

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Lékařská fakulta**

**STUDIUM DNA A MAGNETICKÝCH NOSIČŮ  
METODOU MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL**

**Mgr. Hana Zapletalová**

**Školitel: Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.**

**Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP**

**Olomouc 2016**



Prohlašuji, že jsem svou disertační práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité zdroje literatury.

Olomouc, 2016

.....  
Mgr. Hana Zapletalová



Děkuji své školitelce, prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. za odborné vedení během svého doktorského studia, zejména za poskytnuté zázemí pro experimentální i teoretickou práci, profesionální i lidský přístup, trpělivost a tvůrčí směřování.

Dále děkuji celému kolektivu Ústavu lékařské biofyziky za poskytnuté příjemné podmínky k práci a vytváření kolektivního, týmového prostředí; své rodině za neustálou podporu a motivaci.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů: LO 1304, MZČR NT 14060.



# Obsah

Seznam zkratk a pojmů.....	4
Cíle dizertační práce .....	6
1. Mikroskopické metody .....	7
1.1. Mikroskopie atomárních sil (AFM) .....	9
1.2. Klíčové proměnné při AFM měření.....	11
1.3. Režimy snímání a datové kanály AFM mikroskopu .....	14
Kontaktní režim (CM-AFM) .....	14
Nekontaktní režim (NCM-AFM) .....	15
Přerušovaný režim, TAPPING, Intermittent, .....	16
ScanAsyst, FM - AFM .....	16
Datové kanály .....	17
1.4. Artefakty AFM zobrazování a analýz.....	18
Artefakty vztažené k hrotu a nosníku .....	18
Artefakty vztažené k PIEZO systému .....	20
Artefakty způsobené vzorkem .....	20
1.5. Modifikace substrátu pro AFM měření – aplikace makromolekul.....	21
Struktura muskovitu .....	21
Modifikace bivalentními kationty .....	23
Modifikace alkoxyasilany .....	23
Modifikace aminopropylsilatranem.....	25
Ostatní způsoby modifikace slídového povrchu.....	26
Modifikace skla, HOPG a Au.....	27
1.6. Aplikace AFM v oblasti nukleových kyselin.....	27
1.7. Kontaktní úhel.....	29
2. Poškození DNA a metody jeho detekce .....	31
2.1. Oxidativní stres .....	31
2.2. Fotodynamické působení .....	32
2.3. PDT a způsob buněčné smrti .....	34
2.4. Toxické poškození DNA .....	35
Struktura DNA molekuly .....	35
Oxidační poškození DNA.....	36
2.5. Metody detekce poškození DNA .....	37
Elektroforetické metody detekce poškození DNA .....	38
Elektroforézní mikroskopická metoda - kometová analýza .....	39
Možnosti AFM při studiu poškození jednotlivých molekul DNA .....	43

3.	Magnetické nosiče.....	45
4.	Experimentální část I - Zavedení a optimalizace imobilizačních metod k zobrazení nukleových kyselin mikroskopii atomárních sil.....	48
4.1.	Materiál a metody – zavedení a optimalizace imobilizačních metod.....	48
	AFM přístroje a software .....	48
	Materiál a chemikálie .....	49
4.2.	Přehled testovaných imobilizačních metod .....	51
	Imobilizace bivalentními kationty.....	51
	Imobilizace prostřednictvím alkoxyilanů .....	51
	Syntéza APS.....	53
	Metodika – měření kontaktního úhlu .....	54
4.3.	Výsledky - zavedení a optimalizace imobilizačních metod .....	55
	Imobilizace nukleových kyselin bivalentními kationty .....	55
	Imobilizace prostřednictvím APTES a APDMES .....	60
	Syntéza APS – schéma realizovaných reakcí.....	61
	Kontaktní úhel silanizovaných povrchů.....	62
	Syntéza APS – AFM zobrazení nukleových kyselin .....	66
	Syntéza APS – <i>Rms</i> modifikovaných povrchů.....	67
4.4.	Diskuze – zavedení a optimalizace imobilizačních metod .....	69
5.	Experimentální část II - studium toxicity vybraných fotosyntetizérů vlivem PDT ....	73
5.1.	Materiál – studium studium toxicity vybraných fotosyntetizérů vlivem PDT .....	73
	Buněčná linie.....	73
	Pomůcky a přístroje.....	73
	Chemikálie .....	73
5.2.	Metodika – studium toxicity vybraných fotosyntetizérů vlivem PDT .....	75
	Fotodynamické působení.....	75
	Kometový test .....	76
	Izolace DNA po PDT .....	77
	Analýza DNA gelovou elektroforézou.....	77
	Analýza DNA AFM zobrazením.....	78
5.3.	Výsledky – studium toxicity vybraných fotosyntetizérů vlivem PDT .....	79
	Výsledky – izolace DNA (studium cytotoxicity).....	79
	Výsledky – gelová elektroforéza (studium cytotoxicity) .....	80
	Výsledky – kometová analýza (studium cytotoxicity).....	82
	Výsledky – AFM (studium cytotoxicity) .....	88
5.4.	Diskuze – studium toxicity vybraných fotosyntetizérů vlivem PDT .....	91
	Elektroforéza .....	91



Kometová analýza .....	93
AFM zobrazení .....	94
6. Experimentální část III - Studium magnetických mikročástic metodou AFM.....	96
6.1. Materiál a metody .....	96
Magnetické nosiče .....	96
Imobilizace magnetických částic .....	97
AFM a OM zobrazení magnetických částic .....	97
6.2. Výsledky - částice komerční .....	99
6.3. Výsledky - částice syntetizované .....	103
P(HEMA-co-GMA) – B29 (ox) .....	105
PGMA – B 30 (ox) .....	107
PGMA – B 135 OX .....	111
PGMA – B 77 OX .....	115
P(GMA – MOEAA – EDMA) .....	120
HPS–B–M–NH <sub>2</sub> .....	123
HPS–B–22–NH <sub>2</sub> .....	127
HPS–B–21 .....	131
6.4. Diskuze – studium magnetických mikročástic metodou AFM.....	135
Komerční částice .....	135
Syntetizované částice.....	135
7. Závěr.....	138
8. Souhrn.....	143
9. Summary.....	145
10. Seznam použité literatury .....	146
11. Publikační činnost autora .....	164

## Seznam zkratek a pojmů

APTES	.....	<i>3-aminopropyltriethoxysilane</i> , 3-aminopropyltriethoxysilan
APTMS	.....	<i>3-aminopropyltrimethoxysilane</i> , aminopropyltrimethoxysilan
APDMES	.....	<i>3-aminopropyldimethylethoxysilane</i> , 3-aminopropyldimethylethoxysilan
APS	.....	<i>3-aminopropyltriethoxysilatrane</i> , 3-aminopropyltriethoxysilatan
AIF	.....	<i>apoptosis inducing factor</i> , flavoproteinový faktor indukující spuštění apoptózy
AFM	.....	<i>atomic force microscopy</i> , mikroskopie atomárních sil
bp	.....	<i>base pair</i> , páry bází DNA, v praxi se používají také násobky- kbp, <i>kilobasepair</i>
CAD	.....	<i>caspase activated DNase</i> , kaspázou aktivované DNázy, štěpící DNA v cca 180 bp - 200 bp fragmentech
CA	.....	<i>comet assay</i> , kometová analýza
CM-AFM	.....	<i>contact mode AFM</i> , režim kontaktních sil
CMP	.....	<i>cytoplasmatic membrane</i> , cytoplazmatická membrána
DW	.....	<i>deionised water</i> , deionizovaná voda
DNA	.....	<i>deoxyribonucleic acid</i> , deoxyribonukleová kyselina
HEPES	.....	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> , pufrový roztok, užitečný rozsah pH: 2.5- 3.5 a 6.8 - 8.2
HpD	.....	<i>derivates of hematoporphyrin</i> , deriváty hematoporfyrinu
DiPEA	.....	<i>diisopropylamine</i> , diisopropylamin
DDR	.....	<i>DNA damage response</i> , odezva (reakce) DNA na poškození
DSBs	.....	<i>double strand breaks</i> , dvojitý zlom molekuly DNA
GFP	.....	<i>green fluorescent protein</i> , zelený fluorescenční protein
Hp	.....	<i>Hematoporphyrin</i> , hematoporfyrin
HMP	.....	<i>high melting point</i> , vysoce tuhnutí (agaróza)
HOPG	.....	<i>highly oriented pyrolytic graphite</i> , vysoce orientovaný grafit
LMP	.....	<i>low melting point</i> , nízko tuhnutí (agaróza)
LED	.....	<i>light emitting diode</i> – dioda emitující světlo
MMP	.....	<i>magnetic micro particles</i> , magnetické mikro - částice
NCM-AFM	.....	<i>noncontact mode AFM</i> , režim nekontaktních sil

NK	.....	<i>nucleic acid</i> , nukleová kyselina
IC <sub>50</sub>	.....	hodnoty <i>PDT</i> proměnných (koncentrace senzitizeru v kombinaci s hustotou energie ozáření), které způsobí smrt 50% buněk, stanoveno MTT testem
PBS	.....	<i>phosphate-buffered saline</i> , fosfátový pufr, užitečný rozsah pH: 6-8,5
PDT	.....	<i>photodynamic therapy</i> , fotodynamická terapie
PS	.....	<i>photosensitizer</i> , fotosenzitizer
PUFA	.....	<i>polyunsaturated fatty acids</i> , polynenasycené mastné kyseliny
RNS	.....	<i>reactive nitrogen species</i> , reaktivní formy dusíku
ROS	.....	<i>reactive oxygen species</i> , reaktivní formy kyslíku
RNA	.....	<i>ribonucleic acid</i> , ribonukleová kyselina
RMS	.....	<i>root mean square</i> , střední kvadratická hodnota dané proměnné
SEM	.....	<i>scanning electron microscopy</i> ,
SPM	.....	<i>scanning probe microscopy</i> , mikroskopie skenující sondou
SAM	.....	<i>self assembled monolayer</i> , monovrstva vzniklá samovolnou adsorbci molekul
SP	.....	<i>set-point</i> , parametr <i>AFM</i> systému zpětné vazby
SCGE	.....	<i>single cell gell electrophoresis</i> , elektroforéza jednotlivých buněk
SMFS	.....	<i>single molecule AFM force spectroscopy</i> , <i>AFM</i> spektroskopie individuálních molekul
SMSF	.....	<i>single molecule force spectroscopy</i> , metoda silová spektroskopie <i>AFM</i>
SSBs	.....	<i>single strand breaks</i> , jednovláknový zlom molekuly DNA
MTT test	.....	test ke stanovení buněčné metabolické aktivity na základě fotometrického měření
TEM	.....	<i>transmission electron microscopy</i> , transmisní elektronový mikroskop
TEA	.....	<i>triethanolamine</i> , ( <i>HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub></i> ) <sub>3</sub> N (TEOA), triethanolamin
TRIS	.....	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> , pufrový roztok, užitečný rozsah pH: 7,5-9.0
UV - B	.....	<i>ultraviolet electromagnetic radiation in range of 250 nm - 315 nm</i> , UV-B záření, rozsah 250 nm – 315 nm
UV - A	.....	<i>ultraviolet electromagnetic radiation in range of 315 nm - 400 nm</i> , UV-A záření, rozsah 315 nm – 400 nm

## **Cíle dizertační práce**

- 1) Ověření možnosti využití mikroskopie atomárních sil pro studium DNA.
- 2) Zavedení a optimalizace metody uchycení DNA k následnému AFM zobrazení na Ústavu lékařské biofyziky Olomouc.
- 3) Studium poškození DNA vyvolaného působením vybraných fotosenzitizérů na nádorové buněčné linii MCF-7 moderními mikroskopickými metodami – mikroskopií atomárních sil a kometovou analýzou.
- 4) S ohledem na reverzibilní adsorpci nukleových kyselin prověřit a analyzovat morfologii a jemnou strukturu povrchu magnetických nosičů.

# 1. Mikroskopické metody

Výroba a použití skleněných broušených čoček ke zvětšení pozorovaných objektů je známo od 14. století. První **optické (světelné) mikroskopy** používané systematicky ke zkoumání objektů však byly konstruovány až o tři století později (17. století, Zacharias Jansen, Marcelo Malpighi, Antonius van Leeuwenhoek, Robert Hooke, Christian Huygens, Galileo Galilei). Současného tvaru a koncepce nabyl optický mikroskop až v první polovině devatenáctého století (Giovanni B. Amici). S rozvojem teoretických fyzikálních poznatků a výrobního procesu (Carl Zeiss, Ernst Abbe, John William Rayleigh, Otto Schott) mohly být již na konci devatenáctého století vyráběny první komerční přístroje s korigovanou aberační vadou (Bradbury, 1968).

Světelné mikroskopy jsou založeny na kvalitní optické soustavě a použití viditelného světla. Ve svém rozlišení jsou prakticky i teoreticky limitovány známým Abbého vztahem definujícím rozlišovací schopnost  $d$ ;  $d = \frac{\lambda}{2.n.\sin\alpha}$ , kde  $d$  je vzdálenost dvou nejbližších rozlišitelných objektů,  $\lambda$  vlnová délka použitého světla a  $n.\sin\alpha$  je numerická apertura. Tento Abbého vztah určuje klasickou optickou mikroskopii, limitovanou maximálně 1000 násobným zvětšením a rozlišením odpovídajícím cca polovině vlnové délky použitého světla (Stephens & Allan, 2003). Pro vizualizaci detailů buněk je však toto rozlišení nedostatečné. Proto bylo neustále vyvíjeno nemalé úsilí v oblasti zobrazovacích metod, které by překonalo výše uvedené omezení.

Na počátku 20.století poukázala kvantová fyzika na možnost zvýšení rozlišovací schopnosti použitím jiného než VIS elektromagnetického záření. Ve 30. letech byl poté zkonstruován první **elektronový mikroskop** (Max Knoll, Ernst Ruska), založený na prozařování vzorku paprskem elektronů, TEM (TEM, transmission electron microscope), o deset let později byl zkonstruován první SEM (SEM, scanning electron microscope). Dosažené zvětšení je u elektronových mikroskopů až 30 000násobné a v kombinaci s optickým mikroskopem až 100 000násobné (Newbury & Williams, 2000; Rüdénberg, 2010; Sjorstrand, F. S., 1988).

Na konci 20.století byl umožněn další pokrok v optických mikroskopických metodách zavedením **konfokální mikroskopie**, která umožňuje prostřednictvím dvou konfokálně umístěných clonek zaostření do jedné roviny vzorku. Tím je detekován optický obraz pouze z vrstvy, která je mikroskopem zaostřena. I když byl princip metody znám již z roku 1957, komerčně dostupné přístroje byly v praxi dostupné až o dvacet let později (Paddock, 2000). V současné době jsou používány konfokální mikroskopy v kombinaci s rastrovým snímáním (LSCM, laser scanning confocal microscope; nebo STED, Stimulated Emison

Depletion). Konfokálním skenováním v rastru je značně rozšířena aplikační sféra optické mikroskopie, kdy hodnoty rozlišení v ose XY jsou pod 50 nm (Hell & Wichmann, 1994; Klar et al., 2001; Westphal et al., 2003).

Vedle elektronové mikroskopie se současně vyvíjela také optická technika zvaná **fluorescenční mikroskopie**. Ta je založena na skutečnosti, že vybrané chemické látky (fluorochromy) po absorpci dopadajícího světla uvolní (emitují) absorbovanou světelnou energii v podobě světelných kvant o delší vlnové délce, než byla vlnová délka světla dopadajícího (excitujícího). Tento jev trvá řádově  $10^{-9} - 10^{-6}$ s a nazývá se fluorescence. Fluorescenční mikroskopy vedle optiky známé u klasických světelných mikroskopů obsahují v optickém systému navíc dichroické zrcadlo a dva sety filtrů: excitační filtr umožňuje vybrat vlnovou délku, na kterou je daný fluorochrom citlivý; bariérový filtr tuto excitační vlnovou délku absorbuje a propouští pouze světlo emitované fluoroforem. Vedle pozorování látek či objektů schopných vlastní tzv. vnitřní fluorescence, je možno také dosáhnout vizualizace „neviditelných“ objektů prostřednictvím navázaných fluorescenčních sond a značek, tzv. vnější fluorescence. Díky selektivnímu zbarvení jednotlivých organel v buňce prostřednictvím fluorescenčních sond a značek se fluorescenční mikroskopie rychle rozšířila a dodnes je velmi ceněnou a populární technikou při studiu a diagnostice mnoha nemocí a buněčných procesů (Enderlein, 2014; Wayne, 2014). Použití GFP (zelený fluorescenční protein) a jeho barevných nuancí vedlo v posledním desetiletí k další vlně oživení fluorescenční mikroskopie (Cormack et al., 1996; Tsien, 1998).

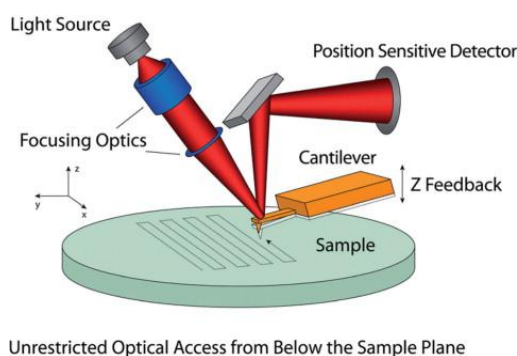
Princip rastrového snímání lokálních informací studovaného vzorku je známý od padesátých let. Snímání lokálních informací taktéž obchází známý Abbého limit a stojí u zrodu nové generace mikroskopických přístrojů – tzv. **mikroskopy „druhého druhu“**. Rastrovací technika aplikovaná na nejrůznější interakční a zobrazovací systémy je základem mikroskopie skenující (rastrovací) sondou (SEM, *scanning probe microscopy*) a spočívá v postupném tvoření (rekonstrukci) výsledného obrazu, z bod po bodu nasnímaných lokálních informací v rastru mřížky. Vlastní pohyb v rastru je realizován dvěma způsoby - pohybem zkoumaného objektu nebo pohybem vlastní detekční soustavy (sondou). Sonda snímající lokální povrch vzorku pak zpravidla vedle topografie snímá také fyzikálně - chemické vlastnosti (např. elektrickou vodivost, magnetické vlastnosti, teplotu, ale třeba i přítomnost vybraných funkčních skupin či molekul na povrchu). Skupina SEM mikroskopů tedy principiálně nepotřebuje ke své funkci žádných optických či elektromagnetických zobrazovacích systémů, nosným zdrojem informací je zde vzájemná interakce mezi lokální oblastí studovaného vzorku a rastrující sondou (Geisse, 2009; Meyer et al., 2013; Tomczak & Goh, 2010).

## 1.1. Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Mikroskopie atomárních sil (AFM, atomic force microscopy) je členem široké rodiny mikroskopů skenující sondou (SPM, scanning probe microscopy) od roku 1986 (Binnig et al., 1986). O pouhé dva roky později byl uveden na trh první komerční přístroj a od té doby tato progresivní zobrazovací a zároveň měřicí analytická metoda neustále zaznamenává experimentální a technický vývoj a rozšiřování svého pole působnosti ve stále širším okruhu různorodých vědeckých aplikací (Tomczak & Goh, 2010).

Princip AFM metody spočívá v rastrovém snímání zkoumaného povrchu tenkým hrotem, v ideálním případě zakončeným pouze jedním atomem. Zdrojem informací o topografii a vlastnostech povrchu jsou pak vzájemné lokální interakce mezi koncovými atomy hrotu a atomy skenovaného povrchu v těsné blízkosti hrotu, jež vyplývají z dalekodosahových či krátkodosahových silových interakcí. Právě změna silového působení v závislosti na složení molekul povrchu a jeho topografii vyvolá přiblížení či oddálení hrotu vůči povrchu, jež se projeví v ohnutí nosníku, na jehož volném konci se hrot nachází. Rekonstrukcí dat snímaných v rastru je pak možno vyhodnotit topografii a další snímané vlastnosti či parametry skenovaného povrchu. Jemný posun v *Z-ose* i v rovině *XY* (v rastru) je umožněn citlivým piezo elementem, tvořícím vlastní jádro AFM zobrazovacího systému.

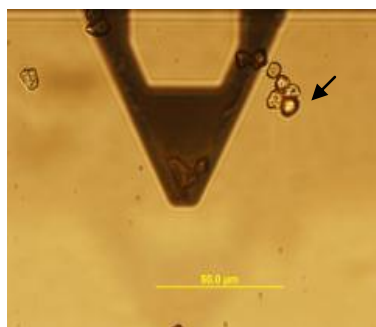
Skenování lze realizovat dvěma způsoby – pod pevně uchyceným hrotem ve stálé pozici, se v rastru a *Z-ose* pohybuje vzorek (vzorek je umístěn na piezoelement), anebo se v rastru a *Z-ose* nad pevně uchyceným vzorkem ve stálé pozici pohybuje nosník s hrotem (nosník s hrotem je uchycen na piezoelement). Protože metoda AFM poskytuje lokální informaci v každém skenovaném bodě rastru v reálném čase, k vlastnímu vyhodnocení zkoumaných dat je potřeba udržet stabilní systém a přesný pohyb sondy/vzorku v rastru, což zprostředkovává elektronický systém udržující zpětnou vazbu.



**Obr 1.:** Schéma AFM mikroskopu – nosník s hrotem rastrující povrch vzorku (oranžová), optický svazek detekující prostřednictvím fotodiody vychýlení nosníku (červená), převzato z (Geisse, 2009).

Pro vyhodnocení vlastních interakcí mezi hrotem a vzorkem je citlivým optickým systémem sledována aktuální poloha hrotu, umístěného na volném konci nosníku. U většiny AFM systémů je realizována tato detekce prostřednictvím laserového svazku, fokusovaného na volný konec nosníku a detekci jeho odražené stopy ve čtyřsegmentové fotodiodě, viz **obr. 1**. Činnost mikroskopu je ovládána přes speciální software, který umožňuje nastavení parametrů skenování a zpracovává rekonstruovaný obraz v reálném čase.

Základ AFM systému je obvykle doplněn o kvalitní optický mikroskop pro účelnou a snazší manipulaci s vzorky a vyhledání vhodného místa na povrchu vzorku (viz **obr. 2**), o komory či nástavce umožňující měření ve vakuu, na vzduchu či o biologické nástavby umožňující plynulé měření ve statických i dynamicky se měnících kapalinách (S. Kasas, 1997).



**Obr 2.:** *Optický snímek AFM nosníku ve tvaru písmene „V“. Na spodní straně nosníku je umístěn skenující hrot. Šipka vyznačuje studovaný vzorek, v tomto případě magnetický nosič, na který bude hrot přesunut. Vlastní snímek pořízen optickým mikroskopem OLYMPUS IX 81, zvětšení 600x.*

Ač se mikroskopie atomárních sil nazývá stále mikroskopickou metodou a původní verze AFM přístroje sloužila pouze k zobrazování 3D topografie povrchů, inovace a modifikace této metody dnes umožňují měření širokého spektra doprovodných informací, vztahujících se k materiálovým vlastnostem zkoumaného povrchu a zahrnují také oblast litografie. Nejčastěji studovanými materiálovými vlastnostmi jsou drsnost, elasticita, tuhost, tření, elektrické či magnetické vlastnosti, chemický potenciál, a to v závislosti na použitém měřicím systému a systému sběru dat. Při kombinaci měření na vzduchu, v kapalinách či ve vakuu tak AFM mikroskopie kombinuje funkční a morfologickou analýzu zobrazovaných vzorků včetně dynamických a spektroskopických měření (Dufrêne, 2002).



## 1.2. Klíčové proměnné při AFM měření

**Hrot**, upevněný na volném konci ohebného **nosníku**, zprostředkovává měřené interakce. Hrot má zpravidla ostrý, pyramidální či kuželový tvar, bývá vyroben z křemene (Si) či z nitridu křemíku ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), zajišťujícím mechanickou stálost a chemickou odolnost. Hrot může být dále modifikován uhlíkem (C) v podobě nanotrubiček nebo diamantového pokrytí, zlatem atp. V biologických aplikacích bývá často používán hrot s navázanými biomolekulami ve funkci biosenzoru. Vedle tvaru hrotu (štíhlost) je druhým stěžejním parametrem jeho koncový poloměr. Právě koncový poloměr hrotu ve spojení se štíhlostí hrotu výrazně ovlivňuje výsledné rozlišení AFM přístroje, do něhož se promítá také např. tuhost a kvalita uchycení vzorku, šum či vlastní zobrazené rozměry studovaných objektů. Pro zobrazování biomolekul jsou dobrou volbou hroty s poloměrem zakřivení nižším než 10 nm, optimální je poloměr zakřivení pod 2 nm v případě zobrazování objektů o velikosti jednotek nanometrů.

Volba nosníku závisí na typu aplikace a používaných měřicích režimech. Pro dotykový režim jsou vhodné pružné nosníky ve tvaru V, pro nekontaktní režim tužší nosníky tvaru písmene X. Oba tvary nosníků jsou odolné vůči laterálním silám, působícím během skenování. Pro tzv. tapping jsou vhodné obdélníkové jednoramenné nosníky. Důležitou vlastností nosníku jsou jeho torzní charakteristiky, nízká setrvačnost a vhodná konstanta tuhosti (rezonanční frekvence), v závislosti na typu zvolené aplikace. Velmi měkké nosníky dosahují hodnot pod 0,01 N/m. Tyto nosníky se obvykle používají bez hrotů jako senzory. Měkké nosníky s tuhostí od cca 0,06 N/m zpravidla využívají pro spektroskopická měření. Jsou-li použity ke zjištění topografie povrchu, obvykle je obraz doprovázen artefakty způsobenými nízkou rezonanční frekvencí. Nosníky s konstantou tuhosti o velikosti v řádu jednotek N/m jsou vhodné ke studiu živých buněk v kapalném prostředí. Tužší nosníky s konstantou tuhosti řádově několik desítek N/m se obvykle používají při měření na vzduchu. Někdy však mohou být příliš tuhé a prorazit proteinovou vrstvu nebo buněčnou stěnu (Kwon et al., 2009). Maximálně tuhé nosníky (tuhost okolo 120 N/m, např. z diamantu) se využívají ve funkci nano nožů při manipulaci s buňkami. Obecně platí, že čím je nosník tužší, tím více energie se uvolní při přiblížování hrotu s nosníkem ke vzorku. Rozměry nosníku jsou zpravidla 100 $\mu\text{m}$  až 200 $\mu\text{m}$  (délka) x 10 $\mu\text{m}$  až 40 $\mu\text{m}$  (šířka) x 10 $\mu\text{m}$  (tloušťka).

**Skenující systém** se zpětnou vazbou, slouží ke kontrole vzájemné polohy hrotu a vzorku. Je konstruován ve tvaru trubičky či trojnožky ze tří piezokeramických válečků ( $\text{Pb}(\text{Zr},\text{Ti})\text{O}_3$ ) umístěných ortogonálně. Základní vlastností piezokeramiky je změna rozměrů materiálu po přiložení elektrického napětí (0,1 nm při 1 mV až po desetiný

milimetru při napětí 1000 V). Rozsah pohybu v Z-ové ose bývá okolo 10  $\mu\text{m}$  s rozlišením 0,1 nm. V osách X a Y skener umožňuje pohyb (rastrování) v rozsazích do 150  $\mu\text{m}$ . K hrubému posuvu hrotu nad povrchem a přibližování vzorku k povrchu slouží motorčky s mikrometrickým posuvem (JPK Instruments, 2012; Morris, V.J., 1999; Sharpe, N., 2008).

### **Systém zpětné vazby - Parametry skenování**

Set Point (SP) je parametr zpětné vazby a slouží k nastavení velikosti síly, působící mezi vzorkem a hrotem. V kontaktním režimu odpovídá vychýlení nosníku, které je udržováno zpětnou vazbou konstantní. V tapping měřícím režimu odpovídá set point konkrétní velikosti amplitudy kmitů nosníku, která slouží opět ke kontrole síly, působící mezi hrotem a vzorkem v bodě doteku. Obecně tento pojem může mít různé fyzikální vysvětlení v závislosti na konstrukci a typu AFM a použitém měřícím režimu. Optimální hodnota SP je ovlivněna také parametry nosníku a typem probíhajících meziatomárních interakcí, proto znalost vhodného nastavení tohoto parametru silně závisí na zkušenostech operátora (JPK Instruments, 2012).

Podklad k nanášení studovaného vzorku – **substrát** - a jeho modifikace může být v jistých aplikacích klíčová. Studovaný vzorek musí být k substrátu dostatečně uchycen, aby nedocházelo k jeho pohybu během skenování. Důležitými parametry substrátu je dostatečná povrchová hladkost, typ a procentuální zastoupení funkčních skupin na povrchu a požadovaná hydrofóbnost či hydrofilnost. V biologických aplikacích je nejoblíbenějším substrátem sklo, pyrolytický grafit, křemíkové destičky a slída, která je se svým atomárně hladkým povrchem a přijatelnou cenou nejrozšířenějším substrátem při studiu jednotlivých molekul, ale i membrán a nejrůznějších typů nano částic (Jena, GB. P., 2002).

