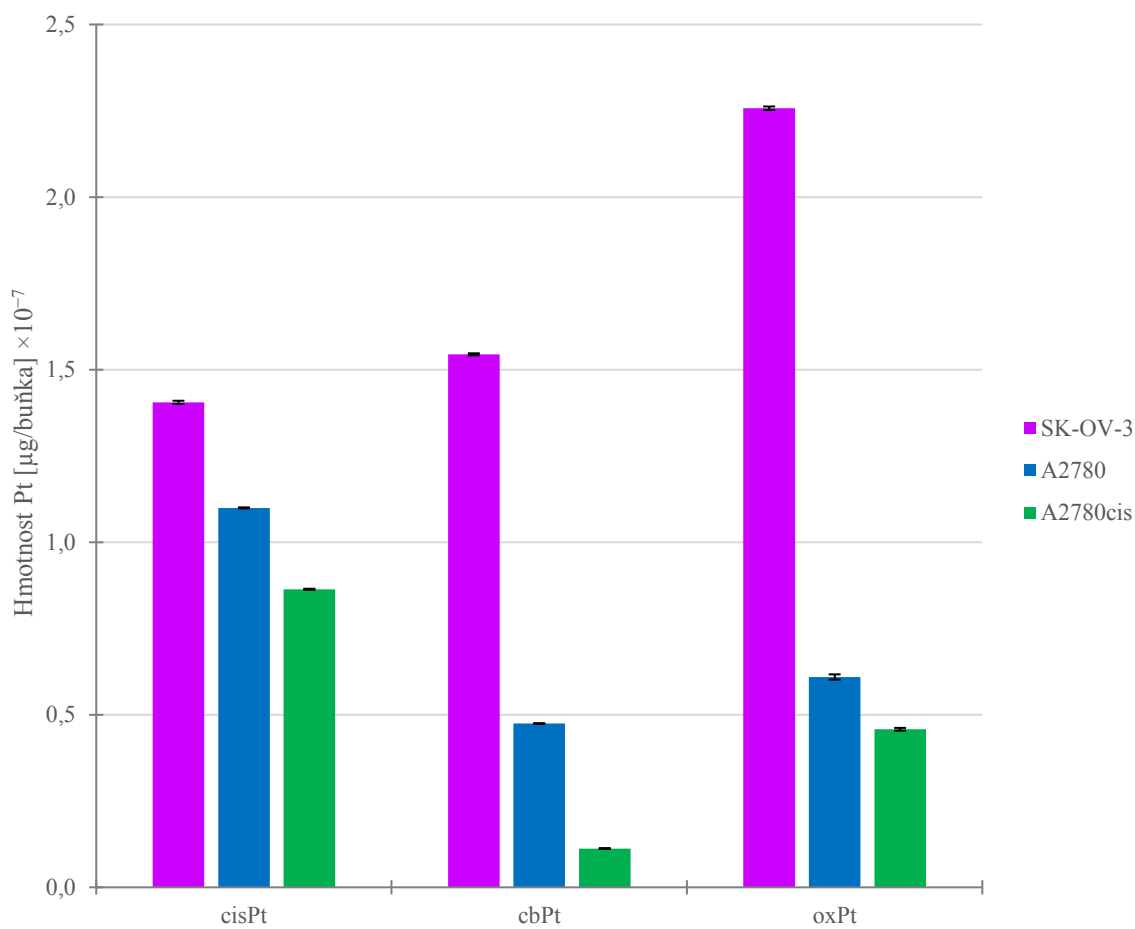
Aby byl odstraněn vliv závislosti velikosti rozptylu hodnot, byla použita modifikace Bland-Altmanova grafu (Obrázek 17) s normalizací rozdílů koncentrací na jejich průměr.

Z tohoto grafu je naprosto zřejmé, že významné rozdíly mezi AAS a ICP jsou pouze v oblasti nízkých koncentrací, zejména u podlimitních hodnot.



Obrázek 17: Porovnání hodnot získaných ICP-MS a ET-AAS pomocí modifikovaného Bland-Altmanova grafu  
A – SK-OV-3; B – A2780; C – A2780cis

Naměřená data byla využita pro porovnání hodnot obsahu chemoterapeutik v jednotlivých exosomech vyloučených příslušnými buněčnými liniemi. Jelikož exosomy byly odebrány z alikvotního podílu 1/20, bylo při vyhodnocování pracováno s 20krát vyššími hodnotami. Následně byla vypočtena hmotnost Pt ve vzorcích exosomů, která byla vztažena na celkový počet živých buněk, z nichž byl vzorek odebrán. Vzhledem k tomu, že vzorky byly odebrány z živého systému, který je variabilní, bylo možné očekávat, že se stanovené hodnoty obsahů Pt v replikátech budou mírně lišit. Avšak hodnoty replikátů bylo možné zprůměrovat s velice nízkými směrodatnými odchylkami. Získaných průměrů bylo následně využito pro další vyhodnocování. Získané hodnoty byly společně se směrodatnými odchylkami vyneseny do grafu (Obrázek 18).