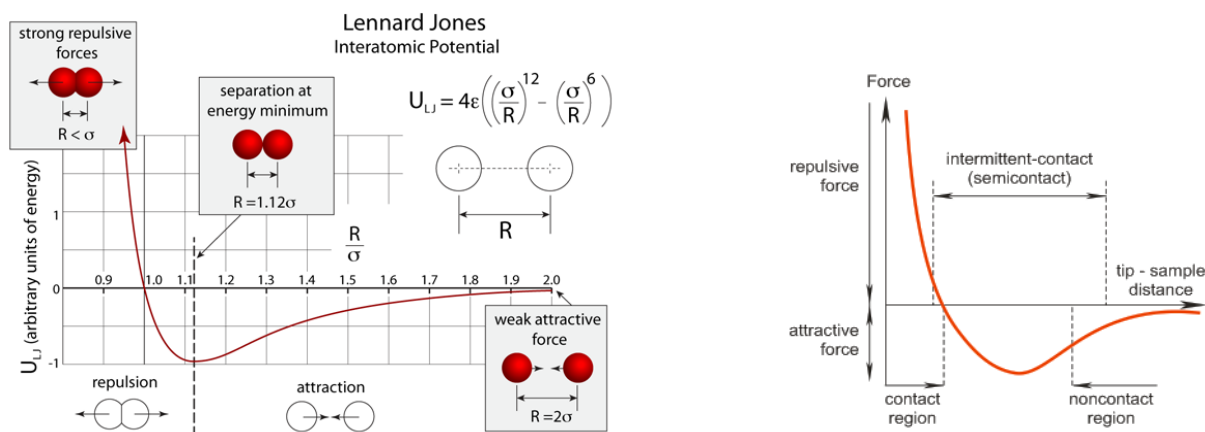
Detekce ohybu nosníku zprostředkovává fotodiody a laserový svazek. V praxi se nejčastěji používají dvousegmentové a čtyřsegmentové fotodiody, na které je fokusován laserový svazek, odrážející se od volného konce nosníku. Před měřením je nutné seřízení fotodiody tak, aby do všech částí diody dopadaly světelné toky o stejné energii. Úhlová velikost ohybu ramene je určena ze změny úhlu paprsku dopadajícího na povrch volného ramene.

Vlastní **princip detekce** ohybu nosníku je založen na aplikaci Hookova zákona – meziatomární síly, působící v proměřovaném bodě mezi skenovaným povrchem a skenujícím hrotem jsou přímo úměrné výchylce hrotu  $z$  a tuhosti nosníku  $k$ ;  $F = -k \cdot z$ , kde  $F$  je síla působící na nosník,  $k$  je konstanta tuhosti nosníku a  $z$  je vertikální výchylka nosníku z rovnovážné polohy při přibližování či oddalování nosníku k povrchu vzorku.

**Meziatomární síly**, uplatňující se na vychýlení nosníku z rovnovážné polohy, obvykle rozdělujeme na krátkodosahové a dalekodosahové. Mezi dalekodosahové patří zejména

van der Waalovy síly uplatňující se v rozsahu vzdáleností 0,1-100 nm, zastoupené zejména coulombickou, induční a disperzní silou. Krátkodosahové repulzivní síly jsou reprezentovány Pauliho vylučovacím principem při překryvu vlnových funkcí elektronů, kapilárními silami uplatňujícími se na rozhraní fází díky kondenzaci vzdušné vlhkosti na povrchu při RH nad 30% (hrot působí jako kondenzační jádro), adhezivními síly, případně také magnetickými silami.

Výslednici působících meziatomárních sil modeluje Lennard – Jonesův potenciál (resp. po převodu F-d křivka, viz **obr. 3**), a to v závislosti na vzdálenosti hrotu nad zobrazovaným povrchem, kdy tato křivka také určuje rozsah a možnosti měřících režimů AFM. Jednotlivé AFM snímající režimy se liší ve vzdálenosti mezi zobrazovaným povrchem vzorku a koncem zobrazujícího hrotu a ve statickém stavu či dynamické oscilaci snímajícího nosníku v proměřovaném rastrovém bodě.



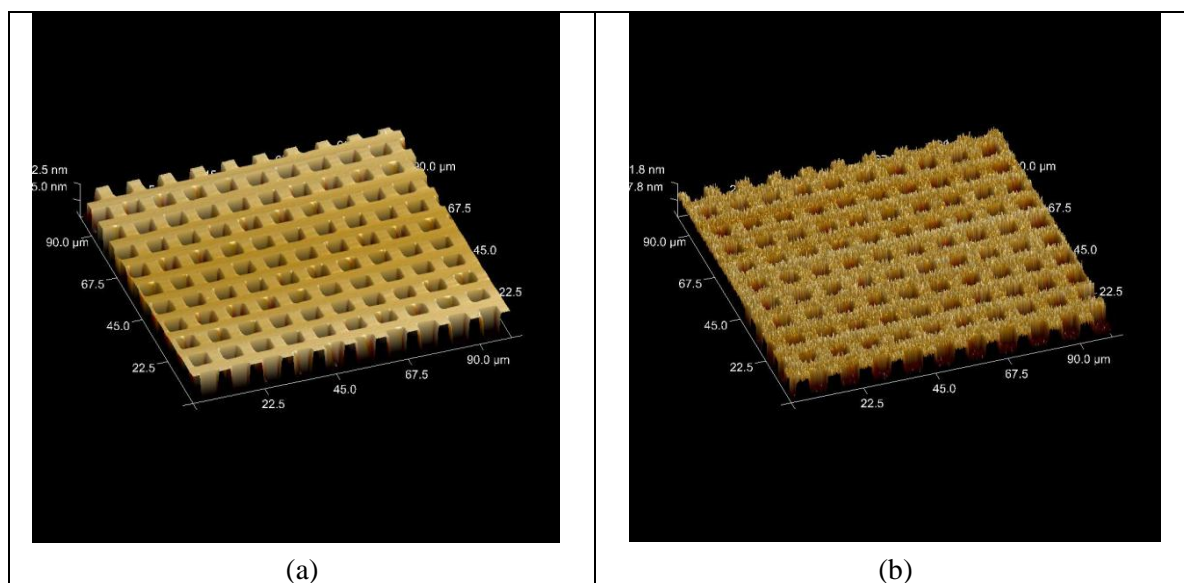
**Obr 3.:** Průběh Lennard-Jonesova potenciálu (a), resp. F-d křivky (b). Vykreslená závislost zobrazuje výslednici sil  $F$  v závislosti na vzdálenosti  $d$  mezi hrotem a zobrazovaným bodem, zdroj: [www.atomisinmotion.com](http://www.atomisinmotion.com).

### 1.3. Režimy snímání a datové kanály AFM mikroskopu

Při přibližování nosníku ke zkoumanému povrchu dochází v závislosti na vzdálenosti a typu působících sil k ohnutí nosníku, jež je zdrojem vlastního zpracovávaného měřonosného signálu (ohnutí nosníku, změna zpětnovazebního systému, posun rezonanční frekvence, změna fáze, změna amplitudy kmitání nosníku atp.).

Při AFM měření jsou nejčastěji rozlišovány tři původní režimy AFM zobrazování: nekontaktní (*non contact mode AFM*, NCM – AFM), kontaktní (*contact mode AFM*, CM - AFM) a přerušovaný (nazývaný v literatuře *tapping*, *intermittent* či *semicontact*, TP-AFM). V daných režimech jsou simultánně zpracovávána různá data vyplývající z detekce ohybu a změn při udržení zpětné vazby, která dávají vzniknout datovým kanálům, jako je např. obraz fázového posuvu, které reprezentují mapy lokálních oblastí, avšak nevystihují reálnou topografii vzorku (Kubínek, R. & Mašláň M., 2003).

Topografie zobrazovaného povrchu pak vykazuje mírné odlišnosti (artefakty) dané typem měřonosného signálu a zpracováním dat, z nichž je výsledný obraz rekonstruován (viz **obr. 4**).

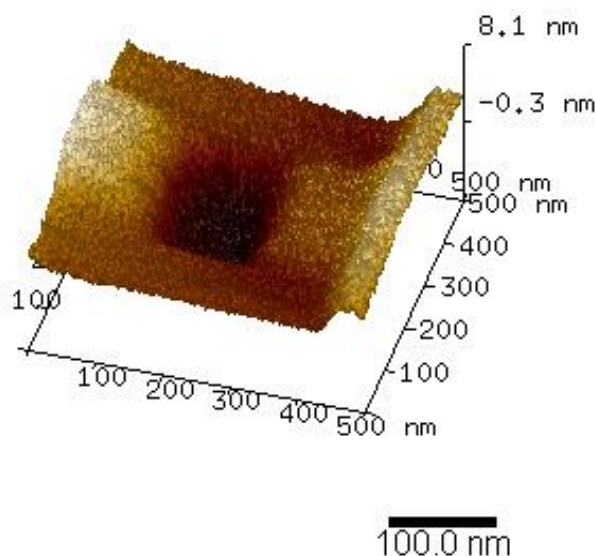


**Obr 4.:** Srovnání AFM skenu (*Biocatalyst*, BRUKER) ve výškovém datovém kanálu (a) v kontaktním režimu, (b) v *tapping* režimu. 3D rekonstrukce obrazu, scan  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  Vlastní snímky.

#### Kontaktní režim (CM-AFM)

V kontaktním režimu, působícím v odpudivé oblasti krátkodosahových sil o velikosti řádově  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  N, je hrot udržován ve vzdálenosti desetin *nm* od povrchu vzorku. Tento režim může pracovat ve dvou variantách - a to udržení konstantní výšky hrotu nad

povrchem (snímána je míra vertikálního ohnutí nosníku) nebo v režimu konstantní působící síly, resp. odpovídajícího konstantního ohnutí nosníku.



**Obr 5.:** CM-AFM sken slídivého povrchu (Biocatalyst, BRUKER) 500x500nm<sup>2</sup> ve výškovém datovém kanálu, 3D rekonstrukce obrazu. Zobrazená prohlubeň vznikla předchozím litografickým působením hrotu během skenování. Vlastní snímek.

V druhém případě je měronosnou veličinou vzdálenost mezi hrotem a vzorkem detekována optickým systémem. V kontaktním režimu je skenující hrot náchylný k poškození vzorku propíchnutím či k vytvoření rýh smykovým třením, proto tento režim není vhodný k zobrazení biologických vzorků (viz **obr. 5**).

Při zobrazení biologických vzorků CM-AFM je nutné použít velmi měkké hroty o minimální tuhosti, řádově 0,1 N.m<sup>-1</sup> a menší; zároveň s velmi nízkou rezonanční frekvencí. Kontaktní režim je nejjednodušším režimem k pochopení AFM principu.

### **Nekontaktní režim (NCM-AFM)**

Nekontaktní režim (někdy nazýván dynamický režim) působí v oblasti přitažlivých dalekodosahových van-der Waalsových interakcí a umožňuje pohyb hrotu do vzdáleností 1-10nm nad povrchem. Celková působící síla mezi vzorkem a povrchem je velmi malá, řádově 10<sup>-12</sup>N, a proto je vlastní měření obvykle velmi obtížnější než v kontaktním režimu. Protože je hrot ke vzorku u bezkontaktní metody přitahován, používají se tuhé nosníky s rezonanční frekvencí od 100- 400 Hz a nosník je během skenování udržován v oscilačním pohybu. Měronosným signálem jsou změny v rezonanční frekvenci nosníku nebo změny v amplitudě kmitů nosníku při přibližování či vzdalování hrotu od povrchu (Noll et al., 2001). Tento režim poskytuje vzhledem k větší vzdálenosti od povrchu obvykle horší rozlišení, než kontaktní režim.

## **Přerušovaný režim, TAPPING, Intermittent,**

Tapping mode (TP-AFM, intermittent AFM) využívá oscilace nosníku na frekvenci blízké rezonanční, proto se hrot během svého oscilačního pohybu dotkne povrchu pouze v tzv. bodech obratu. Tímto postupem je minimalizován fyzický kontakt a tímto také adhezivní a třecí síly působící mezi hrotem a zobrazovaným povrchem, jež jsou často zodpovědné za poškození vzorku v CM-AFM. Interakce mezi hrotem a lokálním povrchem v TP-AFM vedou k redukci oscilační amplitudy a fázovému posunu oscilací. Analýzou fázového posunu jako funkce prostorových souřadnic můžeme vedle topografie také vyhodnotit materiálové vlastnosti vzorku, zejména elasticitu. Ve skutečnosti je fázový posun vztažen k energii uvolněné během interakce hrot-povrch vzorku, proměnnými parametry jsou tuhost nosníku, amplituda oscilací, faktor kvality rezonančního píku, volná amplituda nosníku a úhel fázového posunu (Thormann et al., 2010).

Je vhodné zmínit, že optimalizace parametrů skenování k topografickému snímání nemusí korelovat s nastavením parametrů pro snímání materiálových vlastností vzorku. Obecně lze říci, že minimální stupeň deformace vzorku vede k lepšímu fázovému kontrastu, avšak omezuje zpětnovazební kontrolu a zhoršuje topografické rozlišení, určitým vodítkem může nastavení hodnoty SP (amplitudového set pointu)  $A/A_0=0,5$  (u systému BioscopeCatalyst je tato číselná hodnota poměr mezi amplitudou oscilací hrotu  $A$  a volnou oscilací hrotu v blízkosti povrchu  $A_0$ ,  $SP=A/A_0$ ) Pokud je hodnota SP příliš velká, hrot ztrácí kontakt se skenovaným povrchem, naopak v případě velmi malé hodnoty režim TP přechází v NCM-AFM. Hodnoty v rozmezí 0,5-0,7 bývají obvykle dostačující a pro skenování topografie vzorku optimální.

Amplituda oscilací v TP AFM je druhým kritickým parametrem ovlivňujícím kvalitu obrazu a vznik artefaktů. Může být uplatněna v rozsahu cca 20 nm – 800 nm, v závislosti na výškových topografických rysech vzorku. V kapalinách je praktické použít amplitudu kmitů pouze v rozsahu 10-60 nm. Režim TP-AFM byl v devadesátých letech stěžejním režimem pro zobrazování biologických vzorků metodou AFM (Argaman et al., 1997).

## **ScanAsyst, FM - AFM**

S progrese AFM přístrojů se rozšířily do běžné uživatelské praxe také nové režimy, optimalizující na základě algoritmů parametry zpětné vazby v každém proměřovaném bodě obrazu. Optimalizace parametrů je umožněna díky opakovanému proměření F-d křivky a algoritmické analýze získaných dat pro každý jednotlivý pixel obrazu. U systému Bruker je tento režim nazván Peak-Force Tapping, či jeho podsystém - ScanAsyst. Předností těchto nových samo-optimalizačních režimů jsou vysoce rozlišené snímky na straně jedné, o to

však obtížnější interpretace získaných dat a delší doba skenování jednotlivých snímků na straně druhé. Tyto režimy nejsou vhodné pro dynamické aplikace.

Také fázově či frekvenčně modulované AFM (FM-AFM) jsou variantou předchozího tapping režimu, kdy právě posun v rezonanční frekvenci (resp. fázi) způsobený vzájemnou blízkostí skenujícího hrotu a zobrazované oblasti vzorku je udržován zpětnou vazbou na konstantní hodnotě. Výhodou tohoto režimu jsou malé velikosti mezimolekulárních interakcí, řádově v desítkách pN. Druhým přístupem je skenování změn v rezonanční frekvenci, tzv. frekvenčních map. Pouze skenováním v tomto režimu bylo dosud možno dosáhnout sub-atomárního rozlišení při zobrazení biomolekuly DNA, a to rozlišení velkých a malých žlábků v rozpětí 3nm až 5nm (Cerreta et al., 2013; Leung et al., 2012).

### **Datové kanály**

Během rastrového snímání mohou být v jednotlivých pixelech sbírána z AFM systému různá data zároveň. V kontaktním režimu jde o topografická data (height, topography), ohyb nosníku (deflection) a laterální třecí síly (cantilever torsion, lateral deflection). V dynamických režimech, při kterých je nosník udržován v oscilačním pohybu, jde o topografii (height, topography), amplitudu (amplitude) a fázový posun (phase lag). Dalším datovým zdrojem je pak chybový signál zpětné vazby (error signal). Všechny tyto kanály poskytují dílčí informace o topografii, avšak pouze výšková data (height channel) odpovídají po kalibraci systému pravdivé 3D struktuře vzorku, s ohledem na disipaci energie a konvoluci povrchu vzorku s hrotem (Kurk et al., 2010).

## 1.4. Artefakty AFM zobrazování a analýz

Mikroskopie skenující sondou je stále více rozšířená a značně populární zobrazovací a měřicí technika. Pomocí parametrů zpětné vazby, měřicího režimu a rychlostí skenování lze značně ovlivnit sílu interakce mezi hrotem a zobrazovaným povrchem. Ve skutečnosti však AFM snímky obsahují často kromě zobrazovaných objektů také rysy či útvary, které zobrazovaný povrch ve skutečnosti neobsahuje. Tyto artefakty v AFM zobrazení vznikají z rozličných důvodů a je velmi podstatné umět rozlišit princip jejich vzniku a v zobrazených strukturách je rozlišit.

Naměřená data se od reálných liší zpravidla v důsledku konečného rozměru měřicího hrotu, ztupení či zdeformování hrotu v průběhu skenování, vlivem hystereze piezo skeneru, termálního gradientu, v důsledku okolních vibrací, vlivem elektroniky, chybnému nastavení zpětné vazby aj.

Určitým artefaktům se dá vyhnout skenováním malých oblastí (např. tepelný drift), skenování pod různým úhlem, vyšší rychlostí skenování či vhodným nastavením zpětné vazby a měřicího režimu, jiným se předejít nedá a jsou součástí snímaného obrazu (Gołek et al., 2014).

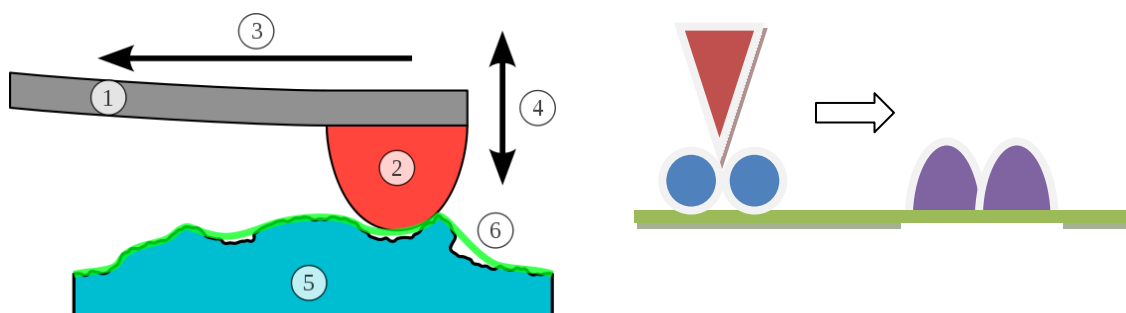
### Artefakty vztahované k hrotu a nosníku

Zásadní skupinou artefaktů jsou zobrazené útvary či objekty dané **konvolucí tvaru a velikosti skenujícího hrotu** a studovaného objektu (viz **obr. 6**). Hrot, obvykle pyramidálního či kónického tvaru, s koncovým poloměrem zakřivení  $r$  výrazně ovlivňuje velikost a jemnost detailů u zobrazovaných objektů (Winzer et al., 2012). Četné artefakty vznikají při zobrazení jemných detailů rozměrově menších, než je poloměr zakřivení hrotu. Např. při zobrazování DNA (makromolekula, v relaxovaném stavu s vláknem o poloměru cca 2 nm) dostaneme při skenování ultratenkým hrotem zdánlivý poloměr molekuly v rozmezí 2,7 nm – 5 nm, zatímco při skenování standardním hrotem o koncovém poloměru 10 nm dostaneme pro zobrazovanou molekulu průměr vlákna v rozsahu 10 nm až 20 nm (Klinov et al., 2007; Maeda et al., 1999; Mou et al., 1995; Jie Yang et al., 1994).

K typickému artefaktu, vznikajícímu např. při studiu objektů o velikosti desetin až jednotek  $\mu\text{m}$ , dochází při skluzu hrotu z hrany povrchu objektu. Např. je-li hrot na hraně částice, projeví se skluz hrotu a vliv nosníku oválným prodloužením tvaru částice, jež ve skutečnosti neexistuje. Tento jev je nejvíce markantní v 2D rekonstrukci obrazu, viz **obr 41c, 42b, 43b, 50c, 52b, 55d, 58d, 62g, 63b**.



K odstranění vlivu hrotu na výslednou topografii je možno využít dodatečných softwarových dekonvolučních procedur a úprav (Kienberger et al., 2006; Nečas & Klapetek, 2012).



**Obr 6.:** Schéma vzniku topografického obrazu při AFM skenování, (1) nosník, (2) hrot, (3) směr skenování, (4) vertikální posun hrotu, (5) reálný povrch vzorku, (6) zobrazený povrch vzorku.

Hrot sám v průběhu skenování ovlivňuje výsledná data prostřednictvím interakcí s povrchem. V průběhu opakovaného skenování měkkých struktur může dojít k uvolnění biologického materiálu a jeho uchycení na povrchu měřícího hrotu. Naopak při skenování tvrdých povrchů dochází v průběhu měření k opotřebení hrotu a tím ke zvětšení koncového poloměru hrotu či k jeho rozštěpení.

Artefakty zvané „zdvojení okrajů“ či „opakování trojúhelníků“ jsou při AFM měření těmi z nejčastějších. Vznikají odštípnutím konce ostrého hrotu v průběhu skenování, čímž vznikne zdvojený hrot, dávající při skenování dále rozmazané a opakující se obrazce okolo zobrazovaných výškových objektů. Jakékoliv poškození či ztupení hrotu v koncové oblasti vede k zhoršení rozlišení topografického obrazu. AFM hrot a nosník mohou vést k artefaktům také špatným nastavením laserového svazku či v případě, že zobrazovaný povrch je velmi jasný a během skenování dochází k interferenci.

Další skupinou artefaktů jsou jevy způsobené nevhodným nastavením parametrů jako je zesílení (*gain*), setpoint (SP), rychlost skenování a vlastní výběr nosníku (parametry tuhost a rezonanční frekvence, koncový poloměr hrotu).

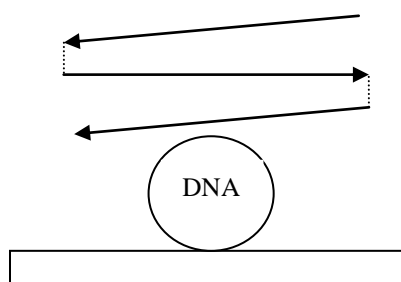
Při znečištění hrotu může zvýšit kvalitu skenování odstranění kontaminace UV světlem nebo v případě organického znečištění ponořením do tzv. piranha solution, směs kyseliny sírové a peroxidu vodíku v různých poměrech (např. 30%  $H_2O_2$  a 96%  $H_2SO_4$  v poměru 1:3 (Aissaoui N., 2011)).

Moiré artefakty vznikají často tam, kde dochází k interferenci mezi zobrazovaným vzorkem a skenováním v rastru. Výsledný obraz je často doprovázen vlnitou strukturou,

tzv. moiré. V tomto případě je nutné porovnat skeny získané z jednoho místa pod různými úhly a vyhodnotit, zda jde o reálnou topografii či artefakt.

### Artefakty vztahované k PIEZO systému

Jádro AFM systému, piezoskenner, který pohybuje hrotem (nebo vzorkem) v rastru (viz **obr. 7**), je sám o sobě také zdrojem artefaktů. Výsledný obraz je ovlivněn termálním driftem, okolními vibracemi a hysterezí piezomateriálu. Takto vzniklé artefakty způsobují zkreslení až narušení obrazu, a to zejména při opakovaném skenu jednoho místa.



**Obr 7.:** Schematické znázornění termálního driftu, který ovlivňuje orientaci roviny zobrazení v prostoru a způsobuje rozmazání okrajů na nm úrovni rozlišení.

### Artefakty způsobené vzorkem

V případě pružného a měkkého vzorku mohou vzniknout přídavné artefakty dané opakovanou interakcí ve vyšetřovaném lokálním bodě rastru. Nedostatečně uchycený vzorek může ovlivnit výsledný obraz svým pohybem či uvolněním. Také povrchový náboj zkoumaného vzorku může výrazně ovlivnit kvalitu výsledného AFM obrazu. Další příčinou artefaktů může být fakt, že po několika skenech hrot obvykle adsorbuje část skenovaného biologického povrchu, čímž se změní rezonanční frekvence nosníku a koncová plocha hrotu, interagující se vzorkem (Winzer et al., 2012). Výsledek vede k rozmazání obrysových kontur zobrazovaného objektu. Časté bývá zachycení části vzorku a jeho tažení hrotem během skenování, v případě zobrazování buněk jejich proražení. Rozsah sil, vedoucích u buněk k protržení buněčné stěny závisí na typu a stáří buňky, obecně jde o síly v rozsahu 2 nN až 20 nN (Kwon et al., 2009).

Svou roli při vzniku artefaktů může hrát také relativní vlhkost, kdy právě povrchová vrstva vody adsorbovaná na skenovaném povrchu může ovlivňovat vzájemné interakce mezi hrotem a vzorkem (G. Yang et al., 1996).

## 1.5. Modifikace substrátu pro AFM měření – aplikace makromolekul

Pro vlastní AFM měření a zobrazování je nezbytná dostatečně pevná vazba mezi zobrazovaným vzorkem (molekulou, organelou, částicí, buňkou atp.) a jeho podkladem – substrátem. Slabá vazba a následný pohyb studovaného vzorku během rastrového skenování znemožňuje AFM měření či značně zhoršuje rozlišení. Proto je přizpůsobení a ovlivnění vhodných vlastností povrchových vrstev substrátu často jedním ze stěžejních cílů AFM operátora.

Velký zájem v oblasti studia makromolekul, jako DNA či RNA, vedl také k rozvoji rozličných technik a metod k jejich uchycení. Vedle nejčastěji používané, čerstvě odštípnuté slídy je zde široké spektrum metod a protokolů, sloužících k modifikaci povrchů vhodnou (bio)molekulou resp. žádoucími funkčními skupinami na daném povrchu.

### Struktura muskovitu

V případě modifikace slídového povrchu, oblíbeného substrátu při AFM zobrazování biomolekul, virů, organel i celých buněk, je potřeba vzít v potaz, že slída, muskovit s obecným vzorcem  $K_2Al_4(Al_2Si_6)O_{20}(OH)_4$ , je štěpný minerál, jehož povrch je značně hydrofilní a adsorbuje molekuly vody ze vzdušné vlhkosti (RH vyšší než 30%) (Z. Liu et al., 2005).

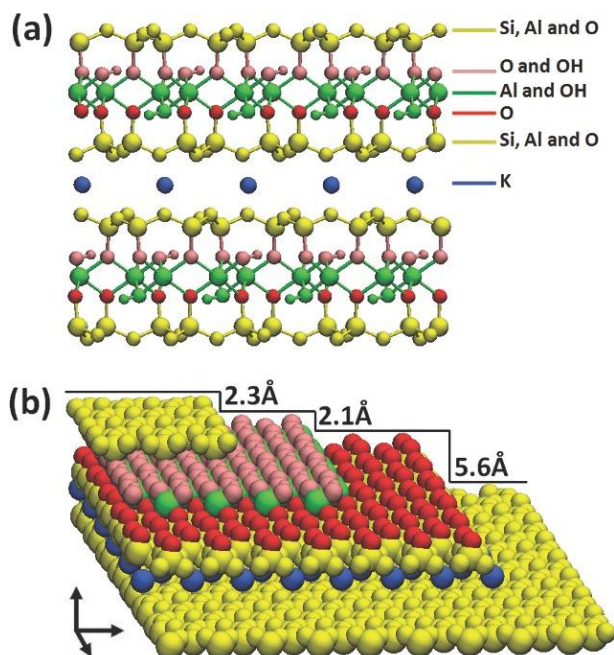
Muskovit se skládá ze sendvičovitě navrstvených křemičito – hliníkových vrstev o tloušťce 0,7 nm svázaných elektrostatickým působením draselnými ionty, viz **obr. 8** a **obr. 9**. Slabé elektrostatické interakce mezi draselnými ionty ve srovnání s kovalentní vazbou mezi atomy v každé z vrstev vytváří ze slídy štěpný materiál poskytující při štěpení v rovině (001) atomárně hladký povrch (Yang L. et al., 2014).

Ve vodném prostředí je svrchní draselná vrstva solvatována a draselné ionty mohou být nahrazeny bivalentními kationty, např.  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  (Kim et al., 2013; Wood & Sharma, 1994).

Obecně lze shrnout, že v případě slídy jsou na jejím povrchu volně dostupné Si–O a Si–OH funkční skupiny, kdy hustota povrchového náboje je silně závislá na pH (Kuwahara, 2001).

Značná obliba slídy spočívá v poskytnutí atomárně hladkého povrchu po snadném odštípnutí svrchní znečištěné roviny (pinzeta, lepicí páska), v její chemické stálosti a nízké

ceně. Právě atomárně rovný povrch substrátu je nezbytnou vlastností substrátu při zobrazování objektů řádově o velikosti nm, např. proteinů nebo nukleových kyselin.

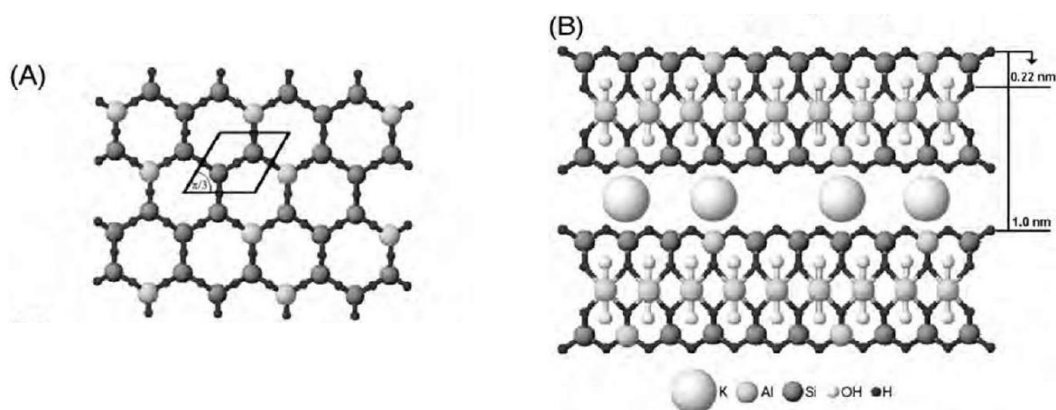


**Obr 8.:** *Struktura slídy, poměr vrstev 2:1, chemický vzorec  $K_2Al_4(Al_2Si_6)O_{20}(OH)_4$ , převzato z (Yang L. et al., 2014)*

*(a) atomární model slídy, pro lepší přehlednost barvy odpovídají jednotlivým vrstvám*

*(b) schématický náčrt slídy, svrchní štěpná rovina (001, žlutá) je následována vrstvou obsahující – O -OH funkční skupiny (růžová).*

Podstatnou vlastností slídy je záporný povrchový náboj při fyziologickém pH (pK~3), který brání v imobilizaci záporně nabitých objektů, např. molekuly DNA z důvodu elektrostatického odpuzování. Proto byla vyvinuta řada kompenzačních metod.



**Obr 9.:** *Struktura slídy; (a) schématický náhled na štěpnou rovinu (001) , vykazující 0,52 nm mřížkovou periodicitu, (b) průřez opakující se vrstevnatou strukturou slídy podél Z-ové osy, vyznačena vzdálenost jednotlivých mezivrstev, převzato z <http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/mica-surfaces-charge-nucleation-and-wear-part-1-nanotechnology/>*

## Modifikace bivalentními kationty

Modifikace slídového povrchu ponořením štěpného lupenu slídy do vodného roztoku soli bivalentního kovu, např.  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  je efektivní a rychlá metodika kompenzace záporného povrchového náboje slídy hydroxylových skupin slídy dvojmocnými kationty, které nahradí původní draselné kationty,  $\text{K}^+$ . Tímto způsobem lze snadno a elegantně obejít negativní elektrostatický povrchový náboj slídy a negativní povrchový náboj molekuly DNA. Silnou vazbu DNA k povrchu slídy zajišťují kationty  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  (Bezanilla et al., 1994; Bustamante & Rivetti, 1996; Hansma et al., 1992; Hansma & Laney, 1996). Slabší vazbu pak soli  $\text{Mg}^{2+}$ , jejichž použití je omezeno pouze na měření v suchém stavu. V literatuře se objevily aplikace také s použitím  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Zr}^{4+}$  (Thundat et al., 1992). Příčinou rozdílně silné imobilizace DNA je různý iontový poloměr použitých kationtů. Menší poloměr odpovídá vyšší povrchové hustotě náboje a zprostředkovává silnější vazbu a stabilitu nukleové kyseliny na povrchu nosiče (Savvateev M.N., 2012).

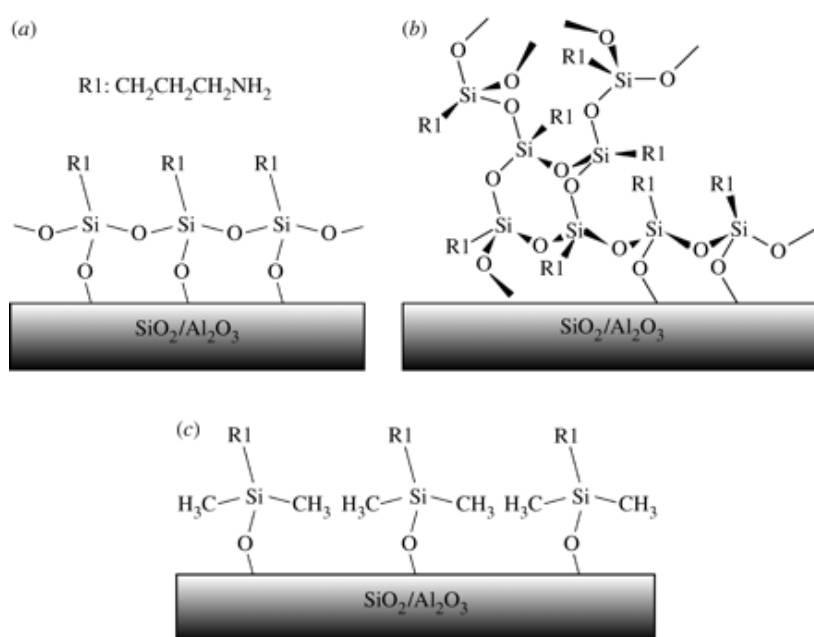
Pozdější experimenty potvrdily, že úprava slídového povrchu kationty není před vlastním adsorpčním krokem nutná, k zajištění dostatečného uchycení makromolekuly je postačující, pokud jsou kationty (např.  $\text{Mg}^{2+}$  či  $\text{Ni}^{2+}$ ) přidány k roztoku adsorbující se makromolekuly (Pastré et al., 2003).

Přesto, že využití bivalentních kationtů je v praxi efektivní metoda k uchycení molekul DNA, není tento přístup vhodný pro studium molekuly DNA ve vodném prostředí či při studiu konformačních změn. Bivalentní kationty v roztoku totiž ovlivňují stupeň svinutí/relaxace DNA molekuly a od určitých koncentrací vedou k zasíťování molekul DNA (Hansma & Laney, 1996; Ke et al., 2009; Leung et al., 2012; Rybenkov et al., 1997a, 1997b).

## Modifikace alkoxyasilany

Druhou oblíbenou a poměrně rozšířenou metodou modifikace slídového povrchu je vytvoření povrchových (mono)vrstev alkoxyasilanů s vhodnou funkční skupinou na alkylovém řetězci (zpravidla  $\text{NH}_2$ ) (Witucky, G.L., 1992). V závislosti na hydrataci jsou ethoxy skupiny silanu hydrolyzovány a vytvoří vazbu s povrchovými Si-O skupinami modifikovaného povrchu. Navázaná vrstva molekul silanu na slídovém povrchu s volnou  $\text{NH}_2$  skupinou umožňuje dostatečně pevné uchycení DNA molekuly. Takovéto uchycení je vhodné i pro AFM zobrazení nukleových kyselin ve vodném prostředí. Nejčastější z používaných silanizačních činidel je v oboru AFM aplikací 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES), kdy přítomná kladně nabitá aminoskupina na alkylovém řetězci APTESu vede k iontové interakci s DNA a tím k jejímu pevnému uchycení (Chrisey et al., 1996; Shlyakhtenko, Luda S., 2003). Při kvalitním silanizačním procesu je hustota volných

aminoskupin 2 až 4 skupiny na  $\text{nm}^2$  (Acres et al., 2012) a modifikovaný povrch je možno vystavit širokému spektru pufrových roztoků bez jeho ovlivnění (Chrisey et al., 1996; Y. L. Lyubchenko & Shlyakhtenko, 1997; Potaman et al., 2004; Luda S. Shlyakhtenko, Gall, et al., 2003). Značnou nevýhodou APTES je však tvorba bočních vazeb mezi sousedními molekulami ve vrstvě, tzv. self-polymerace (viz **obr. 10**) a obecně velká citlivost kvality získaného modifikovaného povrchu na použité silanizační metodě (koncentraci silanu a jeho čistotě, typu rozpouštědla, přítomnost a množství vody, teplotě, době silanizace) a obtížná reprodukovatelnost kvalitního silanizovaného povrchu (zejména nárůst  $R_{\text{ms}}$ ) způsobená mj. vodíkovou vazbu amino skupiny k modifikovanému povrchu (Arora P. S, 1995).

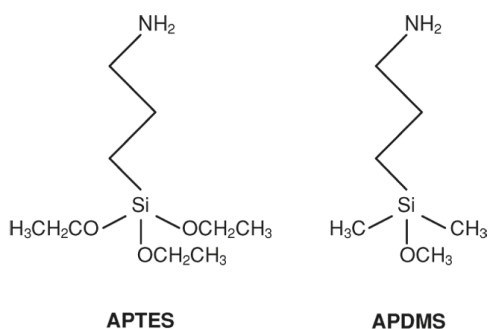


**Obr 10.:** Schéma modifikace slídového povrchu molekulami APTES: (a) vznik (mono)vrstvy (idealizovaná představa), (b) vznik multivrstvy s prvky self-polymerace (reálně dosažitelná modifikace), (c) modifikace slídového povrchu monovrstvou APDMES (idealizovaná představa), převzato z: (Bhushan et al., 2009).

Modifikovat slídový povrch je možno různými způsoby dle typu silanu a jeho stability – z organické fáze (methanol, ethanol, aceton, toluen; (Aissaoui N., 2011; Crampton et al., 2005; Z. Liu et al., 2005; Salmio & Brühwiler, 2007; Vandenberg et al., 1991; W. Wang & Vaughn, 2008; Zhu et al., 2012), z vodné fáze (Z. Liu et al., 2005; Metwalli et al., 2006; Plueddemann, E.P., 1984) a odpařovacím nanosením, které obchází nutnost použití rozpouštědla a vodné fáze (Crampton et al., 2006; Zhu et al., 2012). Různé modifikační techniky (Crampton et al., 2005; J. Hu, 1996) vedou ke kvalitativně odlišným výsledkům, také v rámci jedné metodiky jsou v literatuře publikovány rozdílné parametry studovaných modifikovaných povrchů.

Z dostupné literatury vyplývá, že přidání následného zapékacího kroku (zpravidla 110°C/15 min) či úvodního plazmového ošetření slídového povrchu před vlastní modifikací, zvyšuje kvalitu (homogenitu, nízkou Rms) a trvanlivost modifikovaného povrchu (Acres et al., 2012; Liberelle et al., 2008; Zhu et al., 2012).

Tvorbě nežádoucí horizontální či vertikální polymerace při použití APTES lze předejít použitím aminopropyldimethylethoxysilanu (APDMES), nesoucího pouze jednu alkoxy skupinu, což zabraňuje tvorbě bočních vazeb (Crampton et al., 2005, 2006), viz **obr. 11**.



**Obr 11.:**     *Struktura silanizačního činidla: (a) APTES, (b) APDMES*

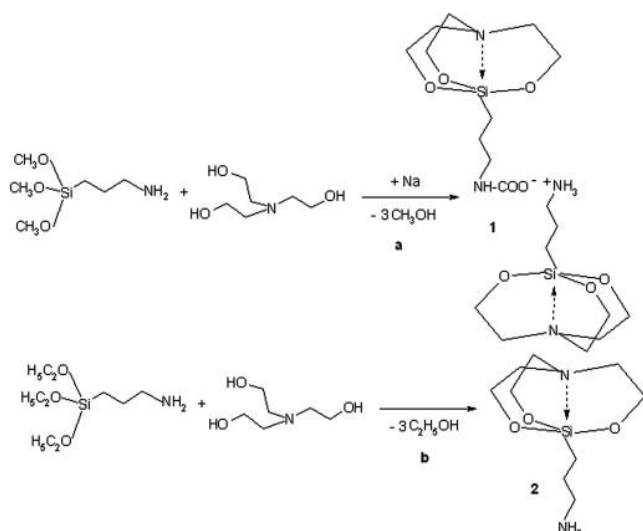
### Modifikace aminopropylsilatranem

Protože jsou alkoxy silany obecně značně hygroskopické a procedura modifikace často vedla k nežádoucímu zvýšení původně atomárně hladkého slídového povrchu (nárůst povrchové drsnosti, *Rms*, *root mean square*; vlivem self polymerace a vznikem agregovaných molekul v silanizované vrstvě), upřednostňují v současné době vědecké laboratoře k modifikaci slídového povrchu silatranů (Luda S. Shlyakhtenko et al., 2013).

Silatraný jsou tricyklické systémy obsahující obvykle atomy (Si, O, C, C, N) a lze je vyrobit syntézou z trialkoxysilanů a triethanolaminu (Puri et al., 2011). Použití 1-(3-aminopropyl)silatranu (APS, CAS [17869-27-1]), nepodléhajícího při pH 7 hydrolyze tak, jako jeho analog - trialkoxysilan, je v posledním desetiletí značně citovaný AFM modifikační postup. Na druhou stranu APS není dosud komerčně dostupný, je potřeba jej syntetizovat. Schéma publikované syntézy viz **obr. 12**. Postup syntézy APS je citován pouze v několika publikacích, a jednotlivé laboratoře se ve svých postupech poměrně liší (Dumitriu et al., 2012; Puri et al., 2011; Shlyakhtenko, Luda S., 2003).

Hlavním přínosem použití APS při modifikaci slídového povrchu je absence agregátů – zpolymerizovaných částic, zhoršujících kvalitu resp. téměř atomární hladkost silanizovaného povrchu, tak jako je tomu často u APTES modifikací daná nižší reaktivitou APS a jeho odolností vůči hydrolyze a polymeraci při neutrálním pH (Puri et al., 2011).

Také APS modifikovaná slída vykazuje na svém povrchu reaktivní amino skupiny, které jsou schopny kovalentního či elektrostatického uchycení molekul. Opakovaný, násobný kontakt mezi imobilizovanou molekulou nukleových kyselin a slídovým povrchem, vede k silné vazbě a uchycení celé molekuly. Nízký povrchový náboj APS-modifikované slídy pak má za následek minimální ovlivnění konfigurace uchycené makromolekuly a zároveň dostatečnou lokální volnost molekuly. Právě malá míra možnosti pohybu DNA, která je možná při AFM zobrazení v kapalinách, je klíčovým faktorem pro úspěšné studium dynamických procesů nukleových kyselin v reálném čase, vyžadující částečnou mobilitu vlákná makromolekuly.



**Obr 12.:** Schéma syntézy 1-(3-aminopropyl)silatranu (APS) zdroj: (Dumitriu et al., 2012)

## Ostatní způsoby modifikace slídového povrchu

V laboratořích profesora Shao byla k uchycení DNA a následnému AFM zobrazení využita známá metoda z oblasti elektronové mikroskopie (1) nanosení uhlíkové vrstvy metodou napařování (J. Yang et al., 1992, 1993; Jie Yang et al., 1994) a (2) nanosení kationické lipidové dvojvrstvy (Mou et al., 1995). Tyto metody se však z dlouhodobého hlediska neuchytily a jsou jen ukázkou rozličného množství modifikačních technik vedoucích k adsorpci či vazbě NK k substrátu a jejímu následnému AFM zobrazení.



## Modifikace skla, HOPG a Au

Sklo nese stejné funkční skupiny jako slída, proto i imobilizace DNA na sklo může obsahovat tytéž modifikační protokoly, jak je uvedeno výše. Je však třeba vzít v potaz, že sklo, amorfni materiál, nikdy nebude dosahovat takové atomární hladkosti, jako čerstvě odštípnutá slída. Hodnoty Rms skleněného povrchu (standardní krycí sklíčko po vyčištění v piranha solution) se pohybují v řádu jednotek nanometrů. Proto je sklo vhodným substrátem např. při zobrazení chromatinu (Allen et al., 1993; Lohr et al., 2007) a větších struktur, jako jsou organely, bakterie či celé buňky.

Vazba molekul DNA na HOPG (*highly oriented pyrolytic graphite*) je zprostředkována buď volnou adsorpcí molekul na povrch grafitu (nevýhodou je však stáčení, případně nahromadění DNA na atomárně rovném substrátu), adsorpcí DNA pod napětím (stabilnější uchycení z důvodu interakce záporně nabitě cukr-fosfátové kostry DNA s kladně nabitou elektrodou), nebo použitím grafitového modifikačního činidla o strukturním vzorci  $(\text{CH}_2)_n\text{-(NCRH}_2\text{CO)}_m\text{-NH}_2$ , způsobujícího vznik kladně nabitě vrstvy polymeru zapříčiňujícího silnou interakci s DNA oproti slídkovému povrchu je však HOPG značně hydrofóbní, čímž ovlivňuje konformaci adsorbované makromolekuly. Není proto vhodným substrátem v mnoha AFM-DNA aplikacích (Yuri L. Lyubchenko et al., 2011). Také zlato, resp. jeho napařené vrstvy, může být po modifikaci thiolovanými skupinami také vhodným substrátem k uchycení a zobrazení DNA (Hegner et al., 1993).

### 1.6. Aplikace AFM v oblasti nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsou velmi důležitým nástrojem či objektem zájmu mnoha rozličných vědních oborů. První AFM studie se zabývaly topografií zobrazovaných NK a metodikou jejich uchycení. AFM měření probíhala na vzduchu, následovalo měření v alkoholovém roztoku (Hansma et al., 1992; Hegner et al., 1993; J. Yang et al., 1992), teprve po rozvoji modifikačních technik byly nukleové kyseliny zobrazovány ve vodném prostředí (Hansma et al., 1992; Hansma & Laney, 1996; Mou et al., 1995). V pozdějších letech se pozornost přesunula k zobrazování protein-nukleových komplexů (Landousy F., 2010; Yuri L. Lyubchenko, 2011; Yuri L. Lyubchenko et al., 2011) a DNA-nanočásticových sond (An & Jin, 2012) a od statických pozorování se přesunulo k vizualizaci dynamických jevů.

Spolu s rozvojem modifikačních technik docházelo také k rozvoji zobrazovaných a analyzovaných vlastností nukleových kyselin. Protože kruhové plasmidy hrají hlavní roli v oblasti biotechnologií zabývajících se např. výzkumem a vývojem antibiotické rezistence, proteinové exprese, v molekulární biologii v oblasti genetického inženýrství či

sekvenování genomu, genové terapii a genetické vakcinaci, staly se plazmidy prvními zobrazovanými vzorky DNA metodou AFM (Gurunathan et al., 2000; M.A. Liu, 2011). Vedle statických snímků odhalujících stupeň konformace, uzavřenost či otevřenost smyček (ccc, *covalently closed circles*) v důsledku poškození a konformace nadšroubovicovým vinutím (supercoiling), umožňuje AFM také dynamické sledování změn stupně vinutí a jeho ovlivňování různými druhy interkalátorů v reálném čase (Erie et al., 1994; H. Wang et al., 2003), taktéž je poměrně populární studium vazebných mechanismů interkalátorů se silným protirakovinným/poškozujícím účinkem (Bates & Maxwell, 2005; Berge et al., 2002, 2002; Mahut et al., 2011; Utsuno et al., 2002) nebo vizualizace formování nano-pórů a DNA origami (Bell & Keyser, 2014).

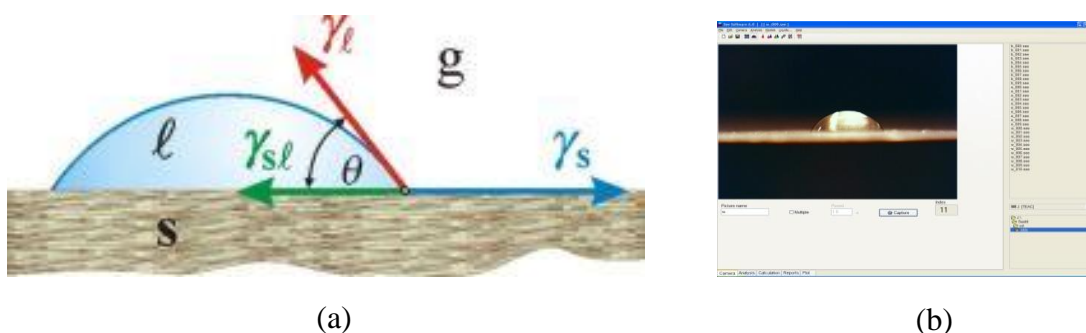
Intenzivně byl a dosud je metodou AFM studován také **mechanismus dynamických změn nukleových kyselin** v základních biochemických procesech jako je replikace, rekombinace, transkripce a kondenzace (Ando et al., 2008; Argaman et al., 1997; Bezanilla et al., 1994; Bustamante & Rivetti, 1996, 1996; Fang & Hoh, 1998; Hori et al., 1998; Kasas et al., 1997; Leforestier et al., 2011; Y. L. Lyubchenko & Shlyakhtenko, 1997; Yuri L. Lyubchenko et al., 1997; Pfannschmidt et al., 1996; L. S. Shlyakhtenko et al., 1998; Luda S. Shlyakhtenko et al., 2000; Yamamoto et al., 2010; P. Zhang & Tan, 2001), DNA kondenzátů (Martin et al., 2000), také jsou AFM metodou studovány přechodové stavy vlivem vnějších podmínek (Rivetti & Codeluppi, 2001; Sanchez-Sevilla et al., 2002; Luda S. Shlyakhtenko, Gall, et al., 2003) nebo v důsledku vnitřního uspořádání makromolekuly (Borovok et al., 2007).

**AFM v kombinaci s fluorescenčním mikroskopem** (FIONA-AFM) pak rozšiřuje své možnosti o studium multiproteinových a DNA/proteinových komplexů, kdy prostřednictvím kvantových teček je např. umožněno přesné stanovení lokace požadovaného proteinu (Fronczek et al., 2011).

**AFM spektroskopie individuálních molekul** (SMFS, single molecule AFM force spectroscopy) je další z AFM aplikací na poli studia nukleových kyselin. V této metodice jsou molekuly NK uchyceny kovalentní vazbou k AFM hrotu a na základě přibližování a oddalování hrotu od povrchu jsou vyhodnocovány silové interakce mezi uchycenou molekulou a studovaným povrchem (G.U. Lee et al., 1994; Tong et al., 2013, Cao et al., 2015; Di Santo et al., 2007; Kransnoslobodtsev et al., 2005; Lyubchenko et al., 2006; McAllister et al., 2005; Shlyakhtenko et al., 2007). Studium elasticity DNA vlákna pak doplňuje vizualizace a spektroskopické metody o oblast vyhodnocování mechanických vlastností DNA, např. v (Leforestier et al., 2011; Shao et al., 1997).

## 1.7. Kontaktní úhel

Při srovnání kvality silanizovaných povrchů s volným aminopropylovým řetězcem je možno vycházet z hodnot kontaktního úhlu (Aissaoui N., 2011, 2011; Pasternack et al., 2008; Fengxiang Zhang & Srinivasan, 2004). Smáčivost povrchu, charakterizována měřením kontaktního úhlu, vypovídá o homogenosti studovaného vzorku. Kontaktní úhel, hlavní parametr kapky kapaliny sedící na povrchu nerozpustné látky, je jednou z mála přímo měřitelných vlastností fázového rozhraní. Metoda měření statického úhlu (*static sessile drop method*) spočívá v nasnímání sedící kapky na pevném čistém podkladu a prostřednictvím citlivé CCD kamery (obvykle propojené s optickým systémem) je sledováno rozprostření kapky na studovaném povrchu, viz **obr. 13**.



**Obr 13.:** Schéma měření kontaktního úhlu, (a) schematický náčrt rozhraní tří fází, (b) reálný snímek z SeeSystému.

Nasnímaný obraz, resp. tečna vedená v bodě rozhraní tří fází a její úhel, tzv. kontaktní úhel  $\theta$ , je poté vyhodnocován. V případě charakterizace ideálních pevných povrchů, vykazujících chemickou stálost, homogenost, nerozpustnost, pevnost, hladkost a rovnost je interpretace kontaktního úhlu snadná. Kontaktní úhel odpovídá ideálnímu kontaktnímu úhlu, plynoucímu z Youngovy rovnice, z níž lze získat také povrchovou energii studovaného povrchu (Meiron et al., 2004; Verplanck et al., 2007).

Ve skutečnosti je většina studovaných povrchů více či méně drsná a chemicky nehomogenní, což značně ovlivňuje studovanou smáčivost. V praxi je tedy povrch charakterizován zdánlivým kontaktním úhlem  $\theta_{app}$ , který je velmi odlišný od ideálního kontaktního úhlu a obvykle nabývá širokého spektra hodnot. Proto byly zavedeny dynamické metody měření kontaktního úhlu (*dynamic sessile drop method*), ve kterých je objem dosedlé kapky zvětšován a je sledován narůstající, tzv. postupující úhel (*advancing angle*), naopak při zmenšování objemu kapky je sledován kontaktní úhel, který nastává při ústupu (*receding angle*). Rozdíl mezi postupujícím a ustupujícím úhlem dává hysterezní rozsah, ve kterém se nachází ideální kontaktní úhel. Tento hysterezní úhel, který určuje průměrnou hodnotu kontaktního úhlu, lépe vypovídá o vlastnostech povrchu (Verplanck et al., 2007).

Při vlastním měření kontaktního úhlu je tedy potřeba vzít v potaz, že hodnotu kontaktního úhlu ovlivňují kromě fyzikálních vlastností povrchu - drsnost povrchu a jeho chemické struktury - také další faktory, jako jsou nečistoty a nedokonalosti či mikro-praskliny, vedoucí ke kapilárním efektům (Feng & Jiang, 2006). Kontaktní úhel je závislý také na velikosti sedící kapky, čase měření, teplotě (Zybill et al., 1997), průniku kapaliny pevnou látkou, opakovaným smáčením kapaliny a případnými probíhajícími chemickými reakcemi (Kwok et al., 1997).

I při porovnávání hodnot kontaktního úhlu monomolekulárně modifikovaných slíd je třeba vzít v úvahu, že modifikovaný povrch nemusí vykazovat stálou a homogenní strukturu a smáčivost modifikovaných povrchů silně závisí na způsobu modifikace (Zeng et al., 2011) a mechanismu uchycení molekul. S ohledem na strukturu APTES, resp. APS molekuly, mohou být tyto uchyceny různým způsobem: přes Si-O-Si vazbu ethoxy skupinu, anebo prostřednictvím vodíkových můstků držících  $\text{NH}_2$  skupinu při povrchu nesoucím – OH funkční skupiny (Arora P. S, 1995; W. Wang & Vaughn, 2008). Molekuly silanu či silatranu mohou být také k povrchu slídy vázány více násobnou cyklickou formou (Kowalczyk et al., 1996).

Protože je APTES ve své podstatě malou molekulou, vykazuje alkylový řetězec tendenci k zanoření do molekulární vrstvy APTESu (W. Wang & Vaughn, 2008). Předpokládá se, že nárůst kontaktního úhlu modifikovaných slíd je dán právě přítomností volného propylového řetězce (Feng Zhang et al., 2010) a je důsledkem obecně malého povrchového napětí silanů, řádově  $20 \text{ nN/m}^2$  (Arora P. S, 1995).

## 2. Poškození DNA a metody jeho detekce

### 2.1. Oxidativní stres

Oxidativní stres je zvýšení koncentrace kyslíkových (ROS, *reactive oxygen species*) a dusíkových (RNS, *reactive nitrogen species*) reaktivních forem oproti antioxidační kapacitě organismu. Pojem oxidativní stres také zahrnuje vlastní působení ROS a RNS na buňky organismu a je všeobecně uznávanou příčinou mnoha akutních a chronických onemocnění včetně snižování buněčné aktivity v procesu stárnutí organismu.

ROS zahrnují jak volné radikály, tak reaktivní částice neradikálové povahy. Volné radikály jsou malé molekuly nebo ionty s malou reaktivní aktivační energií a krátkým poločasem rozpadu, obsahující jeden nebo více nepárových elektronů v atomových či molekulových orbitalech. Proto se snaží stabilizovat spojováním s dalšími molekulami, což může vést k uvolnění dalších radikálů (řetězová reakce). Hlavním zástupcem volných radikálů superoxid  $O_2^-$ , nejčastěji se vyskytující radikál v živých organismech, produkován respirací v mitochondriích a hydroxylový radikál  $\cdot OH$ , vznikající Fentonovou reakcí. Neradikálové částice spadající do skupiny ROS jsou například singletní kyslík, kyselina chlorná a peroxid vodíku. Obecně jsou v organismu nejreaktivnější hydroxylový radikál ( $OH\cdot$ ) s poločasem rozpadu  $10^{-9}$  s, alkoxylový radikál ( $RO\cdot$ ) s poločasem rozpadu  $10^{-6}$  s, singletní kyslík ( $^1O_2$ ) s poločasem rozpadu  $10^{-5}$  s, peroxylový ( $ROO\cdot$ ) radikál, superoxidový radikál ( $O_2^-$ ) a peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) (Aikens & Dix, 1991). Za normálních podmínek jsou kyslíkové radikály kontrolovány a odstraňovány působením superoxid-dismutázy, katalázy nebo glutathionperoxidázy.

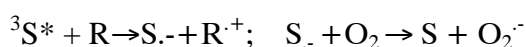
Mezi charakteristické působení oxidativního stresu patří oxidace polynenasycených MK vedoucí ke vzniku široké škály toxických produktů (aldehydy, alkany, konjugované dieny), oxidace nukleotidů, snížení metabolické přeměny proteinů, snížení syntézy specifických enzymů a receptorů vedoucí k nadprodukci příslušných genů, narušení fluidity fosfolipidových dvojvrstev, obecně pak poškození mitochondriálních funkcí a buněčných membrán (Cooke et al., 2003; Peter Kovacic et al., 2005; P. Kovacic & Jacintho, 2001). Zdrojem ROS v organismu je vlastní aerobní metabolismus buněk,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, stimulace fagocytózy patogeny, reakce katalyzované specifickými enzymy (cytochrom P450), Fentonova reakce a vnější fyzikální faktory jako např. UV a X záření. Z dalších exogenních faktorů zvyšujících významně produkci volných radikálů patří průmyslové znečištění životního prostředí, kouření, pesticidy, farmaka (zejména celková anestetika), organická rozpouštědla aj (Cadenas & Sies, 1998).

## 2.2. Fotodynamické působení

**Fotodynamické působení** je založené na fotochemické reakci fotosenzitizéru (PS, *photosensitiser*), ve které je PS schopen energii získanou absorpcí fotonu předat další látce přes tripletní stav s dlouhou dobou života ( $10^{-6}$ s), vznikající vnitřním přechodem ze svých excitovaných stavů (Kudinova & Berezov, 2010).