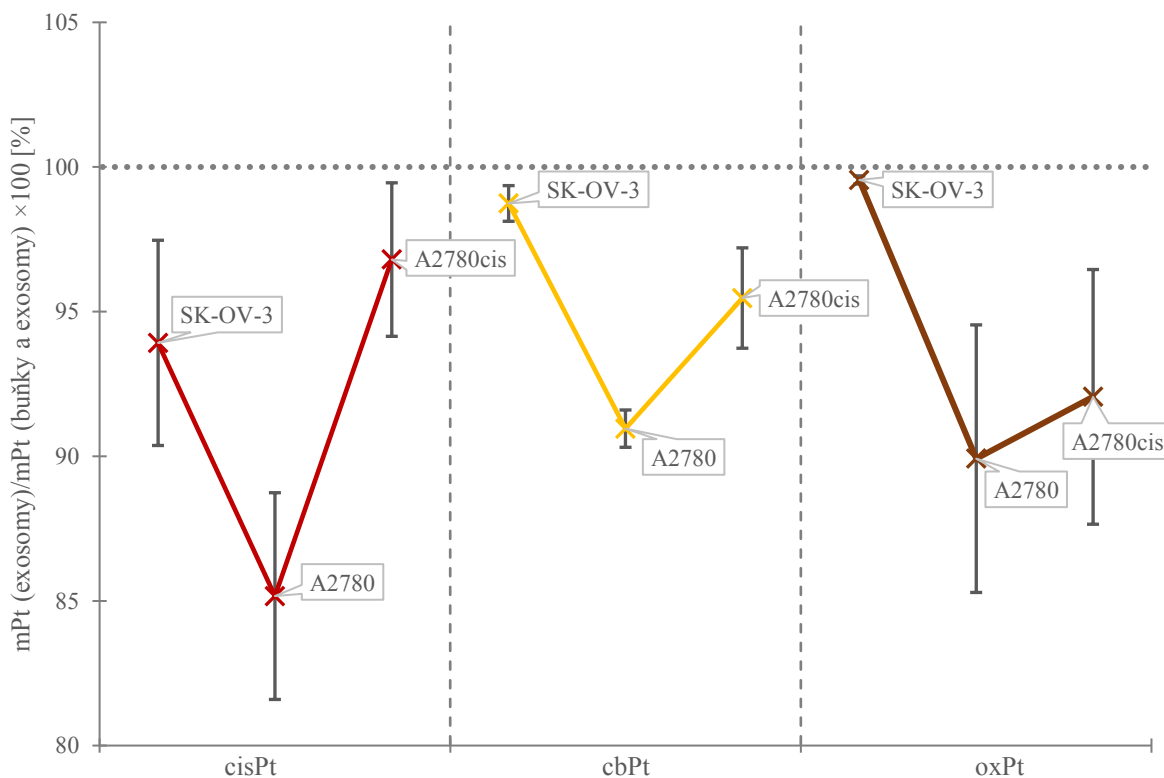


Obrázek 18: Porovnání množství Pt vyloučené pomocí exosomů

Graf (Obrázek 18) reprezentuje hodnoty vyloučeného chemoterapeutika (prostřednictvím hmotnosti Pt) pomocí exosomů ven z buňky. Z grafu je patrné, že všechna chemoterapeutika jsou nejvíce vylučována linií SK-OV-3, která je přirozeně rezistentní, a nejméně A2780cis, která má získanou resistenci a je odvozena od citlivé linie A2780. U linií A2780 a A2780cis došlo k největšímu vyloučení u cisPt a nejméně u cbPt. SK-OV-3 oproti tomu vykazovala největší množství vyloučeného chemoterapeutika v případě oxPt a nejmenší u cisPt. Avšak jedná pouze o zhodnocení stavu po 24 hodinách od treatmentu Pt léčiv, kdy jsou odebrány vzorky. Hodnoty odpovídající situaci v buněčných liniích během časového průběhu od začátku treatmentu do uplynutí 24 hodin se tak mohou značně odlišovat. Nicméně bylo potvrzeno, že využití metody ICP-MS je vhodné, jelikož splňuje požadavky kladené na LOD pro účely těchto experimentů.

Stanovené údaje hmotnosti Pt však nezohledňují množství chemoterapeutika přijatého buňkami, proto bylo pro další výpočty využito dat množství Pt v buňkách po 24 hodinách od treatmentu, které exosomy vylučovaly. Tato data jsou součástí experimentální části bakalářské práce Karin Zelinové (Detekce platinových derivátů pomocí ICP hmotnostní spektrometrie;

2021). Konkrétně byly využity hodnoty stanovených hmotností Pt v buňkách, z jejichž systému byly exosomy odebírány. Vypočtená hmotnost Pt v exosomech byla dána do poměru se součtem hmotností Pt v buňkách a exosomech, což odpovídá celkovému množství přijaté Pt před vyloučením exosomy. Výsledky jsou graficky znázorněny v Obrázek 19.



Obrázek 19: Hmotnostní podíl Pt vyloučené exosomy z buněk

Z grafu (Obrázek 19) je patné, že v exosomech bylo stanoveno několikanásobně větší množství Pt než v buňkách. Toto stanovení je však zatíženo větší náročností procesu izolace exosomů, vlivem čehož může docházet k horšímu promytí od média obsahujícího léčivo než u buněk. Z tohoto důvodu může být toto stanovení mírně zkresleno. Vezmeme-li v úvahu počáteční obsah Pt, které buňky z média přijaly, tak z grafu (Obrázek 19) vyplývá, že nejméně exosomy vylučovala linie A2780. SK-OV-3 nejvíce vylučoval cbPt a oxPt, zatímco cisPt byla nejvíce vylučována A2780cis. Hmotnosti Pt v buňkách i exosomech jsou mimo jiné závislé i na počtu buněk v linii, proto bez vztažení na hmotnost, počet buněk či do poměru nelze příliš porovnávat.

## 4.2 Stanovení Pt v médiích

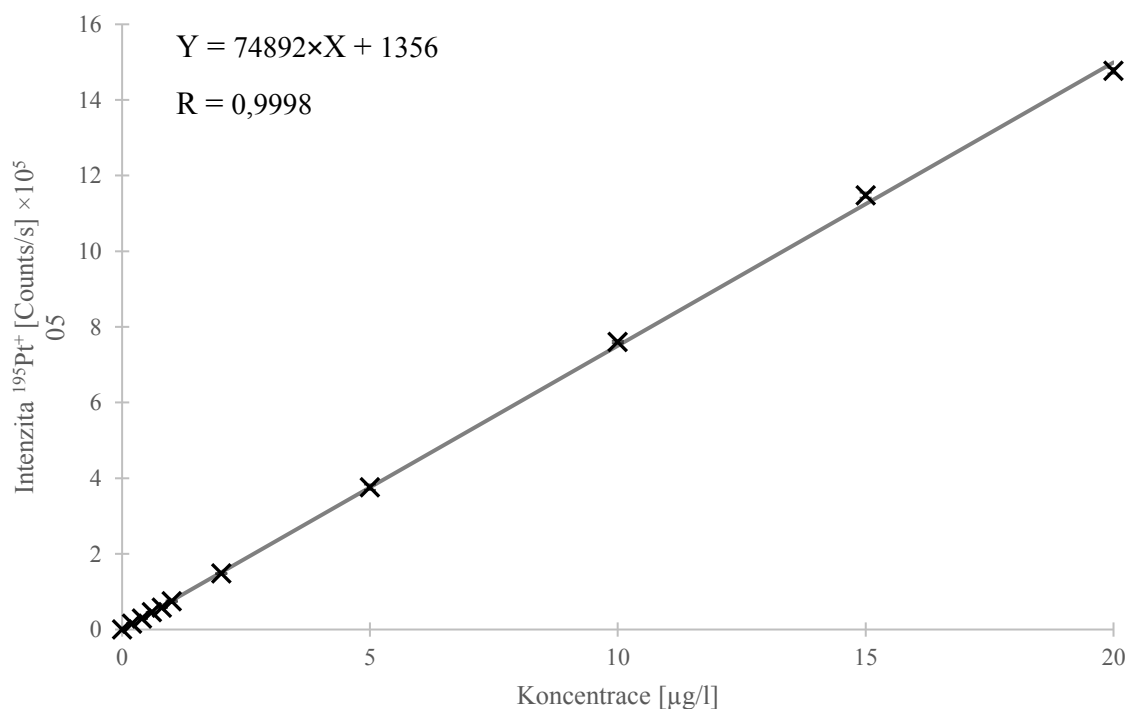
Vedle množství Pt v exosomech bylo stejné měření provedeno i na vzorcích médií. Vzorky byly odebrány po kultivaci s léčivem, tudíž stanovená množství Pt by měla vypovídat o zbylém



léčivu, které se nedostalo do buněk. Ve vzorcích médií se mohou vyskytovat i exosomy, které jsou v něm volně rozptýleny. Avšak nízká koncentrace v exosomech oproti koncentraci Pt v médiu by neměla způsobovat větší odchylky.