Po ozáření PS světlem vhodné vlnové délky ( $\lambda_{\max}$  dle absorpčního spektra konkrétního PS) za přítomnosti kyslíku dochází nejprve k absorpci světelné energie, fotosenzitizér přechází ze základního stavu do vyšších excitovaných singletních stavů ( $S_1, S_2, \dots$ ) s krátkou dobou života. Procesem interní konverze PS přechází do tripletního stavu  $T_1$ , jehož životnost je poměrně dlouhá (řádově ms) a proto může být energie excitace přenesena na jinou molekulu, např.  $O_2$ .

Pomineme-li fluorescenci, pak PS v singletním stavu může přejít do tripletní formy dvěma cestami (a) aktivovaný senzitivizér reaguje přímo s jiným organickým substrátem za přenosu vodíku nebo elektronu a vzniku radikálu (meziprodukt RH a R), který dále reaguje s kyslíkem za vzniku oxidované formy substrátu (tzv. reakce typu I):



(b) přímo přenosem energie z PS v tripletním stavu na molekulu kyslíku, který vede ke vzniku singletního kyslíku ( ${}^1O_2$ ):  ${}^3S^* + {}^3O_2 \rightarrow S + {}^1O_2$ . Singletní kyslík, 1000x reaktivnější než základní tripletový stav molekuly  $O_2$ , následně oxiduje plazmatickou membránu, lipidy, aminokyseliny a proteiny (reakce typu II), a vede zpravidla ke smrti buňky (Allison & Moghissi, 2013; Sibata et al., 2001; Triesscheijn et al., 2006).

**Rozsah poškození a cytotoxicity PS** závisí na typu PS, zejména chemické struktuře, konečné lokalizace v buňce, celkové koncentraci senzitivizéru v buňce či ozařované tkáni, hustotě energie (někdy zvané také *expozice* či *dávka světelného ozáření*), kyslíkové dostupnosti v místě působení PS a také čase, jenž proběhne mezi aplikací PS a vlastním ozářením.

Mezi **základní senzitivizéry** patří hematoporfyrin (Hp) a jeho deriváty (HpD), ftalocyaniny a chloriny, testovány byly také benzoporphyriny, purpuriny, texaphyriny, bakteriochloriny apod (Berlanda et al., 2010; Castano et al., 2004; Pushpan et al., 2002; Rajendran, 2015).

Cílové místo intracelulární distribuce PS se liší dle preference vodného či lipidového prostředí. U lipofilních PS jsou cílovými organelami mitochondrie, plazmatická membrána

nebo jádro. Fotoperoxidace membránových lipidů, převážně cholesterolu a nenasycených fosfolipidů pak vede ke změnám v propustnosti membrán, ztrátě tekutosti, zesílení amino a polypeptidů a inaktivaci membránových proteinů. Při aplikaci lipofilních PS se po jejich buněčném vstřebávání v mitochondriích a ozáření předpokládá navození apoptózy. Obecně lipofilní PS pronikají také do buněčného jádra a poškozují DNA všech membránových organel, včetně mitochondrií a endoplazmatického retikula (O'Connor et al., 2009). Po cíleném poškození buňky metodou fotodynamického působení dochází od určitých dávek PS a ozáření k buněčné smrti, nejčastěji v kombinaci apoptózy s nekrozou (Allison & Moghissi, 2013; Berlanda et al., 2010; Robertson et al., 2009). Zdá se, že při lokalizaci PS na plazmatické membráně dochází převážně k nekroze a při lokalizaci PS v mitochondriích převažuje apoptóza.

Prostřednictvím vzniklých ROS se fotodynamického působení (PDT, *photodynamic therapy*) s úspěchem používá k léčbě nejrůznějších karcinomů pod názvem fotodynamická terapie (PDT, *photodynamic therapy*) (Agostinis et al., 2011; Castano et al., 2005a; Davids & Kleemann, 2011; O'Connor et al., 2009). Podle typu okolní a léčené tkáně, optické penetrační hloubky tkáně a schválených dostupných léčiv je možno dosáhnout kumulace fotosenzitizeru v cílové (tumorové) tkáni a po aplikaci světla vhodné vlnové délky a intenzity spuštění jejího buněčného poškození. Ačkoliv nádorové buňky oproti nenádorovým výrazně více absorbují z okolního mezibuněčného prostředí antioxidanty, čímž se chrání před ROS a také buněčné membrány nádorových buněk obsahují méně vícenasycených mastných kyselin (PUFA) než buňky zdravé, jsou zároveň nádorové buňky také známé svou selektivní akumulací vybraných léčiv (včetně fotosenzitizerů) (Agostinis et al., 2011; Mroz et al., 2011). V kombinaci se selektivním ozářením v místě nádoru (a tím lokálního vzniku reaktivních forem kyslíku), je tedy PDT žádanou a efektivní metodou k cílené destrukci nádorové tkáně. (Klaunig et al., 2010; Venza et al., 2015).

Hlavním cílem optimalizace PDT je tedy výběr vhodného PS dle typu léčené tkáně a konečné lokace PS v buňce, zajištění cíleného transportu PS do cílové, zpravidla maligní tkáně v organismu (Spyratou et al., 2012; Zhao et al., 2009) a nastavení takových koncentrací PS a malých hodnot hustoty energie záření, které by při destrukci tkáně vedly k výrazné preferenci apoptotických procesů před nekrotickými (Mroz et al., 2011; Pushpan et al., 2002). Zdá se, že právě volba koncentrace PS a hustoty energie výrazně ovlivňuje převažující způsob buněčné smrti. Při nízkých koncentracích PS a hustoty energie volí buňky spíše apoptotickou cestu, u vysokých koncentrací je převažujícím způsobem smrti nekroza. Svou roli však také hraje typ tkáně a konečná lokalizace PS v buňce. Dle některých studií se zdá, že na preferenci buněčné smrti může mít také vliv koncentrace kultivovaných

buněk – při stejné genotoxické koncentraci PS a použité hustotě světelné energie (Dahle et al., 1999).

### 2.3. PDT a způsob buněčné smrti

Fotodynamická terapie aktivuje v buňce celou řadu signálních drah a reakcí vedoucích k vyvolání stresové odpovědi, hlavním cílem PDT je však cílená smrt buňky. To, jaké procesy vedoucí k buněčné smrti budou po PDT v buňce aktivovány, ovlivňuje chemická struktura a koncentrace senzitizeru, množství dostupného kyslíku, hustota energie (*expozice*, někdy označováno také *dávka ozáření*) a typ cílové tkáně (Buytaert et al., 2007).

Savčí buňky uplatňují v případě poškození svých svých vnitřních procesů či organel (zejména v důsledku ROS), **proces auto-fagocytózy** (*autophagy*). Tento katabolický proces vnitřní destrukce nepotřebných či nefunkčních buněčných organel ev. celých buněk prostřednictvím lysozomů vede u zdravých buněk k udržení rovnováhy mezi syntézou, degradací a recyklací buněčných produktů (Glick et al., 2010). U rakovinných, zejména proliferujících buněk, dochází k narušení auto-fagocytózy. Ačkoliv produkce ROS v buňce, indukovaná PDT, poškozuje většinu proteinů auto-fagocytického procesu, zdá se, že klíčové proteiny vedoucí ke vzniku auto-fagozómů nejsou produkcí ROS poškozeny a PDT tak naopak stimulací auto-fagocytózy může docílit přímo buněčné smrti, častěji však zřetelně zvýhodňuje apoptotický proces před nekrotickým (Kessel & Oleinick, 2009).

**Apoptóza** zahrnuje komplexní a provázané procesy kontrolované buněčné programované smrti. Tento proces je zakódován v každé tělní buňce a zahrnuje vždy signální dráhy tzv. vratné fáze a signální dráhy nevratné fáze, spuštěné kaspázami. Apoptotický proces je spuštěn zpravidla přes aktivaci „receptorů smrti“ v buněčné membráně či uvolněním cytochromu C z mitochondriální membrány do cytosolu. Následnou aktivací kaspázového řetězce (zejména kaspáza -3, -6 a -7) a navazujícími biochemickými procesy je spuštěn (mimo jiné) nevratný proces zvýšené propustnosti (následně i štěpení) jaderné membrány (Kramer et al., 2010), inhibice či inaktivace reparačních procesů vedoucích k opravě DNA molekuly, kondenzace chromatinu a v závěrečné fázi deoxyribonukleásou vyvolaná fragmentace DNA spojená s redukcí jádra (Mc Gee et al., 2002; Roos & Kaina, 2006; Vittar et al., 2010).

Další hydrolytické štěpení cytoskeletálních proteinů vede k buněčné fragmentaci (Bortner et al., 1995) a tvorbě apoptotických těles (Mroz et al., 2011; Oleinick et al., 2002).

Typické apoptotické DNA štěpení začíná zřejmě nejprve prostřednictvím SSBs, které dává vzniknout fragmentům o délce 50 – 300 kbp. Zdá se, že teprve po rozvolnění kvartérní struktury DNA pomocí SSBs se objevují DSBs, vedoucí ke vzniku nukleosomálních



jednotek DNA, fragmentů o typické délce 180-200 bp (tzv. *CAD – dependend DNA fragmentation*). Toto štěpení generuje volné konce DNA s 3'hydroxylovou skupinou a je spojováno s CAD (caspase-activated DNase), enzymu zodpovědného za fragmentaci DNA (Mooney et al., 2002; Nagata, 2000; Semenov et al., 2004) a mitochondriální endonukleázou G (Mc Gee et al., 2002; van Loo et al., 2002) či flavoproteiny uvolněnými z mitochondriální membrány (AIF, *apoptosis inducing factor*). Podle některých studií cílené SSBs ve vysoce organizované kvartérní struktuře DNA neusnadňují následné štěpení DNA na malé fragmenty, ale mají svou signální roli v apoptotickém procesu (Bortner et al., 1995).

Časový vývoj štěpení DNA je závislý na typu aktivovaných signálních apoptotických drah, studované buněčné linii a typu patologického působení. První náznaky štěpení DNA na krátké fragmenty se zpravidla objevuje 90 min od poškození (Bortner et al., 1995). Maximální kaspázová aktivita (klíčová je zejména kaspáza 3, méně pak kaspáza-6 a kaspáza-7) spouští CAD nastává cca 3h po PDT a dosahuje zpět svého minima přibližně do šesti hodin po PDT (Mroz et al., 2011), taktéž exprese heat shock proteinů vyvolaných fotodynamickým působením dosahuje svého maxima cca 6 hodin po působení PDT (Saczko et al., 2015).

**Nekrotická smrt** je zpravidla rychlý zánik buňky v důsledku zvětšení množství cytoplasmy, poškození organel a hlubokého narušení plasmatické membrány. Během nekrózy dochází k zvýšené proteolytické aktivitě buňky. Nekrotické procesy vedou ke smrti buňky uvolněním intracelulárního obsahu buňky do okolí (Castano et al., 2005b). Má se za to, že tento typ smrti buňky je pasivním důsledkem energetické nerovnováhy v buňce v důsledku vyčerpání ATP, ačkoliv v poslední době byly také popsány signální dráhy zahrnuté v nekrotickém procesu (Buytaert et al., 2007).

## 2.4. Toxické poškození DNA

### Struktura DNA molekuly

DNA je dvouvláknová polymorfní molekula skládající se z deoxyribonukleových monomerů propojených fosfodiesterovou vazbou mezi 3' uhlíkem jedné deoxyribózové molekuly a 5' uhlíkem druhé (Bates & Maxwell, 2005). Báze se vzájemně párují na základě komplementarity a dávají vzniknout vodíkovým vazbám, které společně s Van der Waalsovými silami mezi bazemi stabilizují celou strukturu dvoušroubovice. Ke stabilizaci dvouvlákna napomáhá také hydrofobní prostředí vytvořené uvnitř helixu nepolárními bázemi (Mirkin Sergei M, 2001).

Struktura makromolekuly je silně ovlivněna okolním prostředím, jež ovlivňuje výslednou stabilní konformaci DNA. V živých buňkách je výskyt molekuly DNA v B-konformaci, kterou obecně DNA nabývá ve vodném prostředí odpovídajícím fyziologickým podmínkám. B-DNA konformace je dobře známá dvojitá šroubovice s poloměrem dvojlákna 2 nm, charakterizována velkými a malými žlábkami, které se periodicky opakují ve vzdálenosti 3,4 nm. V této formě je DNA vystavena silám, které působí její zkroucení v opačném směru k pravotočivým obrátkám helixu, čímž tvoří negativní supersvinutí. Osa polynukleotidového řetězce tak tvoří v prostoru spirálu - supersvinutí, udržované interakcí s nukleárními proteiny. Vinutí DNA kolem histonových jader tak vytváří negativní našroubovicové vinutí. Stupeň svinutí ovlivňuje genovou replikaci. Negativní supersvinutí pak způsobuje částečné odvinutí helixu, čímž se vytvoří nespárované oblasti pro procesy transkripce, replikace a rekombinace (Banfalvi, 1986).

Je-li molekula DNA dehydrována, nabývá A-DNA konformace, v níž jsou žlábkami od sebe vzdáleny s periodou 2,5 nm. DNA molekula může také nazývat tzv. Z-DNA konformace a S-DNA konformace, je-li vystavena mechanickému napětí. (Bates & Maxwell, 2005; Watson & Crick, 1953).

Při adsorpci DNA na silně hydrofóbní povrchy DNA zpravidla denaturuje, obě vlákna se často rozvolní a zpravidla jsou pozorovány v molekule DNA konformační změny (Maaloum et al., 2011).

### **Oxidační poškození DNA**

Ačkoliv molekula DNA může být poškozena přímo různými vnějšími či vnitřními faktory, způsobujícími oxidativní poškození, inhibici DNA oprav a vazbou cukerných složek na konečné metabolické produkty buňky, prakticky téměř vždy je poškození realizováno prostřednictvím ROS (Mladenov & Iliakis, 2011).

Oxidativní poškození DNA molekuly způsobené produkcí kyslíkových radikálů vede zpravidla ke vzniku lézí, jedno i dvou vláknových přerušení dvoušroubovice (SSB, DSB, *single a double strand breaks*), které neopraveny samy vedou ke genetické nestabilitě. Ta sama o sobě může ovlivnit mnoho enzymů v různých drahách, zahrnujících mimo jiné i mechanismy opravy DNA. Vzniklé DNA léze zahrnují také DNA-DNA a DNA-proteinové zkřížení, modifikaci bází (nejčastěji vznik thymin glykolu, hydroxyguaninu a 8-oxo-guaninu), odštěpení báze či nukleotidu a vznik aduktů (Mercer, J., 2007; Roos & Kaina, 2013).

Oxidace DNA je charakterizována především oxidací deoxyribózy, změnou struktury dusíkatých bází – zejména guaninu a rozrušením dusíkové vazby. Právě hydroxylový

radikál, nejreaktivnější z ROS, s poločasem rozpadu  $10^{-9}$  s, se váže nejčastěji na dvojné vazby. Atakuje tak zejména dusíkaté báze NK, kde dává vzniknout nestabilním radikálovým meziproduktům, které jsou prekurzory přímého poškození DNA a při vyšších koncentracích vedou zpravidla ke spuštění apoptotického procesu (Roos & Kaina, 2006). Je známo více než 80 produktů oxidačního poškození bází DNA způsobeného ROS. To, kam se hydroxylový radikál bude vázat, se odvíjí od jeho elektrofilního charakteru. V případě thyminu se aduje v 60% na C5, v 30% na C6 a z 10% interaguje s methylem. Např. O<sup>6</sup>-methylguanin je známým markerem SSBs, který ve vyšších koncentracích taktéž spouští apoptózu. U purinů je pro hydroxylový radikál atraktivní poloha C4, C5 a C8. Dále pak hydroxylový radikál atakuje vodíkovo-uhlíkové vazby sacharidových složek, kde odnímá vodíkové atomy. Důsledkem jsou oxidované báze, vznik křížové vazby, modifikace sacharidů a zlomy ve vlákně DNA (zpravidla SSBs) (Cooke et al., 2003; Dizdaroglu, 2015; Evans et al., 2004; Friedberg et al., 1995; Jena, 2012; Thormann et al., 2010). Pro molekuly DNA z hlediska oxidačního poškození představují značné riziko také produkty peroxidace lipidů (např. 4-hydroxynonenal). Vzniklé exocyklické DNA adukty, způsobující zesíťování DNA pomocí křížových vazeb, ať již mezi vlákny NK navzájem nebo s okolními proteiny, mění genetický potenciál buňky a jsou markerem oxidativního poškození DNA (Galligan et al., 2014; Shuck et al., 2014).

Vznik SSBs (*single-strand breaks*, jednovláknové zlomy DNA), které jsou zpravidla indukovány vznikem cyklobutan-pyrimidinových dimerů (CPDs), blokuje pohyb DNA-polymerázy po DNA molekule a vede ke vzniku replikačních vidliček či destrukci deoxyribosových fragmentů. Dvouvláknové zlomy DNA, DSBs (double – strand breaks, dvouvláknové zlomy DNA) jsou zpravidla neopravitelné a vedou přímo ke ztrátě genetické informace (Altaf et al., 2007). Samo odezva DNA na oxidační poškození DNA (*DDR*, *DNA damage response*) v podobě DSBs a SSBs vede v případě neopravitelného poškození DNA k další produkci ROS prostřednictvím signálních proteinů a následného spuštění apoptózy (Ciccica & Elledge, 2010; Kang et al., 2012; Roos & Kaina, 2006).

## 2.5. Metody detekce poškození DNA

Detekce poškození DNA zahrnuje obvykle průkaz **(1) DNA aduktů** (Beland F.A. & Poirier M.C., 1994) nebo **(2) zlomů vláken molekuly DNA** (Kumari et al., 2008).

Přímé metody k průkazu aduktů využívají nejčastěji radioaktivního značení <sup>32</sup>P-postlabeling (Kanno et al., 2007; Klaene et al., 2013; Stiborová et al., 1999); detekci prostřednictvím hmotnostní spektrometrie (AMS, *accelerator mass spectrometry*) (R.

Singh & Farmer, 2006) a imunochemické metody ke stanovení specifických aduktů prostřednictvím protilátek (Kojima et al., 1992; Kumari et al., 2008; Santella, 1999).

Přímé metody k průkazu zlomů vláken nukleových kyselin a chromozomálních aberací zahrnují analýzu metafáze (karyotypizace), stanovení počtu mikrojadér v jádře, fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a separační elektroforetické (gelová elektroforéza, pulzní gelová elektroforéza, kometová analýza) a sedimentační metody či HPLC s elektrochemickou či imunochemickou detekcí. K přímým metodám průkazu poškození nukleových kyselin se často řadí také elektronová mikroskopie a mikroskopie atomárních sil (Jiang et al., 2007a).

Nepřímé detekční metody poškození DNA jsou založeny **(3) na průkazu a měření opravných procesů v DNA** (např. stanovení specifických markerů poškození DNA).

Ve své experimentální práci jsem pro průkaz toxického poškození kombinovala agarovou elektroforézu, kometovou analýzu a mikroskopii atomárních sil.

### **Elektroforetické metody detekce poškození DNA**

Sacharido-fosfátová osa molekul DNA a RNA nese v neutrálním nebo zásaditém prostředí rovnoměrně rozložené negativní náboje. Se zvyšujícím se počtem nukleotidů roste také náboj molekuly, kdy poměr mezi molekulovou hmotností a nábojem makromolekuly zůstává konstantní. Pohybem makromolekul DNA a RNA v elektrickém poli pak docílíme jejich separaci podle molekulové hmotnosti.

#### *Agarová elektroforéza*

Při dělení vzorku molekul DNA využíváme buď agarózovou nebo polyakrylamidovou elektroforézu, PAGE. Větší dělicí schopnosti (fragменты NK kolem 5000 kbp) dosáhneme použitím pulzní elektroforézy (PFGE). Při studiu poškození DNA je možno využít také gelovou elektroforézu na úrovni jednotlivých buněk, známou pod pojmem kometová analýza.

Jako nosiče – médium pro migraci nukleových kyselin – se nejčastěji používá agarosa, a to v koncentraci od 0,8% po 5% v závislosti na délce dělených fragmentů. Při dělení fragmentů v rozmezí 1-20kbp vyhovuje koncentrace agarosy 0,4-0,8%, pro fragmenty v rozsahu 500-1000 bp cca 2% koncentrace agarosy, pro kratší fragmenty o délce 100 – 500bp 3% koncentrace agarosy a pro fragmenty 10-100 bp koncentrace 5%.

Nejběžnější aplikace jsou postaveny na využití horizontální elektroforézy (napětí v rozsahu 80 - 200 V, proud 20 – 60 mA), kdy agarósově médium, gel, je uloženo horizontálně ve vhodném pufru (TE, TBE nebo TAE). Pro dobrou viditelnost migrujících makromolekul je

vzorek nanášen do jamek po smíšení s nanášecím pufrem obvykle v poměru 1:4 (bromfenolová modř 0,5g/l, 4000g/l sacharóza, 20mmol/l EDTA).

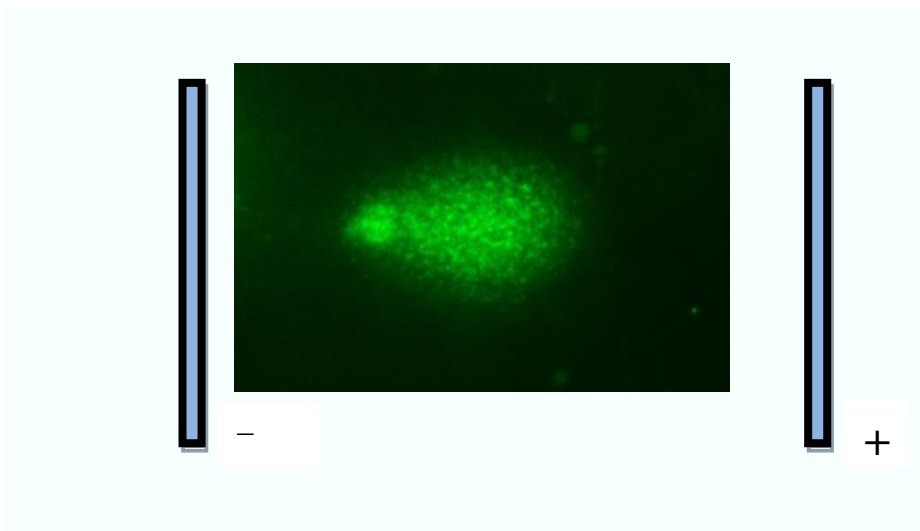
Při detekci apoptózy lze právě díky fragmentaci DNA použít s úspěchem gelovou elektroforézu nebo metody difúzní analýzy. Difúzní analýza je založena na principu migrace vysoce degradovaných fragmentů DNA prostou difúzí v alkalických nebo neutrálních podmínkách.

### ***Polyarylamidová elektroforéza***

Oproti agarózové elektroforéze je u polyarylamidového gelu pracnější příprava (akrylamid a N,N'-metylenbisakrylamid jsou vysoce toxické a kumulují se v organismu), která je vyvážena vysokou rozlišovací schopností (0,2%, tj. dokáže rozlišit např. DNA o délce 500 bp od DNA 501 bp) a dokáže pojmout větší množství DNA bez ztráty rozlišení. DNA izolovaná z polyakrylamidového gelu je vysoce čistá a může být dále použita i pro velmi náročné molekulárně biologické techniky.

### **Elektroforézní mikroskopická metoda - kometová analýza**

Mikroelektroforetická (mikroskopická) metoda pro zjištění poškození DNA na úrovni jednotlivých buněk se nazývá kometová analýza (CA, *comet assay*, v literatuře také uváděná pod zkratkou SCGE, *single cell gell electrophoresis*) a je založena na migraci poškozené DNA z jednotlivých buněk během elektroforézy v agarózovém gelu. Stupeň migrace molekul DNA je vyhodnocován při následné vizualizaci (migrující poškozená DNA v gelu vytváří obraz podobný kometě), při které je také vyhodnocován parametr poškození (fragmentace) DNA. Buňky s poškozenou DNA mají po elektroforéze tvar komety: kruhovitou „hlavu“ reprezentující nepoškozenou DNA a protáhlý „ohon“, jehož délka a intenzita závisí na míře poškození DNA a velikosti fragmentů, viz **obr. 14**.



**Obr 14.:** Buňka MCF7 vystavená PDT působení, obarvená fluorescenčním barvivem, je zřetelné rozlišení malé hlavy a vějířovitě rozšířeného ocasu, mikroskop Olympus IX 81, zvětšení 10x. Senzitivizér 5  $\mu$ M TMPyP, kometová analýza 4h po ozáření. Na stranách komety je vyznačena pozice a polarita elektrod při elektroforéze. Vlastní snímek.

Princip vzniku komety spočívá v tom, že nadšroubovice DNA je v agarózovém gelu poměrně pevně ukotvena a při následné elektroforéze se příliš nepohybuje. SSBs způsobí relaxaci superhelixového vinutí a rozvinuté fragmenty DNA vzniklé poškozením migrují k anodě a cestou vytváří specifický „ohon“. Počet rozvolněných smyček v ocasu odpovídá počtu zlomů DNA. S rostoucím množstvím poškození se více zvyšuje intenzita ocasu, délka zůstává přibližně stejná a je dána vlastní délkou smyček. Množství DNA v ohonu odráží charakter poškození – koncentraci zkoumané látky, délku expozice či dávku (Collins et al., 2008; Dhawan et al., 2009).

Protože jsou komety vizualizovány převážně fluorescenčními barvami, bývá CA také označována jako mikroskopická metoda. Vizualizaci komet lze provádět fluorescenčními barvivy nebo stříbřením. Hodnocení je možné buď počítačovými programy založenými na analýze obrazu, případně členěním do kategorií (např. 0–4) dle míry poškození (Collins, 2014; Garaj-Vrhovac & Kopjar, 2003; Liao et al., 2009; Tice R.R: et al., 2000).

V současnosti se ve vědeckých laboratořích používají dvě modifikace této metody: alkalická a neutrální CA. Při alkalické CA jsou během zmíněné alkalické lýze narušeny vodíkové interakce mezi dusíkatými bázemi DNA, čímž dojde k separaci obou vláken dvojité šroubovice. Zlomy na jednom řetězci se po agarózové migraci projeví detekovatelným ohonem komety. Alkalická CA je tedy citlivá k detekci zejména jednořetězcových zlomů (SSB) (Garaj-Vrhovac & Kopjar, 2003; N.P. Singh et al., 1988).

Při neutrálním pH nedochází k rozvolnění dvouvlákné šroubovice molekuly DNA a ve starší i současné literatuře je uváděno, že neutrální comet assay je citlivá na vizualizaci pouze dvouřetězových zlomů, neboť SSB zřejmě vedou pouze k relaxaci struktury DNA. (Olive P.L. & Banáth J.P, 1993; J. Saczko et al., 2005; Wojewódzka, Maria et al., 2002).

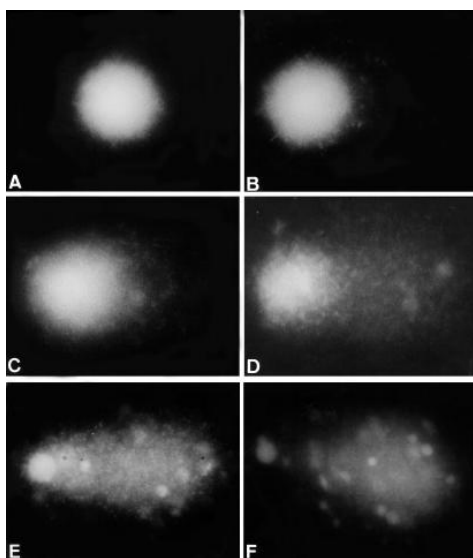
Použitím enzymů je možné prostřednictvím comet assay rozpoznat konkrétnější typy DNA poškození. Štěpením endonukleasou III lze odhalit oxidované pyrimidinové báze (El-Hussein et al., 2012), formamidopyrimidin-DNA-glykosylasa (FPG protein?) detekuje oxidované purinové báze, zejména 8-oxo-7,8 dihydroguanin, známý marker oxidativního stresu (Dušinská et al., 1999). AT4 endonuleasa je zaměřena na cyklobutanové pyrimidinové dimery (Collins, 2014), AlkA glykosylasa alkyluje poškozené báze (Collins, 2009).

Protože má kometová analýza vypovídací schopnost pouze o celkovém poškození DNA, je možno ji rozšířit o FISH metodu (fluorescenční in situ hybridizace) a poté v kometě nalézt přímo chromosom či jeho části, zodpovědné za vznik poškození (Menke et al., 2000). V ojedinělých studiích byly zaváděny metody rozlišení nekrotické a apoptotické buněčné smrti (Morley et al., 2006), obecně je však velmi obtížné stanovit konkrétní způsob buněčné smrti pouze touto zobrazovací analytickou technikou, i když v literatuře jsou uváděny studie, ve kterých jsou komety s malou hlavou a většinou DNA v ohonu (vějířovitě rozšířeném) přisuzovány apoptóze. Takový tvar komety je však možno získat např. po inkubaci buněk s velkou dávkou peroxidu vodíku (Collins 2004), nebo po působení gama záření u buněk v evidentně nekrotickém stavu. Při interpretaci apoptózy prostřednictvím kometové analýzy je potřeba také vzít v potaz čas, ve kterém dochází ke zpracování buněk po působení poškozujícího agens. Při zpracování bezprostředně po aplikaci poškození se nemůže apoptotický proces rozvinout, naopak při dlouhém intervalu od působení agens do zpracování buněk dochází k vymizení apoptotických komet díky částečné opravě poškození či vzniku apoptotických těles. Víme, že v průběhu apoptotického procesu je DNA fragmentována na úroveň nukleozomu, základní jednotku chromatinu, obsahující fragmenty DNA o délce cca 200 bp. Některé zdroje uvádějí, že takto malé fragmenty jsou při kometové analýze ztraceny (Collins & Gaivão, 2007; Tice R.R: et al., 2000). Jiné zdroje naopak prezentují jako apoptotické tzv. haló komety či komety se zřetelně oddělenou „hlavou“ či tzv. „ghost“ (také „*hedgehogs*“ či „*clouds*“) komety, tedy obrazy stěží detekovatelných komet s nezřetelným (či neviditelným, nepřítomným) jádrem a slabě detekovatelným vějířovitě rozšířeným ohonem. Interpretace těchto komet stojí na faktu, vysoce fragmentovaná DNA již značně vymigrovala vlivem napětí z jádra (Choucroun et al., 2001; Morley et al., 2006; Silva et al., 2000).

I když je kometová analýza poměrně rozšířenou metodou ke stanovení toxicity, je nutné při interpretaci výsledků brát v potaz také pozadí degradačního procesu, vnější a vnitřní faktory degradace DNA a okolní podmínky. Např. snížení teploty o 20 °C vede k 10x až 25x násobnému snížení kinetiky chemických reakcí, kdy labilní struktura DNA s degradovanými bázemi je pak snadno fragmentována. Také v různých tkáních je DNA vlivem odlišné odolnosti vůči vlivu autolytických enzymů degradována odlišně (Bar et al 1988), odezva na patologické agens je v různých tkáních velmi heterogenní (Chazal et al 2004). Mnoho genotoxických činidel neindukuje přímo zlomy řetězců NK, ale vytváří apurinová/apyrimidinová místa, která jsou alkali-labilní a přeměňují se pravděpodobně na zlomy až během elektroforézy při vysokém pH.

Zlomy v NK mohou být také dočasně přítomny během opravy bázovou nebo nukleotidovou excizí. Proto velké množství zlomů v kometovém testu může indikovat jak velké poškození, tak zároveň účinnou opravu (Choucroun et al., 2001; Morley et al., 2006).

Metoda kometové analýzy našla široké uplatnění v rozličných oborech, jako bio-monitoring genotoxických chemikálií či záření ve volné přírodě i v zamořených prostředích, testování nově vyvinutých farmakologických preparátů, chemických sloučenin, očkovacích látek či kosmetických přípravků. V klinické diagnostice a screeningu je vlivem dosavadní nejednotnosti metodik a interpretace comet assay spíše minoritní metodou (Forchhammer et al., 2012), (Liao et al., 2009; Shaposhnikov et al., 2013).



**Obr 15.:** *Fluorescenční snímky klasifikace komet: A, skupina 0, nepoškozená buňka; B, skupina 1; C, skupina 2; D, skupina 3; E, skupina 4, maximální poškození, F, apoptoticky poškozená buňka. Převzato z (Silva et al., 2000).*



## Možnosti AFM při studiu poškození jednotlivých molekul DNA

Protože se zpravidla ve zkoumaném vzorku jednotlivé molekuly DNA liší, může být v konkrétních případech výhodné detekovat poškození na úrovni individuálních molekul. Právě metoda AFM je jednou z nejčastějších a nejoblíbenějších technik oblasti zobrazování a manipulace s jednotlivými individuálními molekulami DNA či RNA.

Je známo, že strukturální změny způsobené poškozením DNA mohou být vizualizovány AFM (Jiang et al., 2007a). Zkruty a změny v terciální konformaci mohou být metodou AFM dokonce vizualizovány lépe, než elektronovou mikroskopií (TEM) (Murakami et al., 2000). Podstatnou informací pro následné zhodnocení stupně poškození je však vstupní stav zobrazované DNA a použití vhodné imobilizační techniky.

Kruhová DNA a zejména její terciální struktura je velmi citlivá vůči okolním podmínkám. Vznik buď jediného SSB okamžitě spustí relaxaci superhelikální struktury a plazmid zaujme topologicky relaxovanou formu. Analogicky DSB otevře plazmid v lineární formu. Vícečetné DSBs fragmentují plazmid v lineární vlákna kratší délky ve srovnání s původní délkou plazmidu. Takto vzniklé topologické variace v DNA struktuře lze snadno rozlišit a kvantifikovat jednak gelovou elektroforézou, také však mikroskopií AFM (Boichot S. et al., 2002; Gudowska-Nowak et al., 2009; Ke et al., 2008; Li et al., 2005; Psonka et al., 2005). V případě detekce poškození DNA uzavřené do kruhového plazmidu je možno z AFM skenů snadno vyhodnotit frakce po poškození DNA např. v tomto rozložení: (1) otevřená kruhová forma (vyskytující se frekventovaně po poškození) (2) uzavřená kruhová forma (nepoškozený plazmid), (3) lineární forma. Ačkoliv také gelová elektroforéza je schopna rozlišit tyto tři frakce přehlednými bendy, nedokáže již vyhodnotit další stupně poškození – explicitní délku fragmentů či konkrétní typ poškození tak, jako je tomu u AFM zobrazení DNA molekul. AFM vizualizace DNA molekul ve spojení s protilátkami či konkrétními DNA enzymy, je technika přímé detekce poškození DNA. Např. vizualizace 8-oxoguanin DNA glykolázy na molekule DNA (Chen et al., 2002; Jiang et al., 2007a, 2007b, 2009).

Pozdější studie poškození molekul DNA metodou AFM v letech 2003-2005 ukázaly, že intaktní nadšroubovice DNA může zaujmout relaxovaný kruhový tvar nejen v důsledku svého poškození např. oxidativním stresem, ale také vlivem přítomnosti nízké koncentrace kationtů zprostředkovávající imobilizaci, kdy tyto relaxované tvary mohou být mylně interpretovány jako kvantifikátory plazmidového poškození SSBs (Bussiek et al., 2003; Cherny & Jovin, 2001; Luda S. Shlyakhtenko, Milosenska, et al., 2003; Vologodskii et al., 1992). Jiné studie např. ukázaly, že při uchycení DNA na silanizovaný povrch naopak vysoká koncentrace solí zachovala původní nezměněnou konformaci studovaných vláken

DNA (Jiang et al., 2007c; Krasnoslobodtsev et al., 2007; Luda S. Shlyakhtenko et al., 2007).

Metoda mikroskopie AFM je schopna vedle zobrazení realizovat také měření délky vzniklých fragmentů či vyhodnocení změn terciální struktury. Nepoškozená plazmidová DNA se často na AFM skenech objevuje v kruhové uzavřené formě doprovázené četnými smyčkami. Po poškození DNA se tyto terciální struktury rozvolňují, objevují se SSBs či DSBs doprovázené zkrácováním lineární formy molekuly DNA. V rámci obrazové analýzy je možno vyhodnocovat délku vzniklých DNA fragmentů a na základě histogramu průměrné délky lineární formy plazmidové DNA usoudit na stupeň poškození DNA (Gudowska-Nowak et al., 2009; Jiang et al., 2010; Pang et al., 1998, 2005).

V posledních letech byly také publikovány studie zabývající se změnou nanomechanických vlastností dvoušrobovice DNA vlivem poškození. Metoda silová spektroskopie (SMSF, *single molecule force spectroscopy*) je novou oblastí aplikace AFM při studiu poškození DNA molekul (G. Lee et al., 2007; G.U. Lee et al., 1994).

### 3. Magnetické nosiče

Třetí část práce se věnuje analýze morfologie a jemného povrchu magnetických nosičů aplikovaných při ireverzibilní adsorpci DNA. Studovány byly komerčně dostupné nosiče a nosiče syntetizované s cílem zhodnotit možnost AFM vizualizace nukleových kyselin adsorbovaných na magnetický nosič.

Magnetické mikročástice a nanočástice jsou široce zaváděny a aplikovány v různorodém spektru technik: v roli kontrastní či značící látky při zobrazení tkání magnetickou rezonancí (Hartung et al., 2007; Pankhurst et al., 2003), jako nosiče pro cílený transport léčiv (Babincová et al., 2002; Bucak et al., 2012; Kakar et al., 2013; Wei et al., 2012) při magnetofekci v roli nosiče DNA v genové terapii (Plank & Zepathi, 2011; Schillinger et al., 2005) či jako zdroje tepla při cílené terapii nádorů hypertermií (Bucak et al., 2012; Cui et al., 2014; Hergt et al., 2006). Zapojení magnetických částic ve vývoji nových biosenzorů, ať už biokatalytických nebo bioafinitních, je současnou výzvou při rozvoji nových analytických a diagnostických metod (Horák et al., 2011; Osaka et al., 2006; Pamme, 2012; Veiseh et al., 2010; Wacker et al., 2007; Xu & Wang, 2012).

Mezi nejrozšířenější in vitro aplikace magnetických nosičů v biotechnologiích a biomedicíně patří izolace nukleových kyselin (DNA/RNA) ze složitých biologických systémů, jako jsou buněčné suspenze, homogenáty a fermentační média (Horák et al., 2007; Rittich & Spanová, 2013), selektivní izolace vybraných proteinů (Šafařík & Šafaříková, 2004), mikroorganismů, buněčných organel či celých buněk (Šafařík & Šafaříková, 1999).

Princip jednoduché a rychlé separace či směrování magnetických nosičů v médiích spočívá v navázání cílové složky ze vzorku na magnetický nosič, který je po vhodné inkubační době ze vzorku separován společně s cílovou složkou pomocí vnějšího magnetického pole. Magnetické vlastnosti nosičů spolu s možností vazby nejrůznějších biologicky aktivních látek na relativně velký povrch částice (řádově  $100 \text{ m}^2$  až  $1000 \text{ m}^2/\text{g}$  u částic s mikroporézním povrchem a póry pod 2 nm) umožňují efektivní vazbu a následnou selektivní separaci či transport působením vnějšího magnetického pole (Berensmeier, 2006).

Magnetické mikročástice aplikované v separačních metodách mají většinou charakter kompozitních materiálů, které jsou složeny z vlastní fero- nebo ferimagnetické složky zodpovědné za interakci s vnějším magnetickým polem (tzv. magnetické jádro) a složky diamagnetické, umožňující interakci s biologickým systémem, tvořeným nejčastěji z

polymerních materiálů (tzv. obal), podmínkou použití je chemická stabilita v širokém spektru pH, minimální agregace a biokompatibilitnost.

Metody syntézy magnetických částic se zaměřují na přípravu práškových materiálů obsahujících mikročástice či nanočástice maghemitu, magnetitu, směsných oxidů železa nebo feritů, na přípravu tzv. magnetických kapalin a na syntézu magnetických částic přímo v prostředí obalového („bio“) polymerního materiálu. Obal magnetického nosiče slouží ke stabilizaci, dispergaci a funkcionalizaci povrchu nosiče, brání agregaci či precipitaci magnetických částic a minimalizuje nežádoucí interakce v biologickém prostředí. Konečná velikost a tvar distribuce velikosti syntetizovaných částic závisí na způsobu přípravy, reakční teplotě, pH, iontové síle, použitém obalovém materiálu apod (Horák et al., 2007; Laurent et al., 2008).

Praktická aplikace magnetických nosičů při izolaci genetického materiálu z komplexních vzorků (buněčná suspenze, homogenát, fermentační médium apod.) či přímo z hrubého lyzátu buněk je velmi jednoduchá a časově nenáročná. Princip separace spočívá v reverzibilní adsorpci nukleové kyseliny na povrch magnetického nosiče v přítomnosti vysoké koncentrace chaotropních činidel nebo PEG. S pomocí vnějšího magnetického pole vyvolaného silným magnetem, přiloženým ke stěně nádoby obsahující roztok s magnetickými nosiči, dochází k efektivní a účinné separaci částic s navázanou DNA. Po separaci následuje promývací a eluční krok. Magnetická separace zcela obchází použití centrifugy nebo porézní filtrace, čímž minimalizuje působení mechanického stresu na vzorek.

Základní rys analýzy topografie částic spočívá v určení převládající morfologie tvaru, v měření distribuce velikosti částic metodou obrazové analýzy, případně v určení drsnosti povrchu částic či přítomnosti funkčních skupin exprimovaných na povrchu nosiče.

Přesto, že údaje o distribuci velikosti částic mohou poskytnout také optické metody, například techniky využívající rozptylu světla (DLS, SLS) či klasické mikroskopické techniky (zpravidla SEM a fluorescenční mikroskopie), mikroskopie atomárních sil poskytuje cenné údaje nejen o poloměru částic, ale také vizualizuje detailní tvar a topografii jednotlivých částice v 3D (Trachtová et al., 2015). Topografické snímání je možno dále propojit s analýzou fyzikálních vlastností povrchu (zpravidla drsnost,  $Rms$  a  $Ra$ ), v pokročilých studiích je možno vyhodnotit také zastoupení funkčních skupin a mapovat tak chemické vlastnosti studovaného povrchu.

Protože AFM snímání vyžaduje uchycení studovaných objektů k pevnému podkladu, je u magnetických nosičů imobilizace nejčastěji zprostředkována elektrostatickými silami,

mechanickým způsobem nebo imobilizačními protokoly na základě dostupných funkčních skupin na povrchu studovaného vzorku.

U studia magnetických nosičů používaných při separačních procesech je výzvou objasnit detailní mechanismus reverzibilní adsorpce DNA na magnetický nosič, roli drsnosti povrchu či vliv přítomných funkčních skupin na efektivnost adsorpce a desorpce DNA a její následné eluce.

## 4. Experimentální část I - Zavedení a optimalizace imobilizačních metod k zobrazení nukleových kyselin mikroskopií atomárních sil

### 4.1. Materiál a metody – zavedení a optimalizace imobilizačních metod

#### AFM přístroje a software

**AFM zobrazování** nukleových kyselin bylo realizováno v průběhu studia na AFM modulech: Ntegra VITA (NT-MDT), Bioscope Catalyst (Bruker), BioAFM NanoWizard 3, (JPK).

Analýza a datová vizualizace byla realizována v těchto programech: LabView, NanoScope Analysis 1,5 software (Bruker) a Gwyddion (volně dostupný modulární program pro mikroskopie rastrovací sondou (Nečas & Klapetek, 2012)).

**AFM analýza.** Pro srovnatelnost a nastavení reprodukovatelných parametrů byl pro analýzu skenovaných povrchů upřednostňován tapping zobrazovací mód. V tomto režimu byla oscilační amplituda nosníku udržována na 10 nm během všech experimentů. Při některých měřeních byl použit ScanAsyst měřicí mód. Všechny níže uvedené AFM skeny jsou původní originální data, zpracovaná softwarově pouze proložením všech datových bodů rovinou druhého řádu bez dalších obrazových úprav.

Hodnoty *Rms* (root mean square) jsou vždy vztaženy na plochu 100 x 100 nm<sup>2</sup>, není-li v textu uvedeno jinak. Uvedená hodnota reprezentuje střední hodnotu a směrodatnou odchylku z 18 různých proměřených oblastí, kdy vždy šest z nich je z jednoho silanizovaného vzorku slídy (odlišné oblasti pro vyhodnocení homogenity vzorku).

**Kontaktní úhel** byl proměřován SeeSystémem (AdveX instruments, Brno, Czech Republic), skládajícím se ze tříosé polohovací vzorkovací plochy propojené s optickým systémem a HD kamerou kontrolovanou počítačem. Snímaná statická data byla vyhodnocena přidruženým software tří bodovou aproximací. Kapky o objemu 5 µl DW byly nanášeny standardní pipetou pod úhlem 90° ze vzdálenosti 4 mm nad povrchem. Obraz sedící kapky byl snímán 5 s po nanesení kapky. Uvedené hodnoty odpovídají průměrné hodnotě z 10 měření na třech nezávislých vzorcích u dané povrchové modifikace.

## Materiál a chemikálie

**BIVALENTNÍ KATIONTY** – v podobě NiCl<sub>2</sub>(LachNer); MgCl<sub>2</sub>,(Penta)

### PUFROVÉ ROZTOKY

– **HEPES**; *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*, pufrovací rozsah pH 6,8-8,2, dodavatel SigmaAldridge; byl použit v těchto koncentracích a variantách: 40mM HEPES pH 7,8 a 20mM HEPES pH 7,8; s koncentrační řadou nikelnatých a hořečnatých kationtů: 0,5mM, 1mM, 5mM a 10mM MgCl<sub>2</sub> resp. 0,5mM, 1mM, 5mM a 10mM NiCl<sub>2</sub>.

– **TRIS**; *tris(hydroxymethyl)aminomethane*, pufrovací rozsah pH 7,5-9; dodavatel Sigma Aldridge; byl použit v těchto variantách:

10mM TRIS-HCl 15mM NaCl 5mM MgCl<sub>2</sub> – pH 7,8.

10mM TRIS-HCl 15mM NaCl 5mM NiCl<sub>2</sub> – pH 7,8.

Z důvodu chelatačního efektu EDTA na Mg<sup>2+</sup> ionty byl TRIS pufr použit v čisté podobě (bez 5mM EDTA) pouze s přidavkem MgCl<sub>2</sub> nebo NiCl<sub>2</sub>.

– **fosfátový pufr** (pufrovací rozsah pH 6-8,5), dodavatel FLUKA; použité koncentrace: 100mM PBS 5mM MgCl<sub>2</sub> pH 7,8 a 100mM PBS 5mM NiCl<sub>2</sub> pH 7,8.

**DNA** - zobrazovaná DNA byla izolována z nádorových linií MCF7 standartním izolačním kitem (NORGEN). Izolovaná NK byla rozředěna na koncentraci 10 µg/ml a alikvóty o množství 20µl byly zamrazeny na další použití (-20°C). Pro adsorpci a uchycení NK byl zásobní roztok DNA rozředěn na pracovní roztok o koncentraci 1 µg/ml DNA v daném zobrazovacím pufru. V některých měřeních byla použita také plazmidová DNA, vektor pmaxGFP v konečné koncentraci 1 µg/ml DNA v daném zobrazovacím pufru.

### SILANY a ostatní reagenty

APTES, CAS: 919-30-2, 3-aminopropyltriethoxysilan; 99%; dodavatel SigmaAldridge (SA)

APTMS, CAS: 13822-56-5, 3-aminopropyltrimethoxysilan; 98%, dodavatel FLUKA

APDMES, CAS: 18306-79-1, 3-(ethoxydimethylsilyl)propylamine, 97%, dodavatel – SA

DiPEA, CAS: 7087-68-5; N,N-diisopropylethylamin, triethylamin, 99,8%; dodavatel – SA

TEA, CAS: 102-71-6; triethanolamin, 99,5%; dodavatel – SA

Triethylamin CAS: 121-44-8; N,N-Diethylethanamin, 99,5%; dodavatel – Fluka

Kyselina chomsírová - dodavatel Penta – Typ A 5

CF - 5-karboxyfluorescein-, (95%), dodavatel – SA

DNP - ε-amino-N-kapronová kyselina- dodavatel – SA

TSTU - N,N,N',N'-tetramethyl-O-(N-sukcinimidyl)uronium tetrafluoroborat, (98%),  
dodavatel – Fluka

**ROZPOUŠTĚDLA** - toluen, aceton, chloroform, methanol, ethanol – dodavatel LachNer

deionizovaná voda – hodnoty pod 0,05 mS/cm.

**SLÍDOVÉ DISKY** – dodavatel TedPella (USA), muscovite grade V1, průměr 1cm. Slídové disky byly vždy před modifikací či nanesením DNA očištěny několikerým odloupením svrchní vrstvy (izolepou (min 3x)) a silným proudem stlačeného plynu (N<sub>2</sub>) pro zajištění čistého, atomárně hladkého povrchu.

Plynný N<sub>2</sub> a stlačený přečištěný vzduch byly použity při přípravě čerstvé slídy k odstranění zbytkových šupinek odloupených vrstev slídy.



## 4.2. Přehled testovaných imobilizačních metod

### Imobilizace bivalentními kationty

V případě fixace DNA na slídový povrch bivalentními kationty byla testována metodika za použití hořečnatých resp. nikelnatých kationů ( $MgCl_2$ , resp.  $NiCl_2$ ) přidaných k pracovnímu roztoku DNA. Ověřována byla tato koncentrační řada: 0,5mM, 1mM, 5mM a 10mM  $MgCl_2$  resp. 0,5mM, 1mM, 5mM a 10mM  $NiCl_2$  a tři druhy puřových roztoků o různých koncentracích (TRIS, HEPES, PB). Konečná koncentrace DNA v pracovním roztoku, nanášeném na čerstvě očištěný slídový disk byla 1mg/ml DNA, nanášené množství 4 $\mu$ l, napipetovány vždy do středu slídového disku. Inkubace probíhala po dobu 15 min v uzavřené Petriho misce při 8°C v lednici. Po inkubaci byl povrch slídy opláchnut ultračistou vodou (3x po 1ml DW) pro odstranění neuchycených vláken DNA a usušen stlačeným vzduchem či proudem inertního plynu. Imobilizovaná DNA byla zobrazována týž den AFM metodou. Při opakovaných měřeních či studii působení času na kvalitu uchycení, byly slídové disky s nanesenou DNA uchovávány v exikátoru s vysoušedlem (silikagel) při pokojové teplotě.

### Imobilizace prostřednictvím alkoxyilanů

Protože se údaje o kvalitě modifikovaných povrchů metodou APTES v literatuře značně liší, byly pro zavedení reprodukovatelné metody testovány celkem tři odlišné cesty k modifikaci slídového povrchu:

- (A) silanová vrstva získaná odpařovacím nanesením
- (B) vrstva vytvořená z vodné fáze
- (C) vrstva vytvořená ponořením do organické fáze

#### A ) modifikace napařovacím nanesením silanu

##### A.1 APTES/APTMS (Y L Lyubchenko et al., 1993)

Metodika silanizace spočívá v umístění otevřené eppendorfky s cca 30 $\mu$ l silanizačního činidla ATPES či APMS v exikátoru společně s čerstvě odštipnutými slídovými disky. Po evakuování je exsikátor ponechán po dobu cca 2-3 hodin. Poté jsou slídové disky opláchnuty DW a po osušení připraveny k nanesení roztoku DNA. Použité modifikace: rozšíření o bazický katalyzátor, 10 $\mu$ l DiPEA (Ebner et al., 2007; Z. Liu et al., 2005) nebo 10 $\mu$ l TEA, vložený společně se silanizačním činidlem do exikátoru. Exsikátor byl vždy naplněn argonem před vložením reagentů a slídových disků a poté evakuován vodní vývěvou. Po inkubaci v APTES parách byl slídový disk opláchnut deionizovanou vodou a vysušen. Byl také sledován vliv vysoké teploty na změny v uspořádání a stabilitu

silanizované vrstvy. Proto byla část modifikovaných slíd ponechána při 130°C po dobu 30 min a po opláchnutí byly slídy použity k nanesení DNA. Použitý APTES nebyl po zakoupení redestilován v argonu, byl však uchováván v exikátoru plněném argonem.

#### A.2 APDMES (Crampton et al., 2005, 2006)

Metodika silanizace prostřednictvím APDMES (aminopropyltrimethylethoxysilan, CAS: 18306-79-1) spočívá v umístění cca 30 $\mu$ l APDMES, monofunkčního aminosilanu, v otevřené eppendorfce společně s bazickým katalyzátorem DiPEA (1,1-diisopropylethylaminem) (10 $\mu$ l) v cca 2l exikátoru společně s čerstvě odštípnutými a ofouknutými slídovými disky. Po evakuování exikátoru (8min – 10min rotační vývěva) byly slídové disky vystaveny parám silanu po dobu 2-3 hodin. Po inkubaci v APDMES parách byl slídový disk opláchnut DW, vysušen a použit k nanesení pracovního roztoku DNA exsikátor nebyl plněn argonem před vložením reagensů.

#### **B) kapalným roztokem alkoxy-silanu v polárním rozpouštědle**

Zásobní roztok zobrazované DNA byl rozředěn v 0,1% v/v vodném roztoku APTES a nanesen na čerstvě odštípnutý slídový povrch. Po 15 min inkubaci (RT) byl slídový povrch opláchnut a osušen proudem stlačeného plynu a ihned použit k nanesení pracovního roztoku DNA.

#### **C) kapalným roztokem alkoxy-silanu v nepolárním rozpouštědle**

##### C.1 APTES/TOLUEN 10<sup>-3</sup> mol APTES (Zeng et al., 2011)

Čerstvě odštípnutý a očištěný slídový disk byl po dobu cca 5 sec vystaven 10<sup>-3</sup> mol/l APTES v bezvodém toluenu při pokojové teplotě. Toluén byl přesušeným molekulárním sítem. Po vyjmutí z roztoku byl modifikovaný slídový disk opláchnut k odstranění neuchycených molekul a po usušení okamžitě použit k nanesení pracovního roztoku DNA.

##### C.2 APTES/ACETON, TOLUEN 2% APTES (Angerer et al., 1998)

Původní metodika z devadesátých let je založena na modifikaci povrchu s –OH funkčními skupinami prostřednictvím acetonového či toluenového roztoku aminopropyltriethoxysilanu (viz C1) avšak s vyšší koncentrací. Ověřován byl základní protokol založený na pracovním roztoku 2% APTES v suchém toluenu (99%), acetonu 99% a 95% acetonu (obsahujícím DW), inkubace čerstvě odštípnuté slídy po dobu 5 sekund až 3 min. Po opláchnutí slídy sušeny argonem. Ostatní úpravy analogicky viz C1.

## Metodika – uchycení NK prostřednictvím 3-aminopropylsilátranu

Modifikace slídového povrchu spočívala ve vystavení čerstvě odštípnutého slídového povrchu čerstvému pracovnímu vodnému roztoku APS (1:3000) po dobu 30 min (Luda S. Shlyakhtenko, Gall, et al., 2003) při pokojové teplotě.

### Syntéza APS

S ohledem na komerční nedostupnost APS byla realizována syntéza APS na základě publikovaných výsledků ze dvou vědeckých laboratoří: (Dumitriu et al., 2012) a (Puri et al., 2011; Luda S. Shlyakhtenko, Gall, et al., 2003).

**A) Syntéza APS (protokol syntézy převzat dle (Dumitriu et al., 2012), realizace v RCPTM Olomouc**

Ke vstupním reaktantům – APTES (4,4ml) a TEA (1,57ml) rozpuštěným v MeOH (14,2ml), BuOH (1ml) a toluen (50ml) nebylo přidáno katalytické množství Na. Směs byla udržována po dobu 3h přibližně při 60°C ve vodní lázni, unikající EtOH byl zachytáván. Směs byla poté ponechána vychladnout a uchována při pokojové teplotě bez dalších úprav. Výsledný produkt byl nejprve tekutý, po přemražení část produktu vykristalizovala a vytvořila bílou mazlavou hmotu. Po delším zamražení vykristalizovaly z hmoty průhledné krystaly jehlovitého tvaru. Za předpokladu, že šlo o vykristalizované APS, byly tyto následně použity k modifikaci slídového povrchu.

**B) Syntéza APS – optimalizace metody syntézy APS, realizace CEITEC, BRNO**

Syntéza APS termodynamickou formou byla prováděna ve 12 variantách (s přidáním katalytického množství Na / bez přidání katalytického množství Na, byla volena rozdílná reakční doba (2h, 4h, 6h), rozdílný poměr reaktantů (molární poměr 1:1; 1:1,5; 1,5:1), tlak a teplota lázně (40°C – termodynamicky, 60°C, 80°C). K pozitivním výsledkům syntézy vedla reakce při neměnné teplotě lázně 80°C, za použití inertního plynu (běžně dostupný balónek naplněný suchým argonem, napojený na otevřenou část zpětného chladiče), při mírně zvýšeném atmosférickém tlaku a za míchání teflonovým míchadlem. Za účelem maximální objektivitě porovnávaných produktů, probíhala syntéza vždy u třech obměn molárního poměru vstupních reaktantů zároveň (ve stejné lázni a ve třech baňkách napojených na jednu aparaturu v tzv. „vemínku“). Jako vstupní reaktanty byl použit (3-aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS), který byl přečištěn frakční vakuovou destilací při teplotě lázně 120°C a tlaku v rozmezí 5-15 torr (1torr=133.322 Pa), triethanolamin byl použit bez přečištění, stejně jako katalytické množství sodíku, bylo-li použito.

Po uplynutí reakční doby byl produkt – směs APS a nežádoucích látek o vysokém bodu varu vystaven odparu na vakuové odparce (tlak mezi 5-15 torry) při teplotě lázně 130°C po dobu 60 minut, čímž se zbavil přebytečného APTMS (teplota varu 67°C při 5 torrech, teplota varu 91-92° C při 15 torrech) a methanolu. Po odpaření nezreagovaného aminopropyltrimethoxysilanu zůstala pevná bílá směs APS a triethanolaminu, jíž není možné na vakuové odparce dále oddělit, v důsledku podobných teplot varu APS a triethanolaminu (APS: 312°C, triethanolamin: 335°C při normálním tlaku) (Ambrož, 2013), CEITEC, Brno.

Bylo ověřeno, že produkt syntézy obsahuje velké množství bočních produktů (oligomery), znehodnocující modifikační proces. Experimentálně bylo zjištěno, že toluen rozpouští vzniklý APS, zároveň nerozpouští triethanolamin, který je poté možno oddělit. V syntéze byl tedy zaveden další krok, a to přečištění produktu převrstvením toluenem. Následným krokem pak vznikly z rozpuštěného APS v toluenu čiré krystaly APS, které byly dále použity k další analýze a k vlastní modifikaci slídových povrchů.

Produkty APS syntézy byly dále ověřeny metodou proměření kontaktního úhlu, AFM měřením a *Rms* analýzou. Produkty APS syntézy a postup modifikace slídového povrchu syntetizovaným APS bylo ověřeno úspěšným zobrazením uchycených DNA fragmentů na modifikovaném povrchu.