#### 4.2.1 Kalibrace

Byla změřena kalibrační závislost (koncentrace [ $\mu\text{g/l}$ ]: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 5; 10; 15 a 20). Celé měření bylo provedeno při pulzním režimu detektoru. Z grafu (Obrázek 20) kalibrační křivky je patrné, že je kalibrační závislost lineární až do koncentrace 20  $\mu\text{g/l}$ . Limit detekce činil 0,0010  $\mu\text{g/l}$ . Chybové úsečky odpovídající směrodatným odchylkám jsou opět velice malé.



Obrázek 20: Kalibrační závislost použitá pro stanovení Pt ve vzorcích médiích

#### 4.2.2 Kontrolní měření možné kontaminace

Bylo provedeno stanovení tří slepých pokusů, které byly připraveny stejným způsobem jako u exosomů. Výsledky měření opět vyvrátily možnou kontaminaci vzniklou při rozkladech. Vedle slepých pokusů byly sledovány i kontroly kultivačních médií (McCoy's 5A a RPMI-1640), kde byly připraveny tři vzorky pro každé médium. Naměřené hodnoty byly pod limitem detekce, tudíž kultivační média nebyla vyhodnocena jako možný zdroj detekovatelné kontaminace.

#### 4.2.3 Stanovení Pt v mineralizovaných vzorcích médií a jejich verifikace

Bylo provedeno měření vzorků médií. Hodnoty jsou zaznamenány v Tabulka 8 společně s hodnotami kontrolního měření na ET-AAS. Rozdíl mezi stanovenými koncentracemi různými metodami nebyl statisticky významný, pokud se neblížily LOD, což bylo dokázáno obdobným způsobem jako u exosomů. Hodnoty byly opět porovnány pomocí **Demingovy regrese**, kvůli odlišnosti byl proto následně ke srovnání výsledků obou metod použit i **Bland-Altmanův graf** a **modifikovaný Bland-Altmanův graf**. Ze získaných grafů bylo usouzeno, že významné rozdíly mezi AAS a ICP jsou pouze v oblasti nízkých koncentrací.

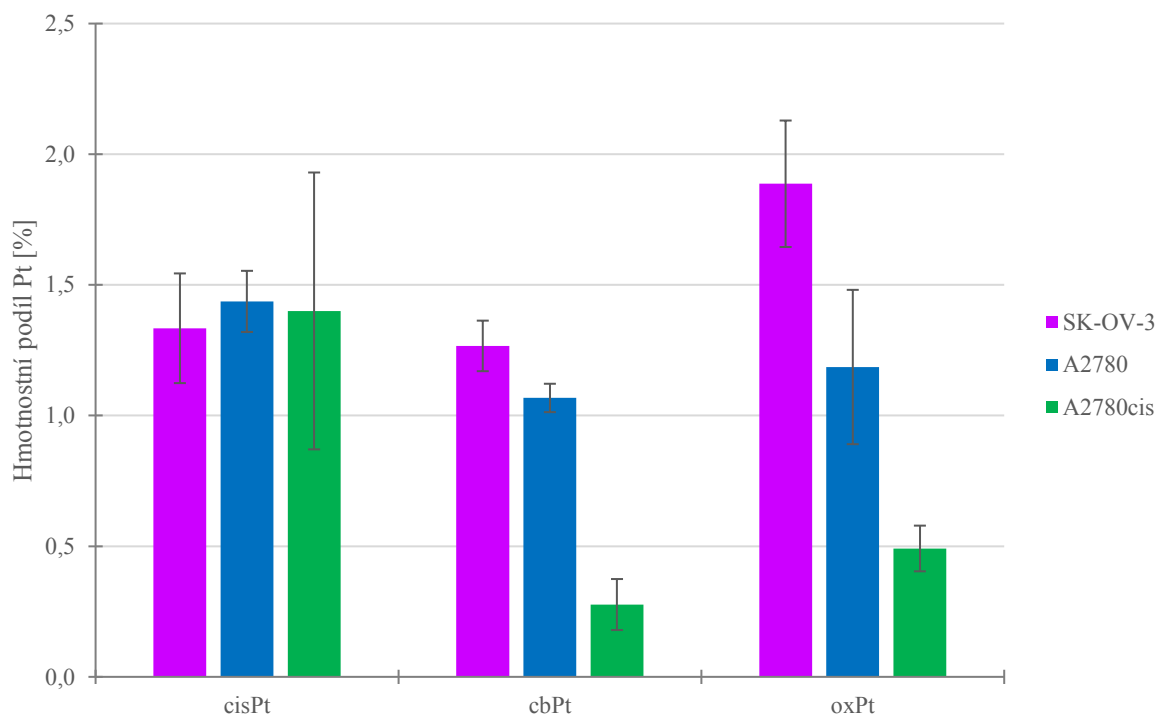
Koncentrace Pt v kontrolních vzorcích byly opět pod limitem detekce, čímž byla možná kontaminace vzniklá při kultivaci stanovena pod detekovatelnou mez.

Tabulka 8: Koncentrace Pt ve vzorcích medií stanovené metodami ICP-MS a ET-AAS

MÉDIA			ICP-MS		AAS		
Buněčná linie	Léčivo	Replikát	c <sub>Pt</sub> [µg/l]	SD [µg/l]	c <sub>Pt</sub> [µg/l]	SD [µg/l]	
SK-OV-3	Kontrola	1	<0,0010	~	<2,4	~	
		2	<0,0010	~	<2,4	~	
		3	<0,0010	~	<2,4	~	
	cisPt	1	39,7	0,2	32,1	1,3	
		2	40	3	35,7	1,1	
		3	39,5	0,2	32,6	0,3	
	cbPt	1	41,7	0,5	35,8	1,5	
		2	42,5	0,3	37,3	0,8	
		3	42,3	0,2	34,7	1,7	
	oxPt	1	44,3	0,8	37,7	0,8	
		2	42,6	0,6	36,3	0,7	
		3	41,36	0,12	36,0	0,2	
	A2780	Kontrola	1	<0,0010	~	<2,4	~
			2	<0,0010	~	<2,4	~
			3	<0,0010	~	<2,4	~
cisPt		1	42,3	0,3	34,2	0,3	
		2	40,71	0,16	31,9	0,9	
		3	42,73	0,09	35,7	0,9	
cbPt		1	42,2	0,6	37,7	0,6	
		2	39,8	0,3	35	3	
		3	41,74	0,08	38,5	1,6	
oxPt		1	42,2	0,3	39,3	1,0	
		2	42,1	0,5	36	2	
		3	44,1	0,5	40,1	0,8	
A2780cis		Kontrola	1	<0,0010	~	<2,4	~
			2	<0,0010	~	<2,4	~
			3	<0,0010	~	<2,4	~
	cisPt	1	37,8	1,7	38,0	0,7	
		2	39,41	0,08	36,0	0,9	
		3	39,6	0,2	37	2	
	cbPt	1	40,5	0,2	43,6	0,6	
		2	43,9	1,2	47	2	
		3	43,0	0,8	42,1	0,4	
	oxPt	1	32,6*	0,2	32	2	
		2	41,3	0,5	41	2	
		3	42,2	0,3	45	2	

\*hodnota koncentrace tohoto replikátů byla pro svoji odlehlost z dalších výpočtů vyloučena

Jelikož na MOÚ byl odebrán alikvotní podíl 1/10 z celkového objemu a na rozklad byla odebrána 1/10 vzorku z MOÚ, byl výsledný alikvotní podíl 1/100 v dalších výpočtech zohledněn. Koncentrace byla přepočtena na hmotnost Pt v médiu. Vzhledem ke způsobu odebrání vzorku médií v nich byly přítomny i exosomy, ovšem množství Pt obsažené v exosomech tvoří jen malý zlomek celkového obsahu Pt v médiích (Obrázek 21).



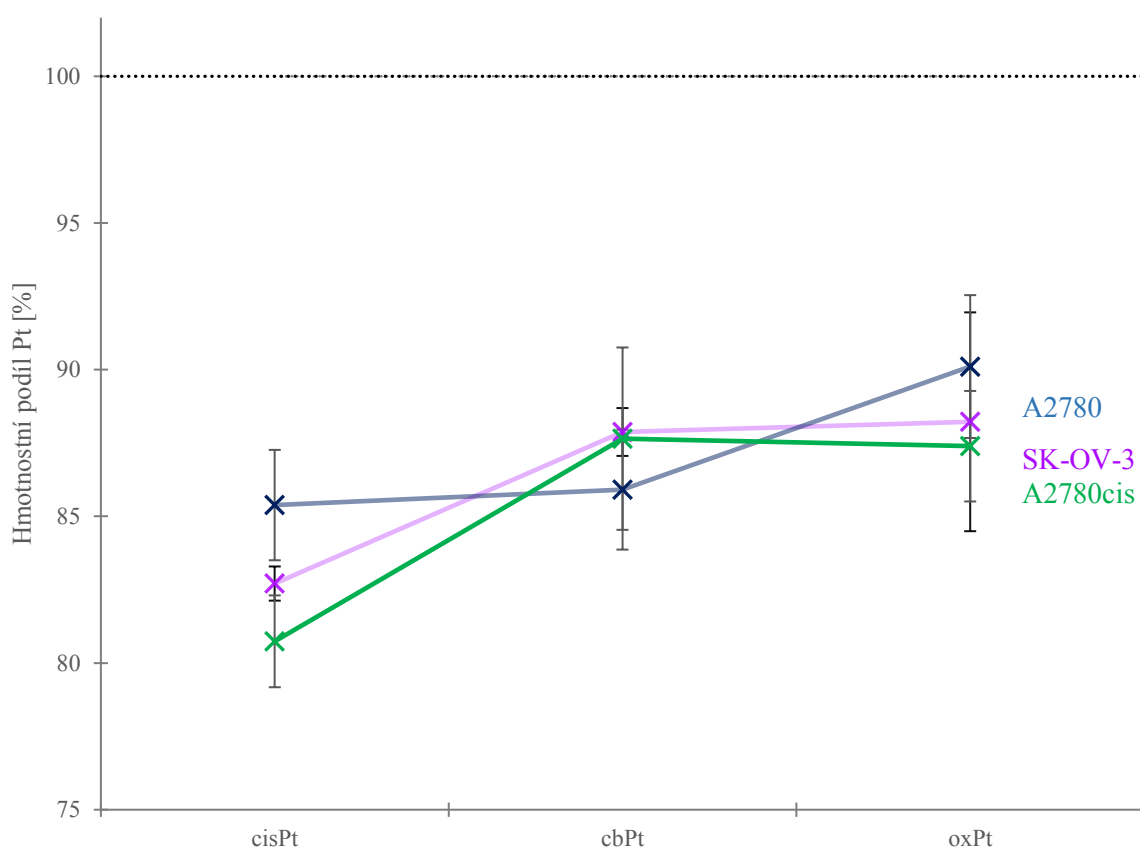
Obrázek 21: Hmotnostní podíl Pt v exosomech vůči celkové Pt v médiu

Výsledky získané z médií jsou opět prezentovány jako průměr hodnot všech replikátů s výjimkou oxPt v linii A2780cis, kdy byl 1. replikát, který je v Tabulka 8 označen \*, z výpočtů vyloučen pro svou odlišnost.

Následně byla hmotnost Pt stanovená v médiích po treatmentu vztažena na hmotnost Pt v celém objemu 10 $\mu$ mol/l média před treatmentem (19,5  $\mu$ g Pt). Hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 9, jejímž grafickým znázorněním je Obrázek 22. Výsledné hodnoty jsou teoreticky procentuálním vyjádřením množství léčiva, které buňky neabsorbovaly či vyloučily ven pomocí exosomů.

Tabulka 9: Hodnoty procentuálního podílu léčiva zbylého v médiích po treatmentu

		Pt [%]	SD [%]
<b>SK-OV-3</b>	<b>cisPt</b>	82,71	0,58
	<b>cbPt</b>	87,88	0,82
	<b>oxPt</b>	88,2	3,7
<b>A2780</b>	<b>cisPt</b>	85,4	1,9
	<b>cbPt</b>	85,9	2,0
	<b>oxPt</b>	90,1	2,4
<b>A2780cis</b>	<b>cisPt</b>	80,7	1,6
	<b>cbPt</b>	87,6	3,1
	<b>oxPt</b>	87,4	1,9