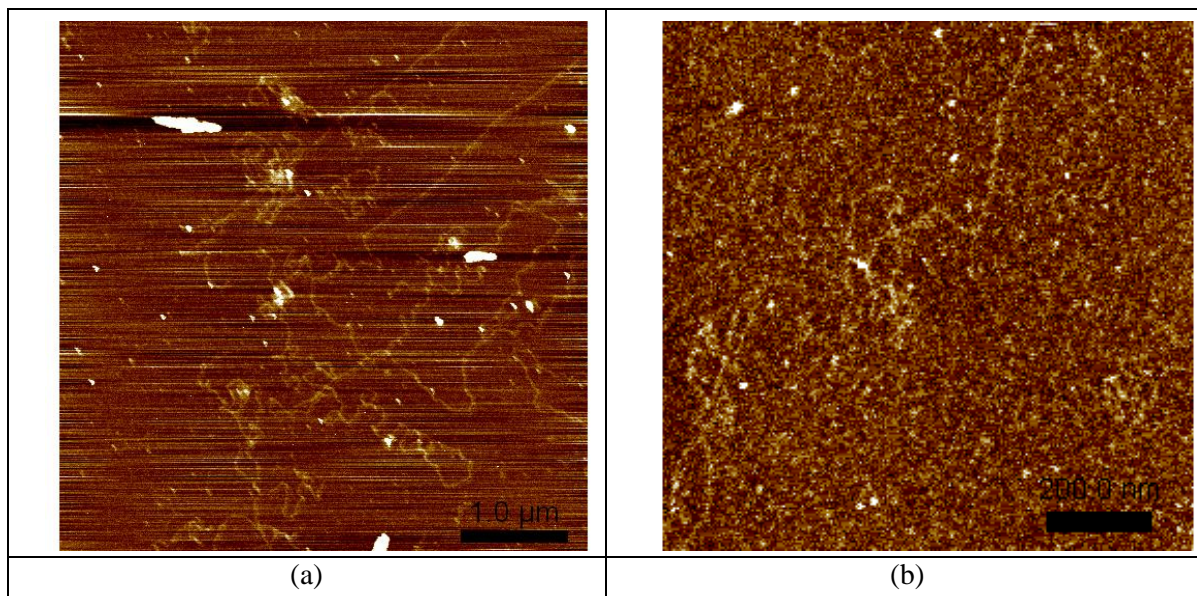
### **Metodika – měření kontaktního úhlu**

Kontaktní úhel vybraných modifikovaných slíd byl měřen SeeSystémem (MUNI Brno) v termostátované místnosti při 23°C. Snímání kamerou bylo vyhodnoceno cca 10 s a 1 min po nanesení 3 $\mu$ l kapky deionizované vody (23°C), vertikálně pod úhlem 90° ze vzdálenosti 50 mm.

Byly vyhodnocovány minimálně tři nezávislé vzorky slíd modifikovaných též metodou a reagensii. Celkem byla zpracována data pro 30-50 hodnot kontaktního úhlu v daném čase na dané modifikované slídě. Nebyl nalezen žádný významný rozdíl v naměřených hodnotách ( $t=1s$  a  $t=20s$ ). Hodnoty kontaktního úhlu byly v rozsahu respektujícím aktuální modifikovanou a proměřovanou slídu, z naměřených hodnot byla vyhodnocena průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Pro měření vývoje změn kontaktního úhlu na APS-modifikované slídě v čase byly slídy uchovávány v intervalech mezi měřeními v uzavřených petriho miskách uložených v exsíkátoru v termostátované místnosti, vyjmuty k proměření kontaktního úhlu v intervalech: 0,5h, 4h, 18h, 24h, 48h.

### 4.3. Výsledky - zavedení a optimalizace imobilizačních metod

#### Imobilizace nukleových kyselin bivalentními kationty

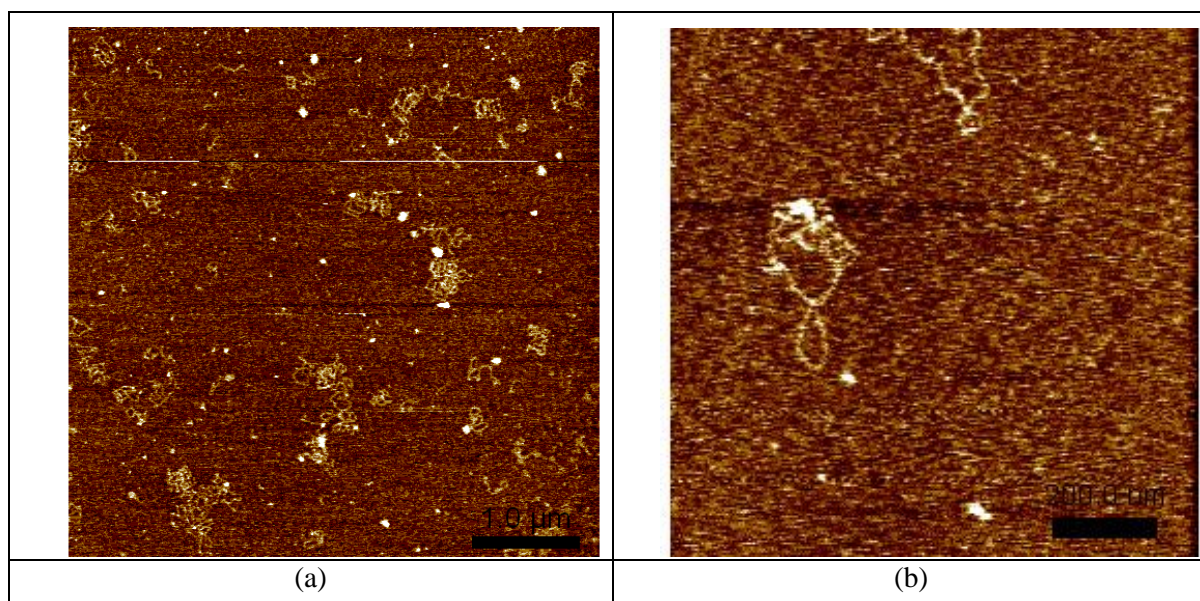


**Obr 16.:** *Typický AFM scan adsorbované DNA na slídovém povrchu metodou modifikace slídového povrchu bivalentními kationty  $Mg^{2+}$ , pracovní roztok DNA: 1  $\mu g/ml$  DNA v 10mM TRIS 5mM  $MgCl_2$ , zobrazovací režim tapping, kanál: height; hrot TAP-150 (BRUKER), rychlost skenování 0,2Hz.; (a) skenovaná oblast 5x5  $\mu m^2$  (b) zoom 1x1  $\mu m^2$ .*

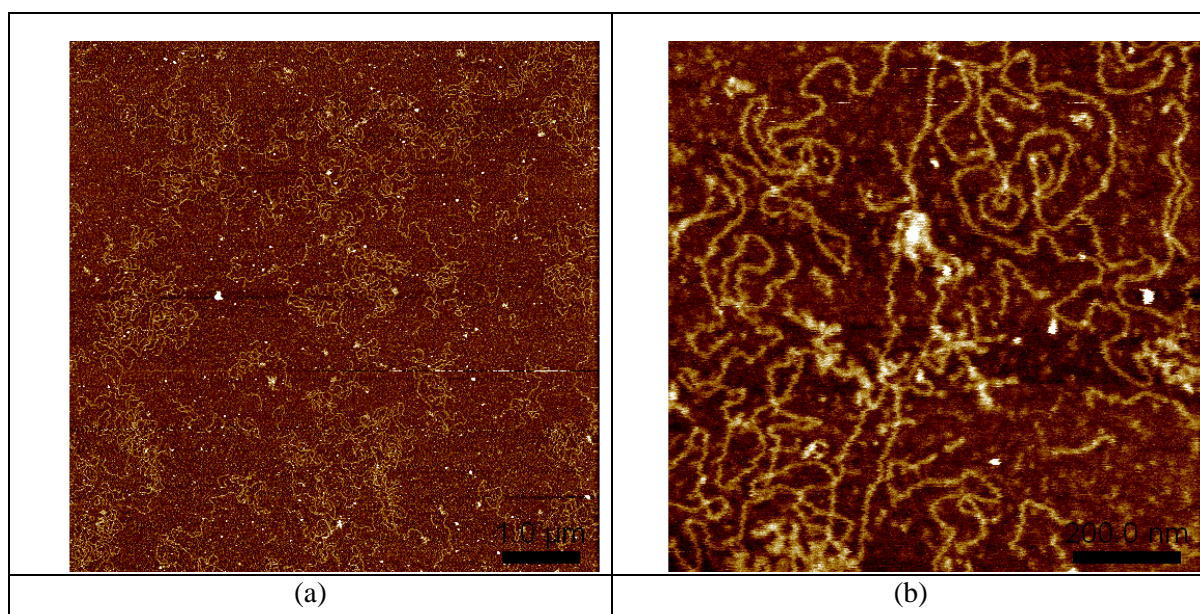
Imobilizace TRIS –  $MgCl_2$  nevedla k reprodukovatelnému uchycení molekul DNA. Zpravidla nebylo možno v obrazu rozlišit NK nebo byl počet uchycených NK minimální (**obr. 16**). Imobilizace DNA z TRIS –  $NiCl_2$  taktéž zřídka vedla k úspěšnému AFM zobrazení nukleových kyselin (**obr. 17**) - ať už v tapping nebo ScanAsyst zobrazovacím režimu.

Imobilizace HEPES –  $NiCl_2$  byla reprodukovatelně zavedena v širokém rozsahu koncentrace bivalentních kationtů (1 $\mu M$  – 5 $\mu M$ ) (**obr. 18** až **obr. 22**). Použití HEPES pufru (testované koncentrace 5mM, 10mM, 20mM, 40mM) v kombinaci s nikelnými kationty je ověřená a reprodukovatelná metoda imobilizace nukleových kyselin prostřednictvím bivalentních kationtů.

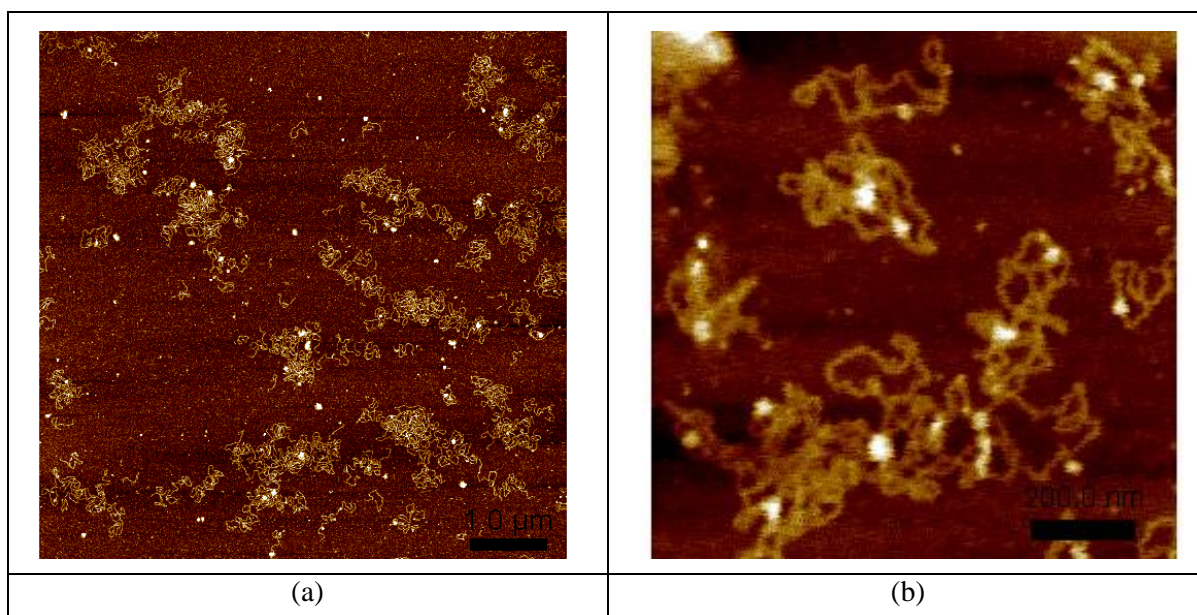
Po zavedení metodiky uchycení DNA bylo optimalizováno množství použité DNA v imobilizačním kroku. Při vyšších koncentracích byl pozorován jev desorpce DNA či výskyt síťovaných struktur, vytvořených z vláken DNA (**obr. 21**).



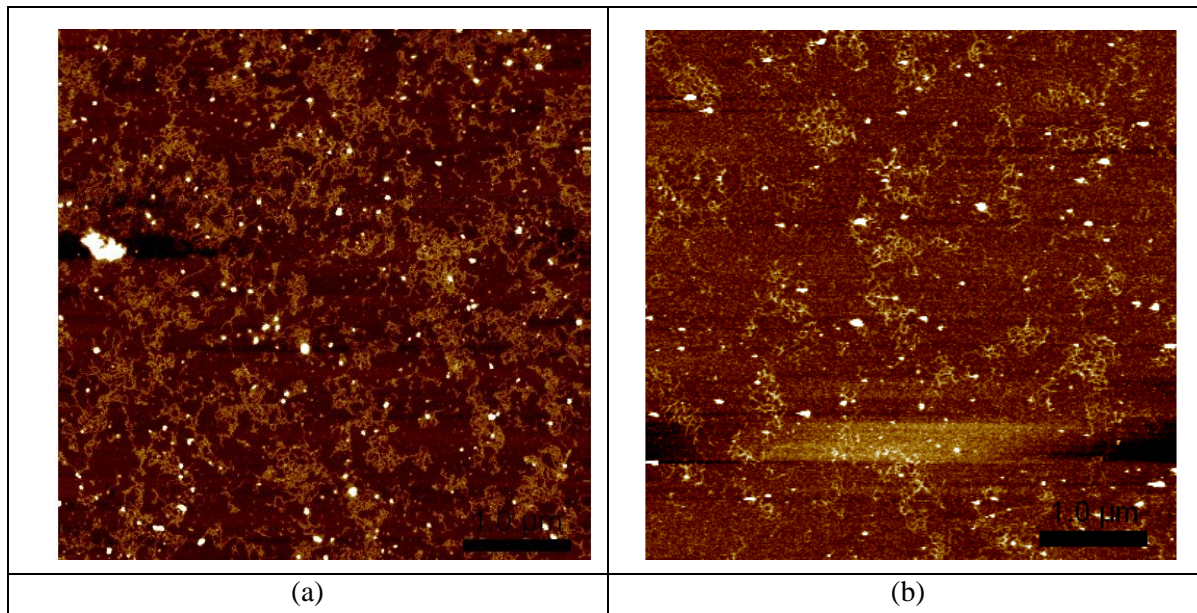
**Obr 17.:** Typický AFM scan adsorbované DNA na slidovém povrchu metodou modifikace slidového povrchu bivalentními kationty  $Ni^{2+}$ , pracovní roztok DNA: 1  $\mu\text{g/ml}$  DNA v 10mM TRIS 5mM  $NiCl_2$ , zobrazovací režim tapping, kanál: height; hrot TAP-150 (BRUKER), rychlost skenování 0,2Hz, (a) skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  (b) zoom  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ .



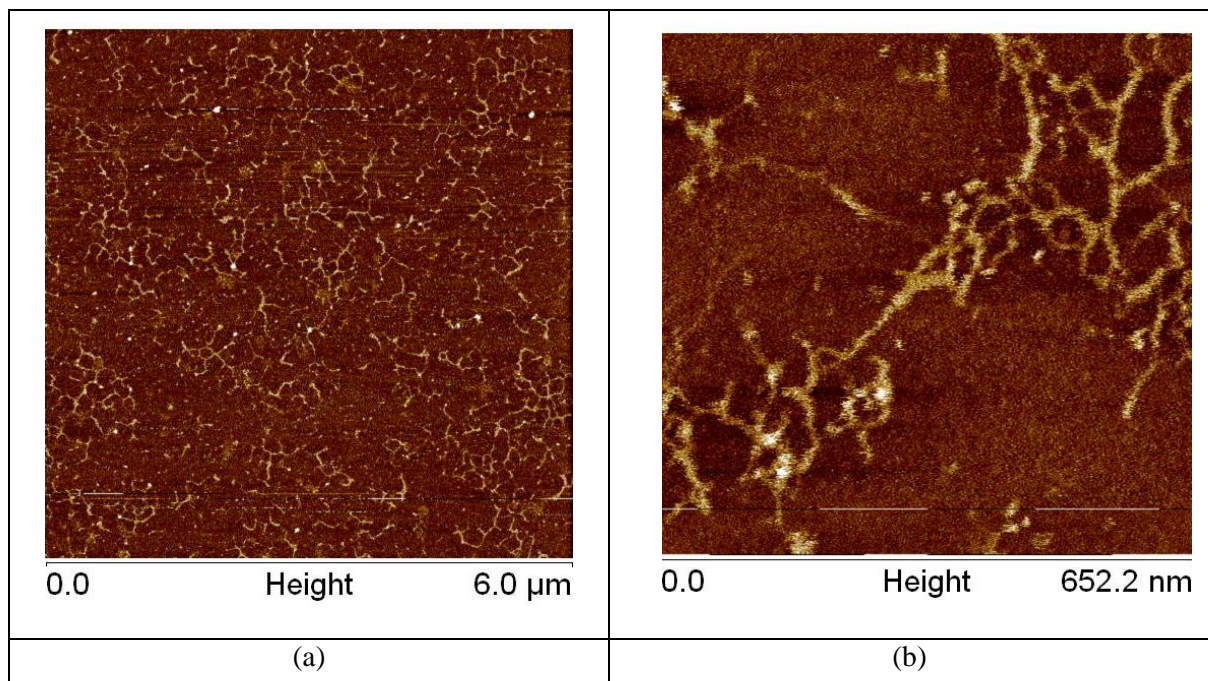
**Obr 18.:** Typický AFM scan adsorbované DNA na slidovém povrchu metodou modifikace slidového povrchu bivalentními kationty  $Ni^{2+}$ , pracovní roztok DNA: 1  $\mu\text{g/ml}$  DNA v 20mM HEPES 5mM  $NiCl_2$  pH 7,8, zobrazovací režim tapping, kanál: height; hrot TAP-150 (BRUKER), rychlost skenování 0,2Hz, (a) skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  (b) zoom  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ .



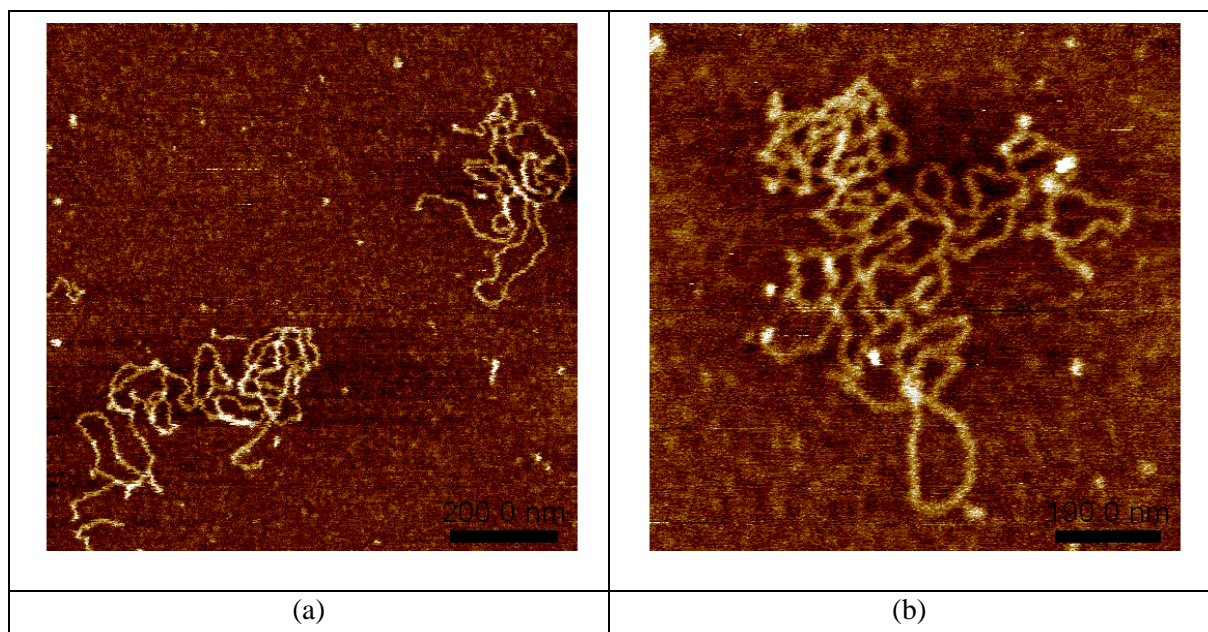
**Obr 19.:** Typický AFM scan adsorbované DNA na slídovém povrchu metodou modifikace slídového povrchu bivalentními kationty  $\text{Ni}^{2+}$ , pracovní roztok DNA: 1  $\mu\text{g/ml}$  DNA v 20mM HEPES 10mM  $\text{NiCl}_2$ , hrot ScanAsyst air (BRUKER), rychlost skenování 0,2Hz, skenovaná oblast 5x5 $\mu\text{m}^2$  (a) zobrazovací režim Tapping, (b) zobrazovací režim ScanAsyst.



**Obr 20.:** Typický AFM scan adsorbované DNA na slídovém povrchu metodou modifikace slídového povrchu bivalentními kationty  $\text{Ni}^{2+}$ , pracovní roztok DNA: 1  $\mu\text{g/ml}$  DNA v 20mM HEPES 1mM  $\text{NiCl}_2$ , zobrazovací režim ScanAsyst, kanál: height; hrot ScanAsyst (BRUKER), rychlost skenování 0,2Hz, (a) skenovaná oblast 5x5  $\mu\text{m}^2$  (b) zoom 1x1  $\mu\text{m}^2$ .



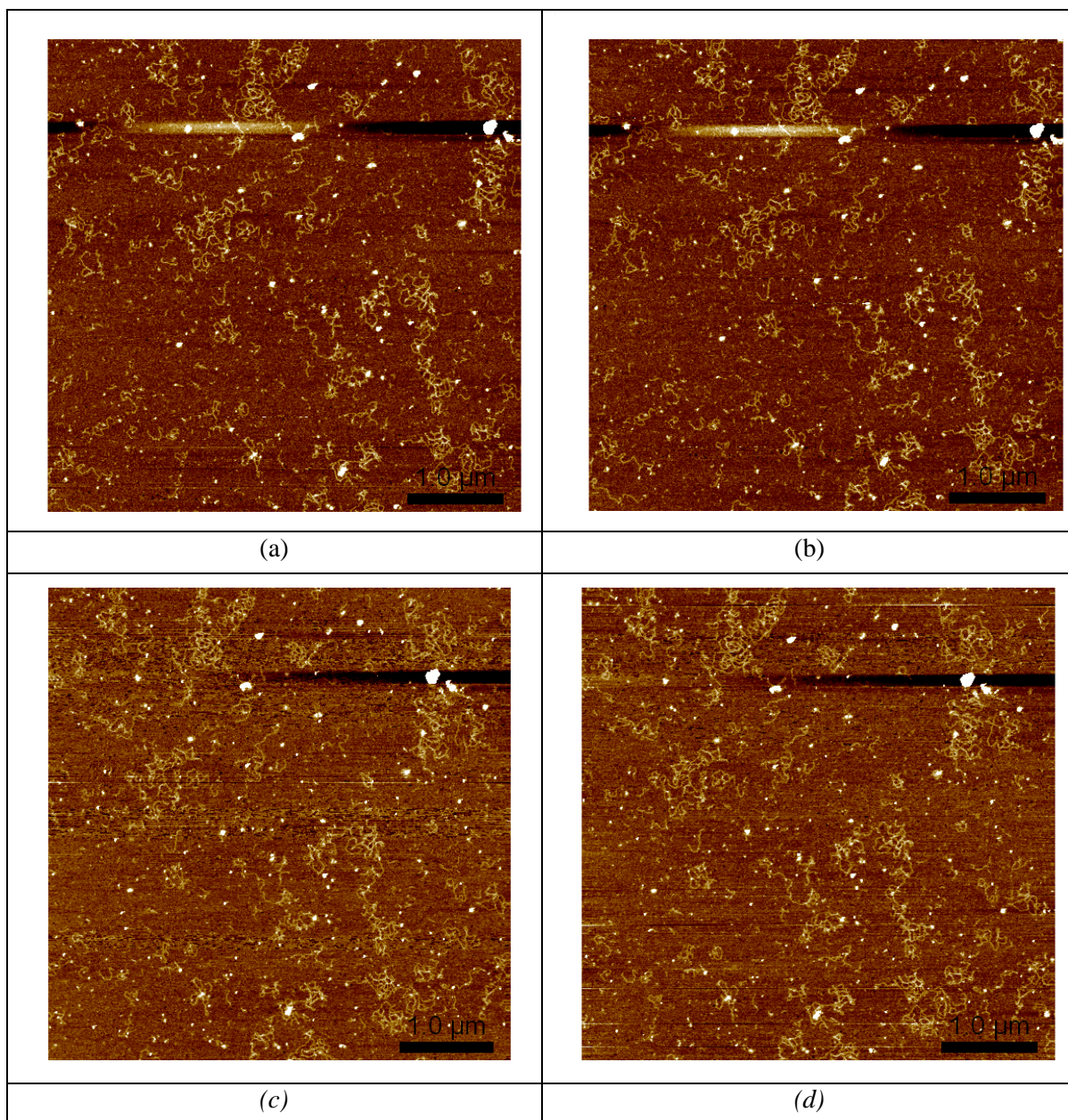
**Obr 21.:** AFM scan adsorbované DNA koncentrace DNA 20µg/ml, (a) skenovaná oblast 6x6 µm<sup>2</sup>, (b) skenovaná oblast 0,6x0,6 µm<sup>2</sup>.



**Obr 22.:** AFM scan jednotlivých smyček DNA immobilizované bivalentními kationty Ni<sup>2+</sup>, pracovní roztok DNA: 1 µg/ml DNA v 20mM HEPES 2 mM NiCl<sub>2</sub>, zobrazovací režim tapping, hrot ScanAsyst air (BRUKER), rychlost skenování 0,2Hz, skenovaná oblast (a) 1x1 µm<sup>2</sup>.(b)0,5x0,5 µm<sup>2</sup>

V topografii DNA je možno sledovat detailní strukturu vlákna (viz **obr. 22**), změny v konformaci po přidání interkalátorů, zejména stupeň kondenzace či nadšroubovicového vinutí.

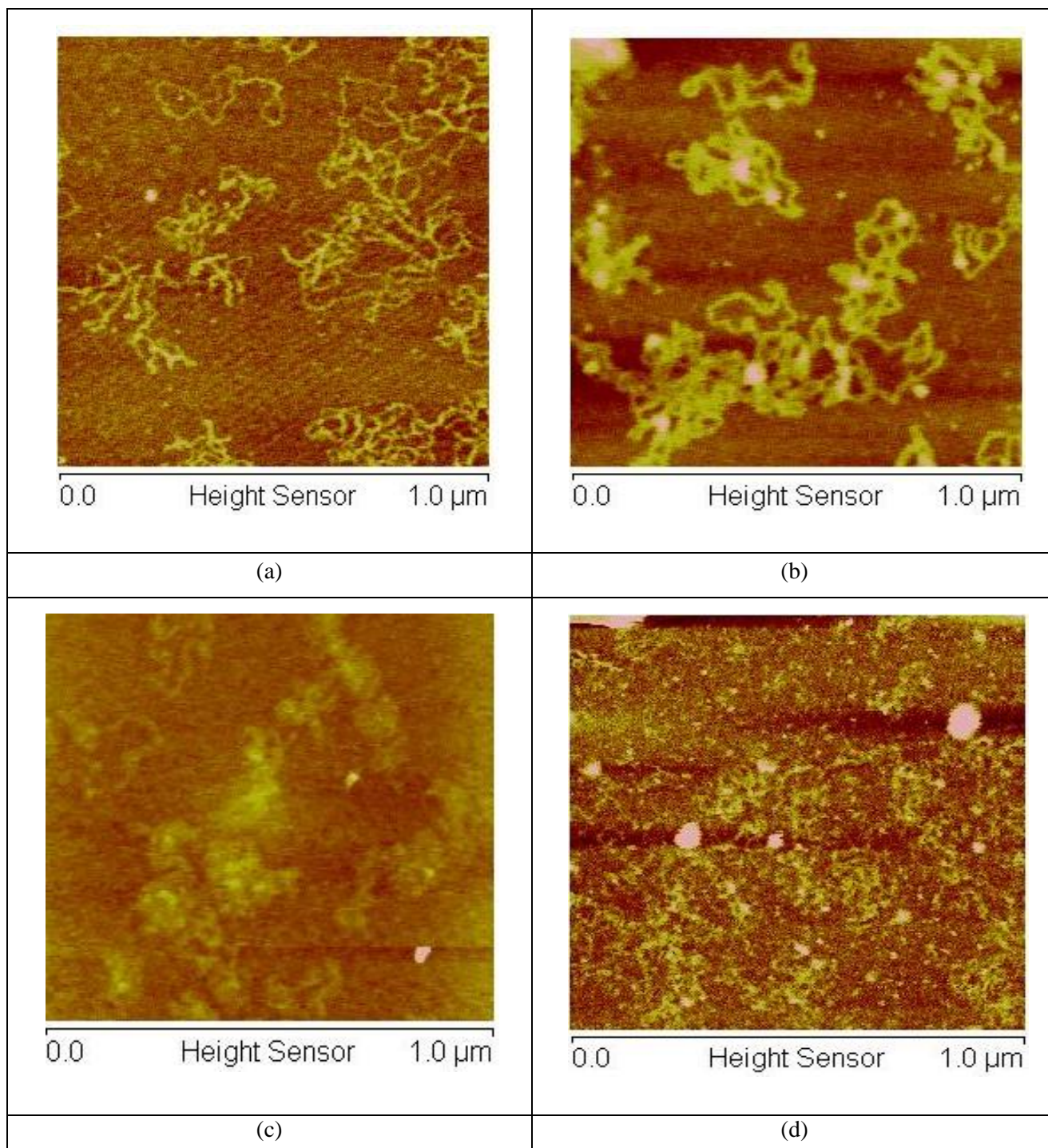




**Obr 23.:** Opakovaný AFM scan téže oblasti s adsorbovanou DNA bivalentními kationty  $\text{Ni}^{2+}$ , pracovní roztok DNA: 1  $\mu\text{g/ml}$  DNA v 20mM HEPES 2mM  $\text{NiCl}_2$ , zobrazovací režim tapping, hrot ScanAsyst air (BRUKER), rychlost skenování 0,2Hz, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , (a) první sken ( $t=0$ ) (b) desátý sken ( $t=2,5\text{h}$ ) (c) třicátý sken ( $t=7,5\text{h}$ ) (d) čtyřicátý sken ( $t=10\text{h}$ ) téže oblasti.