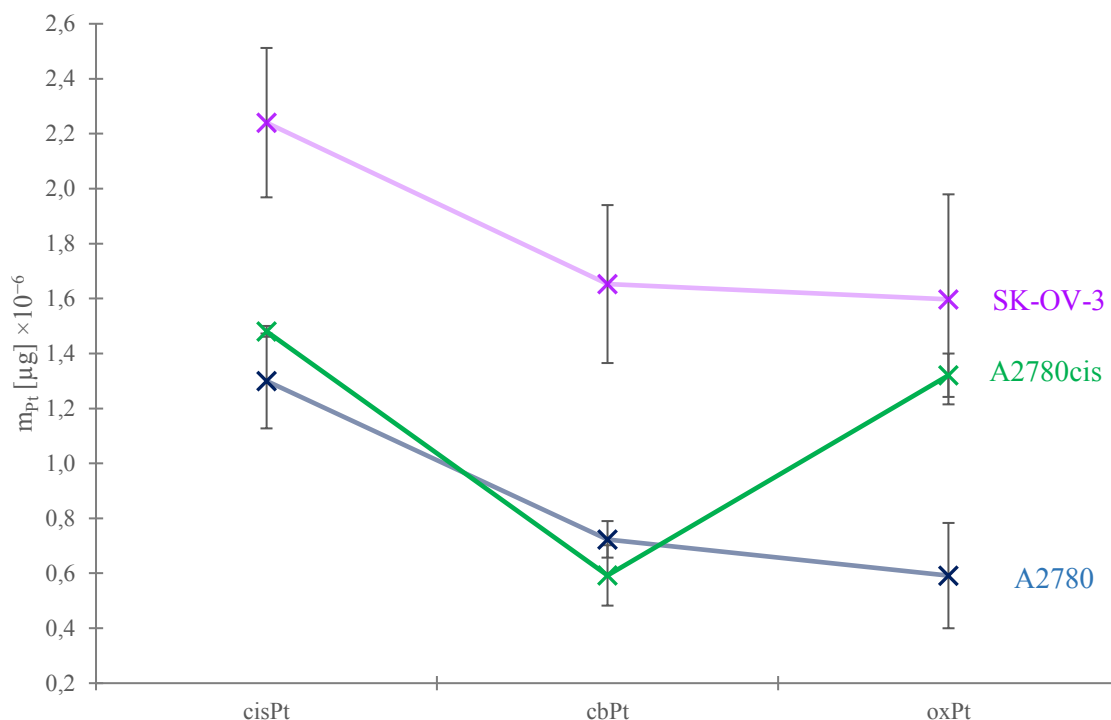


Obrázek 22: Grafické znázornění zbylého léčiva v médiích po interakci Pt derivátů s buněčnými liniemi A2780, A2780cis, SK-OV-3

Z grafu (Obrázek 22) je patrné, že příjem chemoterapeutika se může lišit v závislosti na linii, která je mu vystavena. SK-OV-3 vykazuje nejmenší zbytek u cisPt, zatímco cbPt a oxPt zůstává v buňkách přibližně stejně. Linie A2780 nevykazuje velké rozdíly mezi cisPt a cbPt, ale množství oxPt zbylé v médiu je vyšší. U A2780cis lze pozorovat zhruba stejné výsledky u cbPt, tak u oxPt, zůstatek u cisPt je nejnižší. Vzhledem k různým počtům buněk v jednotlivých

liniích, nemusejí být tyto údaje zcela vypovídající o chování jednotlivých linií, jelikož množství přijatého léčiva se odvíjí i od počtu buněk v linii.

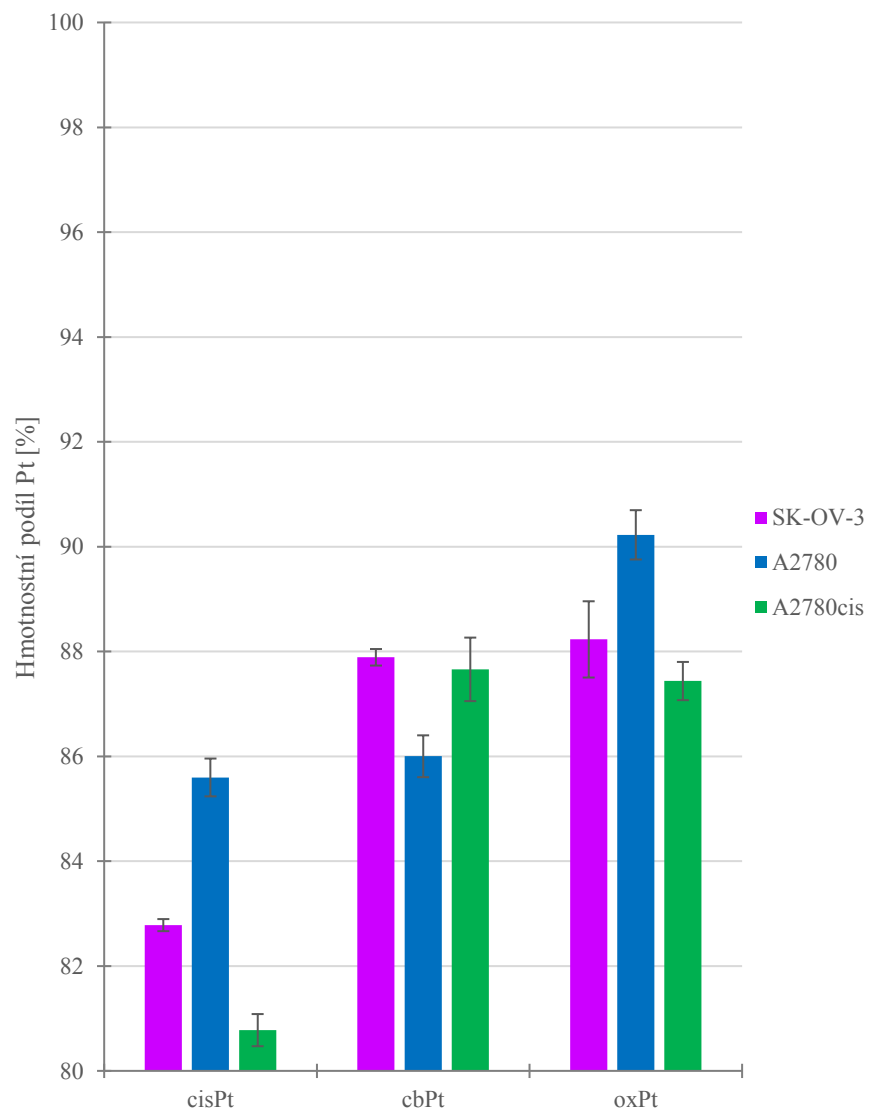
Proto byla od zbylého léčiva v médiích odvozena teoretická hmotnost Pt v buňkách, která byla následně vztažena na počet buněk v linii. Hodnoty byly následně vyneseny do grafu (Obrázek 23).