Imobilizace prostřednictvím nikelnatých kationtů umožňuje dlouhodobé opakované skenování téhož místa bez znehodnocení studovaného vzorku (viz **obr. 23**).

## Imobilizace prostřednictvím APTES a APDMES



**Obr 24.:** Typický AFM scan adsorbované DNA na slídovém povrchu metodou modifikace silany :  
(a) metoda A 1- napařovací nanosení APTES, skenovaná oblast 1x1μm<sup>2</sup>  
(b) metoda A2 – napařovací nanosení APDMES, skenovaná oblast 1x1μm<sup>2</sup>  
(c) metoda C1 – modifikace APTES v nepolárním rozpouštědle – bezvodý toluen, oblast 1x1μm<sup>2</sup>  
(d) metoda C2 – modifikace APTES v nepolárním rozpouštědle – aceton, skenovaná oblast 1x1μm<sup>2</sup>

## Syntéza APS – schéma realizovaných reakcí

Uspořádání a schéma realizovaných syntéz APS je shrnuto přehledně v **tab. 1**, s vyznačením délky syntézy (druhý sloupec), vstupního poměru reaktantů (třetí sloupec), přítomnosti či nepřítomnosti katalytického množství sodíku (cca 20 g – 25 g, čtvrtý sloupec) a se zaznačením výsledného množství produktu, jeho násobku vůči teoretickému výtěžku a odchylkou (poslední tři sloupce).

Označení produktu	Délka syntézy [h]	Poměr reaktantů (APTES : triethanolamin)	Přítomnost Na v reakci	množství produktu [mg]	Násobek max. výtěžku	Odchylka od maximálního výtěžku (%)
<b>APS<sub>2h-1:1,5-sNa</sub></b>	<b>2</b>	<b>01:01,5</b>	<b>ano</b>	<b>3922</b>	<b>1,6876</b>	<b>68,76</b>
APS <sub>2h-1:1-sNa</sub>	2	1:01	ano	2541	1,0934	9,34
APS <sub>2h-1,5:1-sNa</sub>	2	1,5:1	ano	2604	1,1205	12,05
<b>APS<sub>4h-1:1,5-bezNa</sub></b>	<b>4</b>	<b>01:01,5</b>	bez Na	<b>3938</b>	<b>1,6944</b>	<b>69,44</b>
<b>APS<sub>4h-1:1-bezNa</sub></b>	<b>4</b>	<b>1:01</b>	<b>bez Na</b>	<b>2256</b>	<b>0,9707</b>	<b>-3</b>
APS <sub>4h-1,5:1-bezNa</sub>	4	1,5:1	bez Na	3567	1,5349	53,49
<b>APS<sub>6h-1:1,5-bezNa</sub></b>	<b>6</b>	<b>01:01,5</b>	<b>bez Na</b>	<b>4022</b>	<b>1,7306</b>	<b>73,06</b>
APS <sub>6h-1:1-bezNa</sub>	6	1:01	bez Na	2697	1,1605	16,05
APS <sub>6h-1,5:1-bezNa</sub>	6	1,5:1	bez Na	2803	1,2061	20,61
<b>APS<sub>6h-1:1,5-sNa</sub></b>	<b>6</b>	<b>01:01,5</b>	<b>ano</b>	<b>4026</b>	<b>1,7324</b>	<b>73,24</b>
<b>APS<sub>6h-1:1-sNa</sub></b>	<b>6</b>	<b>1:01</b>	<b>ano</b>	<b>2444</b>	<b>1,0515</b>	<b>5,15</b>
APS <sub>6h-1,5:1-sNa</sub>	6	1,5:1	ano	2518	1,0834	8,34

**Tab. 1:** Schéma realizovaných syntéz APS, včetně molárního poměru vstupních reaktantů, množství získaného produktu a jeho odchylka od maximálního výtěžku reakce.

## Kontaktní úhel silanizovaných povrchů

Chemická modifikace slídového povrchu alkylsilany vede k významnému zvýšení hydrofobicity původně silně hydrofilní slídy, která vykazuje čerstvě po odštípnutí hodnoty statického kontaktního úhlu  $\theta_{app} < 4^\circ$ , zejména z důvodu volného propylového řetězce a těsného uspořádání vzniklé vrstvy. Malý interval rozptylu hodnot  $\theta_{app}$  pak naznačuje vznik uniformního filmu na povrchu slídy.

Podle očekávání APDMES modifikované slídy vykazovaly vždy nejvyšší hodnoty kontaktního úhlu  $\theta_{app}$ , a to intervalu hodnot  $<55^\circ, 60^\circ>$  v závislosti na použité šarži APDMES, délce trvání silanizace a zejména časovém intervalu od uplynutí silanizace do proměření kontaktního úhlu (vliv tzv. *aging*, stárnutí vlivem adsorbovaných nečistot a případného přeuspořádání molekul či uvolnění alkylového řetězce ve vrstvě). Oproti tomu slídy modifikované APTES v polárním (B) a nepolárním rozpouštědle (C1 a C2) vykazovaly stále velkou hydrofilnost, tedy nízké hodnoty kontaktního úhlu;  $\theta_{app} < 20^\circ$ .

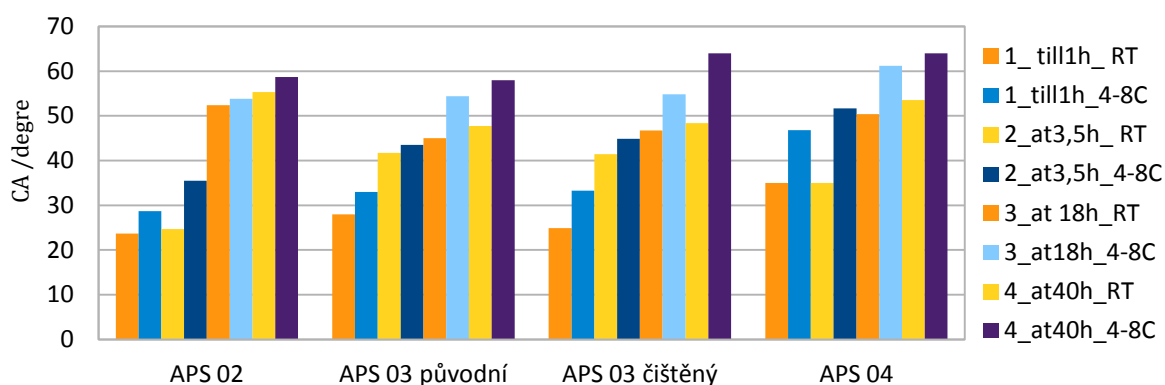
Při srovnání s APTMS- modifikovaným povrchem vykazovaly APS modifikované slídy sice nižší hodnoty kontaktního úhlu, kvalita povrchu (hodnoty *Rms*, viz dále) však byla zachována. Kontaktní úhel slídy modifikované při pokojové teplotě APS-A (syntéza APS dle metody A) vykazoval hodnoty  $\theta_{app} = 33^\circ \pm 5^\circ$ ; slídy modifikované při pokojové teplotě APS-B (syntéza APS dle metody B) vykazovaly hodnoty v širokém rozptylu v závislosti na typu použitého produktu, zejména na molární poměr vstupních reaktantů,  $\theta_{app} \in <18^\circ, 35^\circ>$ . Nejvyšší hodnoty vykazující zároveň nízký rozptyl hodnot byly dosaženy pro produkty s ekvimolárním poměrem vstupních reaktantů:  $\text{APS}_{2\text{h}1:1\text{sNa}}$ ,  $\theta_{app} = 34,5^\circ \pm 3,3^\circ$ ;  $\text{APS}_{6\text{h}1:1\text{bezNa}}$ ,  $\theta_{app} = 32,6^\circ \pm 2,9^\circ$ ;  $\text{APS}_{6\text{h}1:1\text{sNa}}$ ,  $\theta_{app} = 21,5^\circ \pm 1,5^\circ$ . Při poměru reaktantů 1,5:1 (přebytek APMS) či 1:1,5 (přebytek triethanolaminu) hodnoty kontaktního úhlu nabývaly významně nižších hodnot,  $\theta_{app} \in <18^\circ, 28^\circ>$  s širokým rozptylem.

Zároveň bylo během proměrování kontaktního úhlu zjištěno, že slídy modifikované při pokojové teplotě vykazovaly zřetelně nižší hodnoty kontaktního úhlu oproti slídám modifikovaným tímž silanizačním činidlem při  $4^\circ\text{C} - 8^\circ\text{C}$ , viz **graf. č. 1**.

Při proměrování hodnot kontaktního úhlu byl také sledován vliv stárnutí silanizovaných vrstev vlivem adsorpce nečistot či přeuspořádáním v silanové vrstvě na povrchu slídy - viz **tab 2**, a **obr. 24 a 25**, shrnující vývoj hodnot kontaktního úhlu v čase u jednotlivých APS slíd (APS – syntéza B).

Ačkoliv k nárůstu hodnot kontaktního úhlu dochází převážně z důvodu adsorpce prachových mikročástic z okolního prostředí během manipulace se vzorkem v průběhu vlastního měření, z našich výsledků nepřímo také vyplývá, že nárůst  $\theta_{app}$  může být také způsoben přeuspořádáním silanových molekul ve vytvořené vrstvě, zejména s ohledem na možné uvolnění propylového řetězce (Crampton et al., 2005; W. Wang & Vaughn, 2008). Svou roli při změně hodnot kontaktního úhlu v čase může hrát také opakované smáčení povrchu při probíhajícím měření, čímž může dojít ke změně povrchové chemie a tím i proměřovaného kontaktního úhlu (Kwok et al., 1997).

Kontaktní úhel  $\theta_{app}$  APS modifikovaných slíd: vliv teploty



**Graf 1:** Hodnoty  $\theta_{app}$  APS slíd modifikovaných různými šaržemi APS, žluté sloupce reprezentují modifikaci při RT, modré napravo pak modifikaci stejnou reagentií při 8 °C, sloupce v jedné sadě (u stejné šarže APS) reprezentují hodnoty CA proměřené v různém časovém intervalu od ukončení silanizace (1h; 3,5h; 18h; 40h).

APS02 – syntéza B, poměr reagentií 1:1,5;

APS 03 – syntéza B, 2h s Na, poměr reagentií 1:1; APS 03 – syntéza B, 2h s Na, poměr reagentií 1:1, přečištěný rozpuštěním v toluenu;

APS 04 – syntéza A

kontaktní úhel - vstupní poměr reaktantů ekvimolární ( 1:1)					
	0,5 hod	3 hod	18 hod	24 hod	48 hod
2h with Na	34,5 ± 3,3	45,4 ± 3,1	54,9 ± 2,5	57,3 ± 2,6	59,8 ± 2,0
4h without NA	18,6 ± 4,8	23,6 ± 4,7	37,8 ± 5,2	44,3 ± 4,2	52,4 ± 3,6
6h with Na	21,5 ± 1,5	28,5 ± 1,9	44,5 ± 1,3	45,2 ± 2,8	59,9 ± 2,4
6h without Na	32,6 ± 2,6	43,7 ± 2,4	53,0 ± 2,2	53,3 ± 3,2	58,3 ± 3,9
kontrola - PBS	8,0 ± 1,0	10,0 ± 2,2	15,8 ± 2,0	17,4 ± 2,2	22,0 ± 2,8

(a)

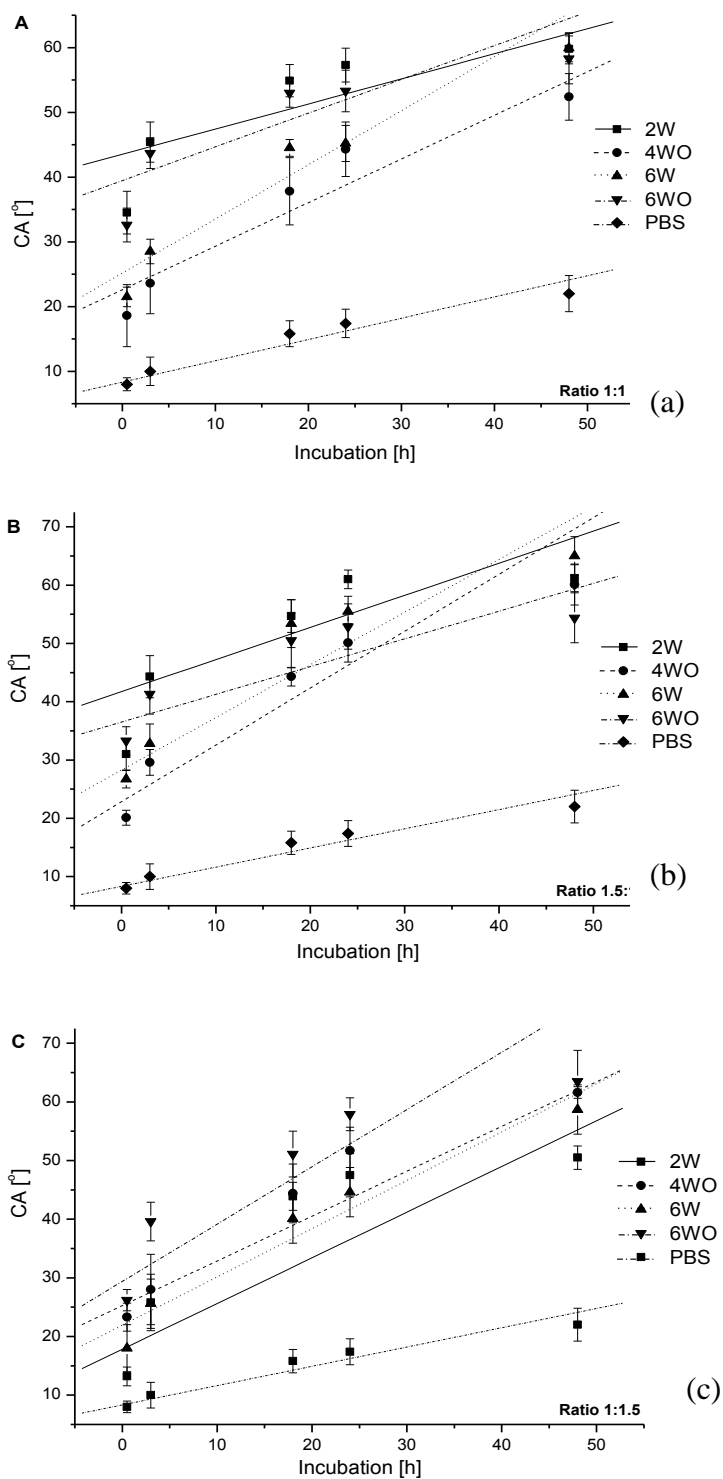
Kontaktní úhel - vstupní poměr reaktantů 1:1,5 (pro triethanolamin)					
	0,5 hod	3 hod	18 hod	24 hod	48 hod
2h with Na	13,2 ± 1,6	25,8 ± 4,8	43,9 ± 2,4	47,5 ± 3,7	50,5 ± 2,0
4h without NA	23,3 ± 2,4	28,0 ± 6,0	44,4 ± 5,0	51,7 ± 4,0	61,6 ± 1,0
6h with Na	18,0 ± 4,0	25,6 ± 4,2	40,1 ± 4,2	44,6 ± 4,2	58,7 ± 4,2
6h without Na	26,2 ± 1,8	39,6 ± 3,3	51,1 ± 3,9	57,9 ± 2,8	63,5 ± 5,3
kontrola - PBS	8,0 ± 1,0	10,0 ± 2,2	15,8 ± 2,0	17,4 ± 2,2	22,0 ± 2,8

(b)

Kontaktní úhel - vstupní poměr reaktantů 1,5:1 (pro APTMS)					
	0,5 hod	3 hod	18 hod	24 hod	48 hod
2h with Na	31,0 ± 2,7	44,3 ± 3,6	54,7 ± 2,8	61,0 ± 1,6	61,2 ± 2,3
4h without NA	20,1 ± 1,3	29,6 ± 2,2	44,3 ± 1,6	50,1 ± 3,3	60,1 ± 3,5
6h with Na	26,7 ± 1,5	32,8 ± 3,4	53,4 ± 4,1	55,5 ± 2,6	65,0 ± 3,3
6h without Na	33,3 ± 2,4	41,3 ± 3,4	50,5 ± 4,7	52,9 ± 3,9	54,4 ± 4,3
kontrola	8,0 ± 1,0	10,0 ± 2,2	15,8 ± 2,0	17,4 ± 2,2	22,0 ± 2,8

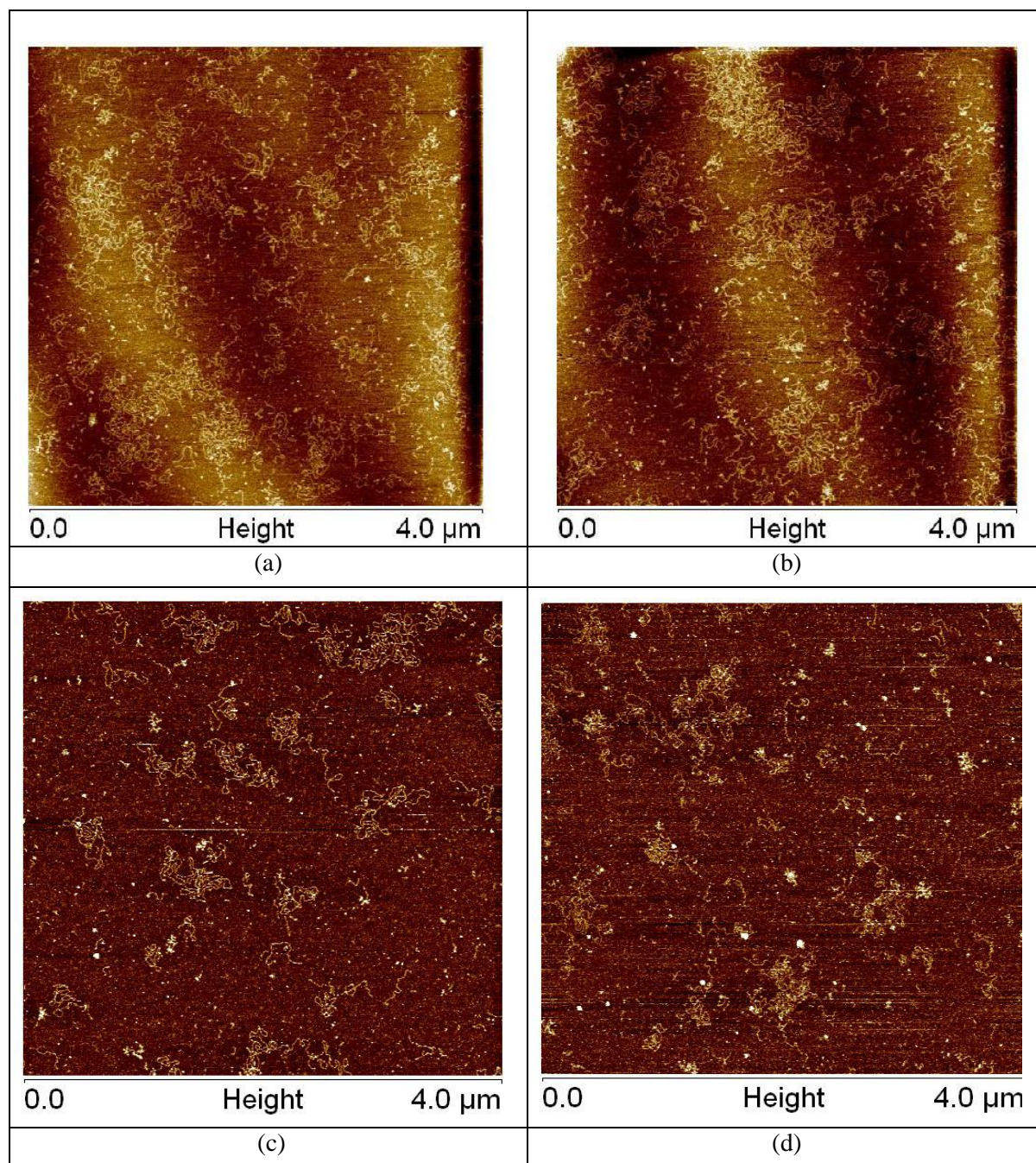
(c)

**Tab. 2:** Vývoj hodnot  $\theta_{app}$  v čase u slíd modifikovaných produkty APS syntéz (syntéza B - kinetický proces, 80 °C, produkty bez přečištění, proměnný poměr vstupních reaktantů), (a) ekvimolární poměr, (b) přebytek triethanolaminu, (c) přebytek APTMS



**Obr 25.:** Hodnoty kontaktního úhlu APS modifikovaných slíd (syntéza B, vstupní reaktanty APTMS:triethanolaminu v různých molárních poměrech); proměřováno v časových intervalech 0 min; 3h; 18h; 24h; 48h. (a) ekvimolární poměr 1:1; (b) molární poměr 1,5:1 (přebytek triethanolaminu); (c) molární poměr 1:1,5 (přebytek APTMES).

## Syntéza APS – AFM zobrazení nukleových kyselin



**Obr 26.:** Typický AFM scan modifikované APS-slídy s adsorbovanou DNA, pracovní roztok DNA: 1 μg/ml DNA v 20mM HEPES, zobrazovací režim tapping, hrot ScanAsyst air (BRUKER), rychlost skenování 0,2Hz, skenovaná oblast 4x4 μm<sup>2</sup>, (a) modifikace APS 4h, poměr reaktantů 1:1, bez Na; (b) modifikace APS 4h, poměr reaktantů 1:1,5, bez Na; (c) modifikace APS 6h, poměr reaktantů 1,5:1; za přítomnosti Na; (d) modifikace APS 6h poměr reaktantů 1,5:1; za přítomnosti Na.

Povrchy silanizované APS vykazují značnou stálost, homogennost a hladkost a zároveň dostatečný počet volně dostupných aminoskupin na svém povrchu. Vykazují také dostatečnou odolnost při opakovaném zobrazení nukleových kyselin v kapalině.



## Syntéza APS –*Rms* modifikovaných povrchů

K porovnání kvality, co do homogenity a výškové distribuce studovaných povrchů, lze použít parametry *Rms* a *Ra*. Při interpretaci výsledků je však potřeba vzít v potaz také fakt, že v parametrech se projevuje také vliv konvoluce tvaru hrotu a výškového profilu povrchových objektů.

U čerstvě odštipnuté slídy, nevystavené žádnému působení kapaliny je *Rms* nejnižší, vykazuje hodnoty okolo 0,06 nm (ultrasharp hroty). Hodnoty *Rms* naměřené pomocí ScanAsyst hrotů vykazovaly u čerstvě odštipnuté slídy hodnoty  $0,09 \pm 0,04$  nm.

Slídy modifikované APTES – napařením (metoda A1) vykazovaly u některých měření pouze mírně zvýšenou hodnotu *Rms*  $0,21 \pm 0,8$  nm u jiných však hodnota dosáhla  $0,9 \pm 1,3$  nm. Ačkoliv by na první pohled mohla být hladkost povrchu dostatečná k uchycení a zobrazení nukleových kyselin, nebyl tento silanizovaný povrch vhodný k reprodukovatelnému zobrazení, zobrazované vlákno není možno v takto nehomogenním povrchu dostatečně rozlišit. Slídy modifikované metodou A1 často vykazovaly lokální nehomogenity a zrnečné struktury o velikosti jednotek nanometrů. Přidání zapékacího kroku dále hodnoty *Rms* zvýšilo na  $0,27 \pm 1,1$  nm, nebyl pozorován vliv zapékacího kroku na odstranění zrnitosti a lokální nehomogenity. Nukleové kyseliny se na takto modifikované slídě nepodařilo reprodukovatelně zobrazovat.

Slídy modifikované APTES v polárním rozpouštědle (metoda B) i slídy modifikované APTES v nepolárním rozpouštědle (metoda C1 a C2) vykazovaly shodně velmi nízké hodnoty *Rms* (B:  $0,20 \pm 0,10$  nm; C1:  $0,24 \pm 0,11$  nm; C2:  $0,19 \pm 0,13$  nm). AFM skeny silanizovaných povrchů však vykazovaly značně nehomogenní strukturu a nevedly k reprodukovatelnému uchycení nukleových kyselin. Aplikace zapékacího kroku oproti předpokladu zvýšila *Rms* hodnoty v řádu jednotek nm.

Slídy modifikované APS (metoda A i metoda B) vykazovaly nízké hodnoty *Rms*, řádově v desetínách nanometrů. Povrchy vykazovaly převážně reprodukovatelný, atomárně hladký povrch a byly úspěšně použity k uchycení a zobrazení nukleových kyselin. Souhrn hodnot *Rms* a *Ra* pro vybrané šarže APS, je uveden v **tab. 3**.

APS frakce*	Ra *[nm]	Rms *[nm]	APS frakce#	Ra #[nm]	Rms #[nm]
APS - Termodynamický postup, Na, 60C, 1:1, 4h	0.075	0.131	APS - Termodynamický postup, Na, 60C, 1:1, 4h	0.248	0.321
APS – kinetický postup Na, 80C, 1:1,5; 2h	0.168	0.266	APS – kinetický postup Na, 80C, 1:1,5; 2h	0.299	0.396
APS – kinetický postup, bez Na, 80C, 1:1; 4h	0.082	0.135	APS – kinetický postup, bez Na, 80C, 1:1; 4h	0.407	0.517
APS – kinetický postup, Na, 80C, 1:1,5, 6h	0.093	0.117	APS – kinetický postup, Na, 80C, 1:1,5, 6h	0.347	0.443
APS – kinetický postup, Na, 80C, 1:1,5, 6h	0.077	0.485	APS – kinetický postup, Na, 80C, 1:1,5, 6h	0.252	0.327
APS – kinetický postup, bez Na, 80C, 1:1,5, 6h	0.078	0.132	APS – kinetický postup, bez Na, 80C, 1:1,5, 6h	0.750	3.109
APS – kinetický postup, bez Na, 80C, 1,5:1; 4h	0.110	0.252	APS – kinetický postup, bez Na, 80C, 1,5:1; 4h	0.277	0.364
APS syntéza dle (Dumitriu et al., 2012)	0.095	0.222	APS syntéza dle (Dumitriu et al., 2012)	0.407	0.517
APTES	0.618	0.800	APTES	0.360	0.460

**Tab. 3:** Srovnání Rms a Ra hodnot APS silanizovaných slíd, vztaženo na  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , T03 – termodynamický postup, K- kinetický postup, # (hodnoty vlevo) – čistý produkt bez přečištění, \* (hodnoty vpravo) – produkt použit po přečištění

#### 4.4. Diskuze – zavedení a optimalizace imobilizačních metod

V této úvodní části dizertační práce byly ověřovány různé modifikační techniky vedoucí k uchycení nukleových kyselin ke slídovému povrchu prostřednictvím (a) hořečnatých a nikelnatých kationtů a prostřednictvím silanizačních činidel – APTES, APDMES a APS.

AFM měření ukázala, že oba vybrané bivalentní kationty jsou dostatečně použitelné k imobilizaci nukleových kyselin, avšak pouze nikelnaté kationty prokázaly takřka 100% úspěšnost při imobilizaci nukleových kyselin ke slídovému povrchu (Zapletalová, 2012). Ověřován byl také vliv vhodného pufrového roztoku (HEPES, TRIS, PS). Ačkoliv je imobilizace nukleových kyselin v literatuře popisována také z TRIS pufrového roztoku, např. (Y. L. Lyubchenko & Shlyakhtenko, 1997), úspěšnost a zejména reprodukovatelnost použití jiného než HEPES pufru nebyla na pracovišti Ústavu lékařské biofyziky ověřena, což je ve shodě např. s (Bezanilla et al., 1994). Taktéž imobilizace nukleových kyselin z fosfátového pufru nevedla k reprodukovatelnosti imobilizačního procesu prostřednictvím bivalentních kationtů.

Oproti tomu imobilizace z HEPES – NiCl<sub>2</sub> byla ověřena a reprodukovatelně zavedena v širokém rozsahu koncentrace kationtů (1mM až 5mM) a použitého pufrového roztoku (testované koncentrace 5mM, 10mM, 20mM a 40mM HEPES). Nukleové kyseliny imobilizované nikelnatými kationty lze zobrazit metodou AFM po dobu až deseti dní od imobilizace při uchování vzorku v evakuovaném exikátoru. Bylo ověřeno, že při imobilizační metody prostřednictvím HEPES-NiCl<sub>2</sub> je možno reprodukovatelně a opakovaně zobrazovat adsorbovanou nukleovou kyselinu bez porušení struktury, pohybu či posunu vlákna, jež vede k rozmazání AFM obrazu (při vhodném a citlivém nastavení AFM systému).