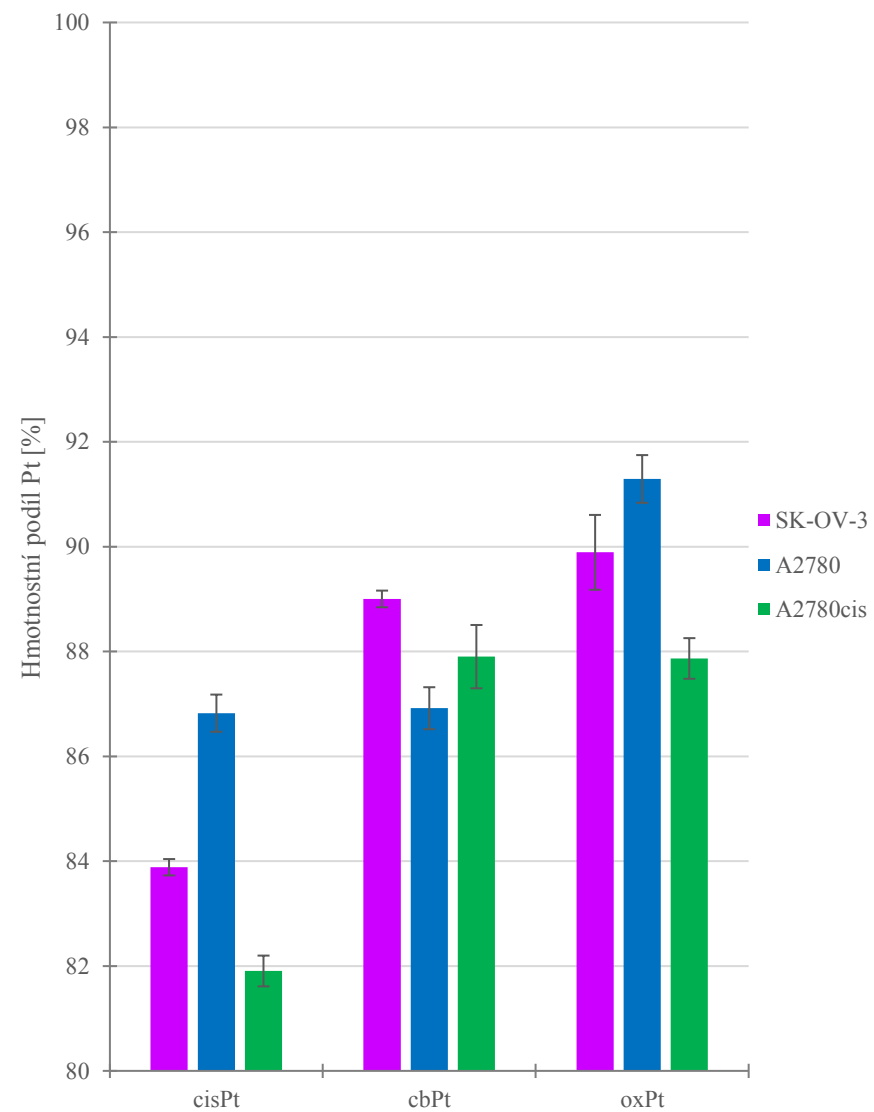
Obrázek 23: Teoretická hmotnost Pt v 1 buňce

Z grafu (Obrázek 23) je patrné, že nejvíce Pt teoreticky zůstávalo v linii SK-OV-3 u všech tří léčiv. SK-OV-3 a A2780 obsahují nejvíce cisPt a nejméně oxPt, ačkoli u SK-OV-3 se při zohlednění chybových úseček hodnoty překrývají u všech chemoterapeutik. Linie A2780cis obsahuje přibližně stejně cisPt jako oxPt a výrazně nejméně cbPt ze všech linií. Výsledek se však liší od hodnot získaných v bakalářské práci Karin Zelinové (Detekce platinových derivátů pomocí ICP hmotnostní spektrometrie; 2021). Reálná množství Pt v buňkách byla až o 3 řády nižší, tudíž byla oproti množství Pt v médiích zanedbatelně malá.

Následně byl proveden součet hmotností Pt v médiích a buňkách (reálná hmotnost), který byl vztažen na hmotnost Pt, jež byla původně dodána buňkám (19,5 µg). Hodnoty byly vyneseny do grafu, který je na Obrázek 24. Dále byl proveden podobný součet, kdy byly přičteny i exosomy (Obrázek 25), jelikož však média obsahovala i exosomy, byla jejich hmotnost teoreticky započtena dvakrát. Nicméně rozdíly hodnot mezi grafy tvořily cca 1 %, což je hodnota odpovídající chybě, kterou bylo zatíženo stanovení Pt v médiích pomocí ICP-MS, tudíž je tento rozdíl zanedbatelný.



Obrázek 24: Hmotnostní podíl součtu hmotností Pt v médiích a buňkách vztaženého na hmotnost Pt v treatmentu



Obrázek 25: Hmotnostní podíl součtu hmotností Pt v médiích, buňkách a exosomech vztaženého na hmotnost Pt v treatmentu

Z Obrázek 24 a Obrázek 25 vyplývá, že je celý experiment zatížen značnou chybovostí, kdy je celkově stanovená Pt průměrně o 13 % nižší než Pt celkem dodaná systému. Chybovost je vzniklá variabilitou živého systému, chybou vnášenou přepočty, proplachy biologických vzorků, chyby vzniklé při kultivaci a přípravě vzorků. Vzhledem k tomu, že se jedná o pilotní studii, nebylo možné veškeré podmínky optimalizovat, tudíž mohlo dojít ke ztrátám způsobeným ulpíváním na stěnách nádob, ve kterých byly vzorky transportovány či nedokonalým přenesením vzorku při rozkladech. Dalším problémem je, že při této koncentraci chemoterapeutika jsou množství Pt obsažená v exosomech a buňkách natolik nízká oproti hodnotám v médiích, že jsou v rámci velikosti chyb stanovení Pt v médiích zanedbatelné, tudíž ze zbylého množství Pt v médiích při této koncentraci nelze přepočítat obsah Pt, který zůstal nevyložený v buňkách.

Aby další studie bylo možné provést s lépe vedenou metodikou, bylo by třeba zajistit:

- Odebrání většího alikvotního podílu pro vzorky médií a exosomů pro nižší chybu při přepočtu.
- Stáčení vzorků do zkumavek vhodných pro centrifugaci na MOÚ i rozklad, čímž by byla eliminována potřeba vzorky několikrát převádět.
- V případě potřeby vzorek převést, zajistit kvantitativní i kvalitativní převádění a zároveň zajistit, aby byl známý objem dostatečně velký a reprezentoval tak lépe celek.
- Při úpravě vzorků předejít možnému ulpívání na stěnách.
- Pro lepší možnost vyhodnocení dat u exosomů by bylo nutné znát jejich počet ve vzorku. V této pilotní studii bylo možné stanovit pouze počet buněk v linii, nikoli však počet exosomů.
- Kultivace vzorků za různých koncentrací léčiva, pro zjištění chování živého systému za různých podmínek.
- Odebírání vzorků v různých časových intervalech na prostudování kinetiky uvolňování Pt exosomy ven z buněk.



## 5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské bylo ověření vhodnosti metody ICP-MS pro detekci a následné stanovení Pt derivátů v extracelulárních vesikulech a možnost využití v dalších experimentech. Metoda se ukázala nejen jako vhodná, ale její spolehlivost byla ověřena pomocí kontrolního měření na AAS.

Ze získaných výsledků lze navíc usuzovat, že přirozeně rezistentní linie SK-OV-3 pravděpodobně využívá mechanismu vyloučení chemoterapeutika z buněk pomocí extracelulárních vesikulů (exosomů), tudíž v nich chemoterapeutika nemají možnost efektivně účinkovat. Oproti tomu u linie A2780cis se zdá, že exosomy také hojně vylučovala, ale buňky zároveň Pt příliš nepřijímaly, získaná resistance tedy pravděpodobně podléhá jinému mechanismu. Linie A2780 a A2780cis, která je od A2780 odvozená, mají podobný trend u množství vyloučené Pt pomocí exosomů, kdy je nejvíc vylučována cisPt a nejméně cbPt. Oproti tomu SK-OV-3 nejvíce vylučuje oxPt a nejméně cisPt.

Při porovnání množství Pt v exosomech a buňkách bylo stanoveno více Pt v exosomech. Toto vyhodnocení však podléhá možné chybě vzniklé nedokonalým izolování exosomů od média obsahujícího léčivo. Proto by bylo vhodné experiment zopakovat s dokonalejší metodou izolace a získané výsledky znovu porovnat.

Získaná data jsou však vztažena pouze na 24 hodin po začátku treatmentu, tudíž kinetika vylučování chemoterapeutik je jedním z témat dalšího možného výzkumu. Dalším krokem by mohlo dále být potvrzení mezibuněčné komunikace pomocí extracelulárních vesikulů (exosomů), kdy by se stanovovalo množství Pt v buňkách, která jim byla dodána nikoli médiem, ale přímo pomocí exosomů.

## 6 SEZNAM ZKRATEK

AAS	Atomová Absorpční Spektrometrie
APC	Antigen presenting cell (Antigen prezentující buňky)
cisPt	Cisplatina
cbPt	Karboplatina
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport (Endosomální třídící komplex nutný pro transport)
EV	Extracelulární vesikuly
ICP	Inductively Coupled Plasma (Indukčně vázané plazma)
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Hmotnostní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu)
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem)
LOD	Limit of detection (Limit detekce)
MS	Mass Spectrometry (Hmotnostní spektrometrie)
NK	Natural killer
oxPt	Oxaliplatina
PTFE	Polytetrafluorethylen

## 7 ZDROJE

- [1] ALBERTS, Bruce, Denis BRAY a Alexander JOHNSON. První seznámení s buňkami. In: *Základy buněčné biologie*. 1. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 1998, s. 1–36. ISBN 80-902906-0-4.
- [2] ALBERTS, Bruce, Denis BRAY a Alexander JOHNSON. Komunikace mezi buňkami. In: *Základy buněčné biologie*. 1. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 1998, s. 482–510. ISBN 80-902906-0-4.
- [3] SKALNÍKOVÁ KUPCOVÁ, Helena. Proteinová sekrece buněk savců aneb jak si buňky povídají a jak jim naslouchat. *Živa*. 2013, **2**, 50–53.
- [4] KITTMAR, Otomar a Dana MAREŠOVÁ. Fyziologie žláz s vnitřní sekrecí. In: *Lékařská fyziologie*. 1. Praha: Grada Publishing, 2011, s. 495–506. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [5] KITTMAR, Otomar a Miloš LANGMEIER. Obecná neurofyziologie. In: *Lékařská fyziologie*. 1. Praha: Grada Publishing, 2011, s. 67–87. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [6] SKALNÍKOVÁ KUPCOVÁ, Helena. Typy váčků a jejich fyziologické úlohy v mezibuněčné komunikaci. *Živa*. 2016, **6**, 274–277.
- [7] GOULD, Stephen J a Graç RAPOSO. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2013, **2**(1), 1–3. Dostupné z: doi:10.3402/jev.v2i0.20389
- [8] RAPOSO, Graça a Willem STORVOGEL. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2013, **200**(4), 373–383. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201211138
- [9] CAMUSSI, Giovanni, Maria C DEREGIBUS, Stefania BRUNO, Vincenzo CANTALUPPI a Luigi BIANCONE. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International* [online]. 2010, **78**(9), 838–848. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2010.278
- [10] JOHNSTONE, Rose M, Mohammed ADAM, J. R. HAMMOND, L. ORR a Claire TURBIDE. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*. 1987, **262**(19), 9412–9420. ISSN 00219258.
- [11] KOWAL, Joanna, Mercedes TKACH a Clotilde THÉRY. *Biogenesis and secretion of exosomes* [online]. B.m.: Elsevier Ltd. 2014. ISSN 18790410. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004. ()

- [12] COCUCCI, Emanuele a Jacopo MELDOLESI. *Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles* [online]. B.m.: Elsevier Ltd. 1. červen 2015. ISSN 18793088. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2015.01.004. i o ektozomech --&gt; je i v úvodu
- [13] IMMUNOSTEP. *EXOSOME RESEARCH SERVICES* [online]. 2019 [vid. 2020-03-20]. Dostupné z: <https://www.immunostep.com/content/40-exosomes-service>
- [14] KUPCOV, Helena a Hana KOV. Exozomy a jejich význam u patofyziologických stavů člověka. *Živa*. 2017, **1**, 4–7.
- [15] GREENING, David W, Shashi K GOPAL, Rong XU, Richard J SIMPSON a Weisan CHEN. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2015, **40**, 72–81. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcd.2015.02.009
- [16] PETERA, Jiří a Bohuslav MELICHAR. Biologie zhoubných nádorů: Imunologie nádorového bujení. In: *Obecná onkologie: Učebnice pro lékařské fakulty*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze – nakladatelství Karolinum, 2005, s. 29–37. ISBN 80-246-0968-1.
- [17] HAO, Singuo, Ou BAI, Fang LI, Jinying YUAN, Suzanne LAFERTE a Jim XIANG. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity. *Immunology* [online]. 2006, **120**, 90–102. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02483.x
- [18] SAFAEI, Roohangiz, Barrett J LARSON, Timothy C CHENG, Michael A GIBSON, Shinji OTANI, Wiltrud NAERDEMANN, Stephen B HOWELL REBECCA a John MOORE. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* [online]. 2005, **4**(10), 1595–1604. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0102
- [19] BALÁZS, Györfy, Violeta SERRA, Karsten JÜRCHOTT, Rula ABDUL-GHANI, Mitch GARBER, Ulrike STEIN, Iver PETERSEN, Hermann LAGE, Manfred DIETEL a Reinhold SCHÄFER. Prediction of doxorubicin sensitivity in breast tumors based on gene expression profiles of drug-resistant cell lines correlates with patient survival. *Oncogene* [online]. 2005, **24**, 7542–7551. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1208908
- [20] VAN DEUN, Jan, Quentin ROUX, Sarah DEVILLE, Thibaut VAN ACKER, Pekka RAPPU, Ilkka MIINALAINEN, Jyrki HEINO, Frank VANHAECKE, Bruno G. DE GEEST, Olivier DE WEVER a An HENDRIX. Feasibility of Mechanical Extrusion to Coat Nanoparticles with Extracellular Vesicle Membranes. *Cells* [online]. 2020, **9**(8), 1–

15. ISSN 20734409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9081797
- [21] MOMEN-HERAVI, Fatemeh, Leonora BALAJ, Sara ALIAN, Pierre-Yves MANTEL, Allison E HALLECK, Alexander J TRACHTENBERG, Cesar E SORIA, Shanice OQUIN, Christina M BONEBREAK, Elif SARACOGLU, Johan SKOG a Winston Patrick KUO. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem* [online]. 2013, **394**(10), 1253–1262. Dostupné z: doi:10.1515/hsz-2013-0141
- [22] NEURAUTER, Axl A, Bente KIERULF, Berit M REED a Ketil W PEDERSEN. *Automated pull-down of extracellular vesicles (EVs) on the KingFisher system using Dynabeads magnetic beads-standardizing EV capture and analysis*. 2019.
- [23] SOUMAROVÁ, Renata a Martina KUBECOVÁ. Systémová terapie solidních nádorů: Chemoterapie. In: *ONKOLOGIE: Učební texty pro studenty 3. lékařské fakulty*. 2. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, 2019, s. 48–55. ISBN 978-80-87878-37-8.
- [24] LÜLLMAN, H, K MOHR a L HEIN. Cytostatika. In: *Barevný atlas farmakologie*. 3. vyd. Havláčkův Brod: GRADA Publishing, 2007, s. 300–305. ISBN 978-80-247-1672-5.
- [25] WALLIS, Denise, James CLAFFEY, Brendan GLEESON, Megan HOGAN, Helge MÜLLER-BUNZ a Matthias TACKE. Novel zirconocene anticancer drugs? *Journal of Organometallic Chemistry* [online]. 2009, **694**(6), 828–833. ISSN 0022328X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jorgchem.2008.08.020
- [26] KHANAPURE, Sharanabasappa, Megha JAGADALE, Prakash BANSODE, Prafulla CHOUDHARI a Gajanan RASHINKAR. Anticancer activity of ruthenocenyl chalcones and their molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2018, **1173**, 142–147. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2018.06.091
- [27] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. Hmotnostní spektrometrie. In: *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019, s. 735–750. ISBN 978-807-5920-430-0.
- [28] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. Kinetické a separační metody. In: *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019, s. 751–874. ISBN 978-807-5920-430-0.
- [29] *J.J. Thomson Biographical* [online]. [vid. 2020-12-20]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1906/thomson/biographical/>
- [30] JONES, Mark. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry: A National Historic Chemical Landmark* [online]. 2019 [vid. 2020-12-20]. Dostupné

z: <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/gas-chromatography-mass-spectrometry.html>

- [31] FRIEDECKÝ D a LEMR K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Biochem. Metab.* 2012, **20**(41), 152–157.
- [32] JANEČEK, Ivan. Struktura a vlastnosti atomového jádra. In: *Atomová a jaderná fyzika: Díl II. Fyzika atomového jádra a fyzika elementárních částic a jejich interakcí 2.* Ostrava: OSTRAVSKÁ UNIVERZITA PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, 2007, s. 9–28.
- [33] BECKER, Johanna Sabine. History of Mass Spectrometric Techniques. In: *Inorganic mass spectrometry.* 1. vyd. Chichester: Wiley, 2007, s. 7–22. ISBN 9780470012000.
- [34] ZÁRUBA, Kamil. Hmotnostní spektrometrie. In: *Analytická chemie 1.* Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016, s. 197–213. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [35] KANICKÝ, Viktor. Analytické vlastnosti ICP-MS. In: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: Sborník přednášek 2015.* B.m.: SSJMM, 2015.
- [36] OTRUBA, Vítězslav. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. In: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: Sborník přednášek 2015.* B.m.: SSJMM, 2015.
- [37] MÍKOVÁ, Jitka. Izotopová analýza – využití ICP-MS pro stanovení izotopových poměrů. In: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: Sborník přednášek 2015.* B.m.: SSJMM, 2015.
- [38] MACHÁT, Jiří. ICP-MS jako prvkově specifický detektor pro chromatografické techniky. In: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: Sborník přednášek 2015.* B.m.: SSJMM, 2015.
- [39] KANICKÝ, Viktor. Zavádění vzorku do plazmatu. In: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: Sborník přednášek 2015.* B.m.: SSJMM, 2015.
- [40] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. Atomová spektroskopie. In: *Analytická chemie.* 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019, s. 705–734. ISBN 978-807-5920-430-0.
- [41] OTRUBA, Vítězslav. Plazma jako spektroskopický zdroj. In: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: Sborník přednášek 2015.* B.m.: SSJMM, 2015.
- [42] KANICKÝ, Viktor. Fyzikální základy ICP. In: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: Sborník přednášek 2015.* B.m.: SSJMM, 2015.
- [43] BERKER, Johanna Sabine. Ion Separation. In: *Inorganic mass spectrometry: principles and applications.* Chichester: Wiley, 2007, s. 98. ISBN 978-0-470-01200-0.

- [44] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. Vzorkování, standardizace a kalibrace. In: *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019, s. 129–179. ISBN 978-807-5920-430-0.
- [45] MACHÁT, Jiří. Kolizně-reakční cela pro eliminaci skeptálních interferencí v ICP-MS. In: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: Sborník přednášek 2015*. B.m.: SSJMM, 2015.
- [46] ZÁRUBA, Kamil. Atomová spektrometrie. In: *Analytická chemie 2*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016, s. 47–73. ISBN 978-80-7080-951-8.
- [47] AMMANN, Adrian A. *Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): A versatile tool* [online]. duben 2007. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.1206
- [48] VAŠINOVÁ GALIOVÁ, Michaela, Viktor KANICKÝ a Jan HAVLIS. Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry as a Tool in Biological Sciences. In: *Natural Products Analysis: Instrumentation, Methods, and Applications*. B.m.: Wiley, 2014, s. 313–348. ISBN 978-1-118-46661-2.