Také kombinace HEPES pufru s hořečnatými kationty vedla k imobilizaci NK a úspěšnému zobrazení nukleových kyselin, avšak kvalita a reprodukovatelnost této metody byla o poznání slabší než v případě nikelnatých kationtů. Zejména při opakovaném skenování docházelo k uvolnění a pohybu nukleové kyseliny, což znemožňovalo kvalitní AFM zobrazení.

Z AFM měření imobilizované NK dále vyplynulo, že vyšší koncentrace iontů vede zřejmě ke stáčení DNA, jejímu zkondenzování a tím i desorpci ze slídového povrchu. Naše AFM měření také naznačují, že přítomnost monovalentních iontů v pufru či v elučním roztoku při izolaci NK snižuje vazbu DNA na slídový povrch, což je ve shodě např. s (Bezanilla et al 1995). Co se koncentrace použité DNA týče, na základě vlastních měření bylo

vyhodnoceno optimální rozmezí 0,1mg - 5mg DNA/ml. Bylo ověřeno, že při vyšších koncentracích tvoří molekuly DNA zpravidla nepravidelnou síť, ve které již nejsou jednotlivé molekuly rozlišeny. Podobné zkušenosti byly publikovány např. v (Zhiguo Liu et al., 2005). Při nižších koncentracích DNA pak nedochází k uchycení dostatečného počtu DNA vláken a AFM snímání je neefektivní.

Vedle imobilizační techniky vedoucí k uchycení DNA prostřednictvím bivalentních kationtů byla na Ústavu lékařské biofyziky také ověřována metodika imobilizace prostřednictvím alkoxyilanů, a to v širokém spektru nanášecích technik – metoda napařením, silanizací v polárním či organickém rozpouštědle za použití různých silanizačních činidel - komerční APTES, APDMES a vlastní syntetizovaný APS.

Při modifikaci **APDMES** (metoda A2) se jako klíčové jevílo precizní udržení bezvodého prostředí v exikátoru a dostatečná evakuace exikátoru rotační vývěvou (10Pa vakuum po dobu 2 až 3 hod). Při dodržení těchto podmínek vede uvedená metodika k vytvoření kvalitní reprodukovatelné monovrstvy silanu na slídovém povrchu. Takto modifikovaný povrch vykazuje značně hydrofóbní vlastnosti,  $\theta_{app}$  v intervalu  $\langle 55^\circ, 60^\circ \rangle$ . Vytvořená monovrstva silanu je dostatečně pevná a stabilní, a to i při opakovaném AFM skenování. Vrstva APDMES molekul získaná za použití slabšího vakua je méně stabilní a je možno ji odstranit při oplachování/sušení vzorku či narušit během skenování, kontaktní úhel je v tomto případě nižší a vykazuje širší rozptyl hodnot. Při opakovaném dlouhodobém AFM skenování (řádově desítky hodin) vykazuje APDMES vrstva častou formaci lokálně zdrsňených oblastí, znemožňujících další zobrazení uchycených NK.

Modifikace napařením APTES molekulami (A1) nevedla k reprodukovatelné imobilizaci NK, a to ani při zachování inertní atmosféry a přidání bazického katalyzátoru. Možným vysvětlením může být již již částečně hydrolyzovaný APTES či slabé vakuum (vytvořené za pomoci vodní vývěvy). Některé šarže silanizovaných povrchů vykazovaly žádané vlastnosti a byly schopné uchytit nukleové kyseliny, jiné však (o to výrazně častěji) vykazovaly na AFM skenech četnou přítomnost oligomerů či obecně polymerů a příčné zesíťování v rámci APTES vrstvy, které výrazně zhoršilo povrchovou hladkost silanizovaného povrchu a znemožňovalo reprodukovatelné zobrazení případné uchycené DNA. Z dostupné literatury vyplývá, že právě přítomnost vzdušné vlhkosti (během chystání vzorku či při nedostatečné evakuaci exikátoru) by mohla hrát klíčovou roli při nekvalitní silanizaci modifikovaného slídového povrchu (Crampton et al., 2005, 2006; Ebner et al., 2007; Salmio & Brühwiler, 2007; Zhu et al., 2012).

Povrchy slídy silanizované **APTES** z vodné fáze (metoda B) a v nepolárním rozpouštědle (metody C1 a C2) vykazovaly znaky silanizovaného povrchu – tedy mírný nárůst

kontaktního úhlu při nanášení vzorku a nízké hodnoty *Rms* skenovaných povrchů, avšak AFM skeny ukázaly, že takto modifikované slídy nevykazují dostatečně homogenní povrch, častý byl výskyt lokálních vad a strukturních nerovností, na modifikovaném slídivém povrchu nebyly reprodukovatelně uchyceny a zobrazeny molekuly nukleových kyselin. Příčinou nestejných výsledků silanizačních technik B, C1 a C2 by mohla být opět částečná hydrolyza APTES činidla, resp. absence redestilačního kroku u použitého APTES. Přítomnost vody (i v podobě vzdušné vlhkosti) vede k hydrolyze silně hygroskopického silanu a zapříčiňuje vzájemné provázání a polymeraci APTES molekul (Salmio & Brühwiler, 2007), což by mohla být jedna z příčin nedostatečně homogenně silanizovaných povrchů.

Použití zapékacího kroku u technik A1, B a C1, C2 oproti původním předpokladům (Crampton et al., 2005) zvýšilo drsnost studovaných povrchů a nevedlo ke sjednocení silanizované vrstvy a snížení lokálních defektů ve vytvořené silanové vrstvě. Povrchy vykazovaly široké spektrum *Rms* hodnot. Zobrazovány byly téměř hladké povrchy s *Rms* řádově desetin nm, zároveň však byly často přítomny povrchy značně nehomogenní s různě velkými strukturami o rozměrech v jednotkách až desítkách nanometrů.

Protože **APS**, aminopropyltriethoxysilatran, je komerčně nedostupné silanizační činidlo, byly nejprve testovány metody syntézy APS. Z různých variant byla vybrána termodynamická a kinetická cesta a optimalizovány podmínky reakce (teplota, tlak, přítomnost katalyzátoru a způsoby přečištění) tak, aby získaný produkt obsahoval minimální množství zpolymerizovaných bočních produktů a jeho použití vedlo k reprodukovatelnému zavedení AFM modifikačního protokolu, vedoucího k uchycení DNA a následnému AFM zobrazení

Při syntéze APS bylo zjištěno, že podmínka ekvimolárního průběhu reaktantů není v praxi realizována. V ideálním předpokladu reaguje vždy jedna molekula APTMS s jednou molekulou triethanolaminu za vzniku APS a přebytečný methanol a APTMS je na vakuové odparce dokonale odstraněn. Vyšší reálné množství produktu oproti teoretické hodnotě (viz [tab. č. 2](#)) prokázalo, že vznikají polymery, tedy ekvimolární předpoklad není realizován a v praxi jedna molekula triethanolaminu reaguje až se třemi molekulami APTMS a naopak jedna molekula APTMS až se třemi molekulami triethanolaminu. Vznik polymerů během syntézy je evidentně ovlivněn přebytkem jednoho z reaktantů, zejména při poměru 1:1,5 ve prospěch triethanolaminu. Na základě srovnání všech syntéz lze konstatovat, že přítomnost katalytického množství  $\text{Na}^{2+}$  nemá vliv na výtěžek, ani na průběh reakce. Jako nejoptimálnější se jeví syntéza produktu,  $\text{APS}_{4\text{h-1:1-bezNa}}$  a  $\text{APS}_{6\text{h-1:1-sNa}}$ , v tabulce zvýrazněno žlutě.

V průběhu syntéz a následného použití APS v modifikačním procesu slídových povrchů bylo zjištěno, že produkt syntézy lze přečistit rozpuštěním v toluenu, čímž dojde k odstranění nerozpustných vstupních reaktantů. Následnou krystalizací byl získán přečištěný produkt bez oligomerů. Produkty APS syntézy před a po přečištění byly srovnány a jejich vhodnost pro AFM imobilizaci NK byla ověřována. Na základě hmotnostní spektrometrie a AFM analýzy (*Rms* hodnoty) bylo ověřeno, že v přečištěném produktu došlo k výraznému snížení výskytu dimerů, což vedlo k reprodukovatelnému zobrazení DNA metodou AFM (Zapletalová H. et al., 2016).

## 5. Experimentální část II - studium toxicity vybraných fotosyntetizérů vlivem PDT

### 5.1. Materiál – studium toxicity vybraných fotosyntetizérů vlivem PDT

#### Buněčná linie

Ke studiu fotodynamického působení byla vybrána **buněčná linie MCF - 7**, odvozená od adenokarcinomu prsu, se kterou pracoviště lékařské biofyziky dlouhodobě pracuje. Ačkoliv je tato buněčná linie známá potlačenou expresí kaspázy-3 (Mooney et al., 2002; Whitacre et al., 2002), vykazuje zároveň typické morfologické rysy apoptózy včetně apoptotické štěpení DNA po vystavení apoptotickému agens (Liang, Y. et al., 2001; Mc Gee et al., 2002) - ať už z důvodu zvýšené aktivity kaspázy-7 (Semenov et al., 2004), kaspázy-8 (Tang et al., 2000), endonukleázy G (van Loo et al., 2002) či uvolněním AIF z mitochondriální membrány (Furre, I.E. et al., 2006).

Buňky linie MCF-7 byly kultivovány v DMEM médiu, doplněném o 10% fetální telecí sérum, streptomycin (0,1 g/l), penicilin (0,1 g/l) a L-glutamin (0,3 g/l). Inkubace buněk probíhala v CO<sub>2</sub> inkubátoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Před ozáření byly buňky po dobu 24h inkubovány v DMEM médiu s daným senzitizerem o potřebné koncentraci. Taktéž po fotodynamickém působení byly buňky dále ponechány po potřebnou dobu v termostatu převrstvené DMEM médiem. Od vystavení buněk přítomnosti fotosenzitizeru byly tyto buňky (jako i vyzolovaná DNA) důsledně drženy ve tmě.

#### Pomůcky a přístroje

LED zářiče o vlnové délce 414 nm a 660 nm, CO<sub>2</sub> inkubátor, laminární box, elektroforetická vana a zdroj pro elektroforézu jednotlivých buněk (BIORAD), elektroforetická vana a zdroj pro standartní agarózovou elektroforézu DNA (BIORAD), nano-drop – spektrofotometrický přístroj ke stanovení koncentrace DNA, Fluorescenční mikroskop IX, softwarový program Comet Score, Mikroskop atomárních sil BIOSCOPE CATALYST (Bruker) s programem NanoScope 1.5.

#### Chemikálie

##### PUFROVÉ ROZTOKY

PBS pH 7,4 (NaOH) (10xPBS: 80gNaCl, 2gKCl, 14,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O, 2,6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> na 1l H<sub>2</sub>O)

HEPES 40mM, pH 7,6,      HEPES 20mM 2 $\mu$ M NiCl<sub>2</sub> , pH 7,6

### **ELEKTROFORETICKÉ ROZTOKY**

Lyzační roztok: 146,1g NaCl; 29,23g EDTA; 1,21g Tris na 1l destilované H<sub>2</sub>O; pH 10 (NaOH)

ELFO alkalický roztok: 24g NaOH; 0,584g EDTA na 2l destilované H<sub>2</sub>O

Neutralizační roztok: 48,46g Tris na 1l destilované H<sub>2</sub>O; pH 7,5

TE pufr: 1M Tris-Hcl (pH 8,0) 1ml + 0,5M EDTA (pH 8,0) 0,2ml doplnit DW do 100ml, uchovávat zamražené při -20 °C v alikvótech.

TBE pufr (5x): 56g Tris báze, 27,5g kyseliny borité, 20ml 0,5M EDTA (pH 8,0) rozpustit v 600ml DW, doplnit pod 1l DW a upravit pH (NaOH), ředění 10x na pracovní roztok.

Nanášecí pufr (6x): 4 mg bromfenolová modř, 250mg ficoll rozpustit v 10ml DW, rozdělit na alikvóty po 10ml a uchovat při 4 °C.

### **MÉDIA**

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10% FBS, 1% penicilin, streptomycin a glutamin (Sigma Aldridge)

FBS (fetal bovine serum) – 5% FBS v PBS

### **FOTOSENZITIZÉRY**

Studován byl vliv dvou senzitizerů: TMPyP a ClAlPcS<sub>2</sub>.

**TMPyP:**  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)pyridinium-p-toluensulfonát,  $\lambda_{\max} = 422$  nm, sledované koncentrace fotosenzitizeru: 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, kontrola 0 $\mu$ M, ozáření plošným LED zářičem o  $\lambda = 414$  nm (FWHM), 10 mW/cm<sup>2</sup>, aplikovaná hustota energie: 1 J/cm<sup>2</sup>.

**ClAlPcS<sub>2</sub>:** chloroaluminium phtalocanin disulfonát,  $\lambda_{\max} = 670$  nm, sledované koncentrace: 0,2 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, kontrola 0 $\mu$ M, ozáření LED zářičem o  $\lambda = 660$  nm (FWHM), 10mW/cm<sup>2</sup>, aplikovaná hustota energie: 5J/cm<sup>2</sup>.

Koncentrace senzitizerů a hustota energie světelného záření vyvolaná LED ozařovačem byly vybrány na základě MTT testu buněčné viability, resp. hodnot IC<sub>50</sub> z předchozí studie. IC<sub>50</sub> MTT testu odpovídá koncentraci 5  $\mu$ M TMPyP při ozáření 1J/cm<sup>2</sup> a 1 $\mu$ M ClAlPcS<sub>2</sub> při ozáření 5J/cm<sup>2</sup>, měřeno 24h po ozáření.



## OSTATNÍ

SYBR Green – 20µg/ml v destilované H<sub>2</sub>O

standardní kit pro izolaci genomické DNA (Norgen, kit cat. no 24700)

Ethanol 96% pro UV

Deionizovaná voda, HMP agaróza, LMP agaróza, podložní a krycí skla,

## 5.2. Metodika – studium toxicity vybraných fotosyntetizérů vlivem PDT

### Fotodynamické působení

Ověřovaný TMPyP – hydrofilní a kationický 5,1,15,20tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)21H,23H-porphyrin, preferenčně se vyskytující po vstřebání buňkou v lysozomech. PDT prostřednictvím produkce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a singletního kyslíku indukuje relokaci veškerého TMPyP do jádra (Patito et al., 2001). Zde se TMPyP váže s vazebným místem přednostně v malém žlábků DNA přes poly guanin-cytosinové nukleotidy či vazbou na fosfátovou kostru DNA molekuly (Saeko Tada-Oikawa, 2009)<sup>1</sup>. TMPyP způsobuje přímo štěpení DNA vlivem ROS (Bruce Armitage, 1998; Mettath et al., 1999), konkrétně prostřednictvím produkce kyslíkového radikálu <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a zároveň své silné afinity k nukleovým kyselinám. Zdá se, že TMPyP v kombinaci s ozářením vhodné vlnové délky vykazuje silný genotoxický účinek, selektivní vůči nádorovým buňkám, nevztahující se na normální epiteliální buňky (Vrouenraets et al., 2000).

Lokalizace druhého ověřovaného PS - CIAIPcS<sub>2</sub> - je primárně v mitochondriích, a to u širokého spektra testovaných buněk, včetně MCF – 7 buněčných liniích (El-Hussein et al., 2012)<sup>2</sup>. Největší ROS produkce po PDT se tedy vyskytuje v mitochondriích a je doprovázena zvýšenou propustností membrány, její následnou depolarizací a uvolněním

---

<sup>1</sup> Metodika: studované buňky HL-40 (leukemické), koncentrace 100 µM TMPyP, ozáření 10W lampou,  $\lambda_{\max}=365\text{nm}$ , hustota energie 0,5 J/cm<sup>2</sup>, vzdálenost 10 cm od zdroje, po ozáření buňky ponechány 18 h a vyhodnocovány fluorescenčně a elektroforeticky (Saeko Tada-Oikawa, 2009).

<sup>2</sup> Metodika: studované buňky A549, MCF7, SNO, koncentrace PS: 10 µM, 8 µM a 2 µM CIAIPcS<sub>2</sub>., 24h uptake PS, poté hustota energie při  $\lambda_{\text{exc}}=636\text{nm}$  (laser), 10 J/cm<sup>2</sup>.

cytochromu C, což zpravidla spouští apoptotický/nekrotický proces v buňce. Intracelulární produkce ROS vede ke zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  které indukuje produkci RNS.

Aplikovaná koncentrace dvou vybraných senzitivizérů TMPyP a CIAIPcS<sub>2</sub> a hustota energie byly vybrány s přihlédnutím k dynamice fotodynamického procesu a apoptotických projevů (Nonaka et al., 2010; Saeko Tada-Oikawa, 2009) a na základě výsledků MTT testu buněčné viability (Pížová Klára, 2015). Hodnota IC<sub>50</sub> měřená v naší laboratoři standardním protokolem MTT testu odpovídá koncentraci 5  $\mu\text{M}$  TMPyP při hustotě energie 1J/cm<sup>2</sup>, resp. koncentraci 1  $\mu\text{M}$  CIAIPcS<sub>2</sub> při hustotě energie 5J/cm<sup>2</sup>.

Pro každý typ senzitivizéru byly stanoveny tyto experimentální skupiny: K1 - kontrolní buňky inkubované s daným senzitivizérem o příslušné koncentraci (avšak bez ozáření); K2 - kontrolní buňky bez inkubace se senzitivizérem, vystavené příslušné hustotě energie a tři sady PDT – experimentálních buněk, které byly inkubovány 24 h se senzitivizérem o studované koncentraci a poté vystavené světelnému záření dané vlnové délky - 1  $\mu\text{M}$  TMPyP, 5  $\mu\text{M}$  TMPyP, 50  $\mu\text{M}$  TMPyP; hustota energie 1J/cm<sup>2</sup> při  $\lambda = 414 \text{ nm}$ ; 0,2  $\mu\text{M}$  CIAIPcS<sub>2</sub>, 1  $\mu\text{M}$  CIAIPcS<sub>2</sub> a 10  $\mu\text{M}$  CIAIPcS<sub>2</sub>; hustota energie 5J/cm<sup>2</sup> při  $\lambda = 660 \text{ nm}$ .

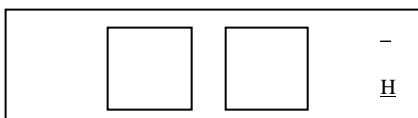
Buňky byly kultivovány v 96 jamkových deskách, 50 000buněk/jamku, 3 jamky použity pro jeden analyzovaný vzorek metodou kometové analýzy. 24 hodin před ozáření byly buňky inkubovány v DMEM médiu obohaceném o senzitivizér požadované koncentrace. Těsně před ozáření byly buňky promyty a převrstveny PBS médiem pro minimalizaci absorpce záření v původním DMEM. Po ozáření (K2 a experimentální skupiny) byly testované skupiny buněk opět převrstveny DMEM médiem (bez senzitivizéru) a ponechány inkubovat v termostatu po dobu 4h a 6h ke studiu rozvoje oxidačního stresu v důsledku PDT a případného apoptotického procesu. Kontrolní (K1) buňky byly kultivovány na individuální kultivační desce a drženy po celou dobu ve tmě. Experimentální buňky a K2 buňky byly drženy do doby ozáření (a v čase po ozáření do dalšího zpracování) ve tmě (překryty aluminiovou fólií).

### **Kometový test**

Po inkubaci 4 resp. 6 hodin po ozáření byly buňky promyty PBS a trypsinizovány. Buněčný pelet v množství 25  $\mu\text{l}$  se supernatantem (centrifugace 1500 rpm po dobu 3 min při 7 °C) byl poté promíchán s LMP a nanesen na agarózou (HMP v PBS) potažené podložní sklíčko a překryt krycím sklíčkem a ponechán zatuhnout (min 15 min, 7 °C).

Příprava skel před nanesením buněčného peletu: po potažení celého podložního sklíčka první vrstvou 1% agarózy rozpuštěné v deionizované vodě (DW, *deionised water*), (HMP

agarosa, Serva), byla na potažená sklička nanášena druhá vrstva 1% agarózy (HMP, Serva), tentokrát však byla agaróza rozpuštěna v PBS a nanášena na sklo pouze lokálně. Po nanášení byla agaróza ihned překryta krycím sklíčkem pro vytvoření jednoho pole pro nanášení vzorku. Proces nanášení vzorku byl duplikován, čímž na jednom podložním sklíčku vznikla dvě místa pro nanášení buněčné suspenze, viz **obr. 27**.



**Obr 27.:** Schéma uspořádání nanášeného vzorku pro comet assay.

Po zatuhnutí nanášené buněčné suspenze v agaróze byla odstraněna krycí sklíčka a skla se vzorky byla ponechána inkubovat v lyzačním roztoku (1hodina v lednici). Poté byla skla se vzorky přemístěna do elektroforetické vany a proběhla elektroforéza jednotlivých buněk: aplikovaný proud v rozsahu 350mA - 400mA, napětí 20V, trvání elektroforézy: 20 min. Po proběhnutí elektroforézy byla skla neutralizována v neutralizačním roztoku ( 3x po 5 min, třepačka) a ponechána uschnout (8C, bez krycích skel). Po obarvení byly na optickém mikroskopu OLYMPUS IX 81 nafoceny jednotlivé buňky s obarvenou DNA (10x zvětšení). Snímky byly vyhodnoceny v programu *comet score*. Vyhodnocována byla tři nezávislá měření, v každém měření proběhla analýza testovaných buněk v opakovaném dubletu pro dostatečně velký statistický vzorek dat.

### Izolace DNA po PDT

DNA byla izolována z buněk vystavených fotodynamickému působení standardizovaným kitem pro izolaci genomické DNA na iontoměničích (NORGEN BIOTEK, kit cat no 24700). Buňky byly opět ponechány inkubovat 4h resp. 6h od ozáření v termostatu. Po uplynutí doby inkubace byly studované vzorky buněk tripsinizovány a DNA byla z buněk vyizolována standardní procedurou izolačního protokolu. DNA byla dále použita k následné elektroforéze nebo byla zamražena (aliquóty 5 $\mu$ g/ml DNA v 40mM HEPES, 10mM MgCl<sub>2</sub>, pH7,6) k následné AFM analýze.

### Analýza DNA gelovou elektroforézou

Gelová elektroforéza bez zakoncentrování vzorku: 1,5% agarózový gel (1,5 g agarózy / 100ml 0,5xTBE pufru), nanášeno 20 $\mu$ l vzorku DNA ve směsi se 4 $\mu$ l 6x koncentrovaného nanášecího pufru, vloženo napětí: 80V / 60 minut, barvení v roztoku ethidium bromidu po dobu 30 minut.

Pro zakoncentrování izolované DNA bylo použito 100 $\mu$ l vzorku DNA, doplněné o 100 $\mu$ l TE pufru, 20 $\mu$ l 3M octanu sodného a 550 $\mu$ l 96% ethanolu pro UV, následovalo vysrážení DNA při teplotě - 20°C po dobu 1 hodiny, centrifugace (15 000 ot./ 15 minut) a usušení sedimentu. DNA byla resuspendována v 25 $\mu$ l TE pufru při laboratorní teplotě do druhého dne.

### **Analýza DNA AFM zobrazením**

DNA v 20mM HEPES byla přidána k 2 $\mu$ M NiCl<sub>2</sub> , konečná koncentrace 0,5 $\mu$ g/ml a ponechána inkubovat na čerstvě odštípnutém slídovém povrchu 10 min (RT). Poté byly slídové disky opláchnuty, osušeny a použity k AFM zobrazení. V některých experimentech byl k imobilizaci použit APS modifikovaný slídový povrch.

AFM snímky byly zobrazeny v režimu tapping na vzduchu, za použití RTESPA hrotů s rezonanční frekvencí cca 300kHz a konstantou tuhosti 40N/m. Skenované oblasti měly zpravidla velikost 1x1 $\mu$ m<sup>2</sup> až 5x5  $\mu$ m<sup>2</sup>, detaily byly pořízeny z oblasti 300x300nm<sup>2</sup> – 500x500 nm<sup>2</sup>. Veškeré AFM publikované snímky byly softwarově proloženy rovinou druhého řádu.

### 5.3. Výsledky – studium toxicity vybraných fotosenzitizérů vlivem PDT

Navržené experimenty byly zaměřeny na studium genotoxicity dvou odlišných fotosenzitizérů (TMPyP, ClAlPcS<sub>2</sub>) na buněčné linii MCF-7. Dílčím zájmem bylo vyhodnocení případné míry apoptotického poškození vlivem PDT na základě srovnání výsledků z gelové elektroforézy, kometové analýzy a AFM vizualizace jednotlivých molekul DNA.

#### Výsledky – izolace DNA (studium cytotoxicity)

doba izolace DNA od ozáření	koncentrace senzitizeru	typ senzitizeru	hustota energie	výtěžnost DNA	čistota DNA	
					A 260/280	A 260/230
4 h po ozáření	0 μM	TMPyP	1 J/cm <sup>2</sup>	97 ng/ μM	1,96	1,32
4 h po ozáření	1 μM	TMPyP	1 J/cm <sup>2</sup>	112 ng/ μM	1,98	1,68
4 h po ozáření	5 μM	TMPyP	1 J/cm <sup>2</sup>	32 ng/ μM	1,86	1,40
4 h po ozáření	50 μM	TMPyP	1 J/cm <sup>2</sup>	5 ng/ μM	1,70	0,07
6 h po ozáření	50 μM	TMPyP	0 J/cm <sup>2</sup>	130 ng/ μM	1,97	1,63
6 h po ozáření	0 μM	TMPyP	1 J/cm <sup>2</sup>	111 ng/ μM	1,99	1,86
6 h po ozáření	1 μM	TMPyP	1 J/cm <sup>2</sup>	112 ng/ μM	1,95	1,17
6 h po ozáření	5 μM	TMPyP	1 J/cm <sup>2</sup>	10 ng/ μM	1,58	0,28
6 h po ozáření	50 μM	TMPyP	1 J/cm <sup>2</sup>	6 ng/ μM	1,90	0,07

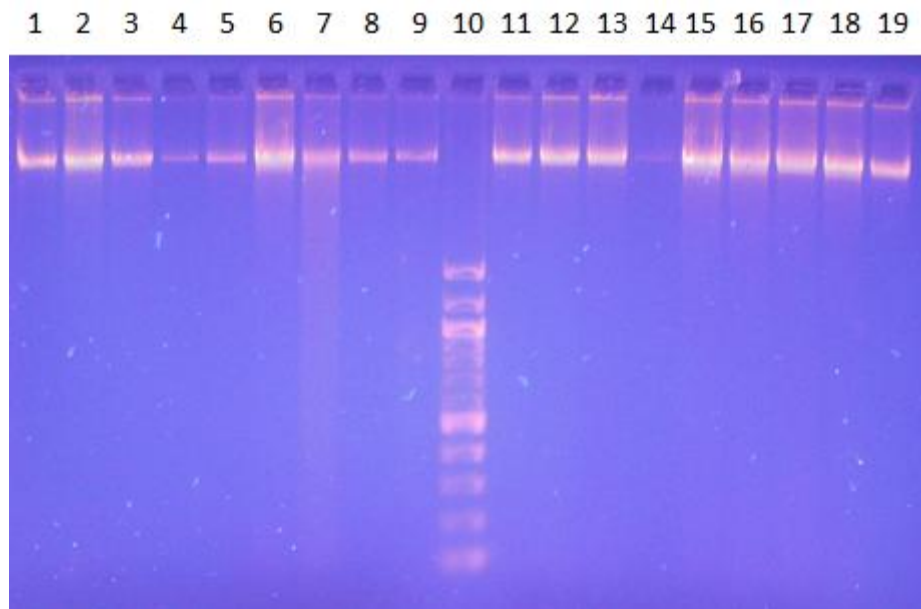
**Tab. 4 :** Výtěžek a čistota vyizolované DNA po fotodynamickém působení, senzitizer TMPyP.

doba izolace DNA od ozáření	koncentrace senzitizeru	typ senzitizeru	Hustota energie	výtěžnost DNA	čistota DNA	
					A 260/280	A 260/230
4 h po ozáření	0,2 μM	ClAlPcS <sub>2</sub>	5 J/cm <sup>2</sup>	86 ng/ μM	1,99	1,57
4 h po ozáření	1 μM	ClAlPcS <sub>2</sub>	5 J/cm <sup>2</sup>	62 ng/ μM	1,97	1,67
4 h po ozáření	10 μM	ClAlPcS <sub>2</sub>	5 J/cm <sup>2</sup>	3 ng/ μM	1,35	0,19
6 h po ozáření	10 μM	ClAlPcS <sub>2</sub>	0 J/cm <sup>2</sup>	70 ng/ μM	1,95	0,91
6 h po ozáření	0 μM	ClAlPcS <sub>2</sub>	5 J/cm <sup>2</sup>	135 ng/ μM	1,99	1,74
6 h po ozáření	0,2 μM	ClAlPcS <sub>2</sub>	5 J/cm <sup>2</sup>	146 ng/ μM	2,00	1,92
6 h po ozáření	1 μM	ClAlPcS <sub>2</sub>	5 J/cm <sup>2</sup>	10 ng/ μM	1,97	1,22
6 h po ozáření	10 μM	ClAlPcS <sub>2</sub>	5 J/cm <sup>2</sup>	6 ng/ μM	1,73	0,34

**Tab. 5 :** Výtěžek a čistota vyizolované DNA po fotodynamickém působení, senzitizer ClAlPcS<sub>2</sub>.

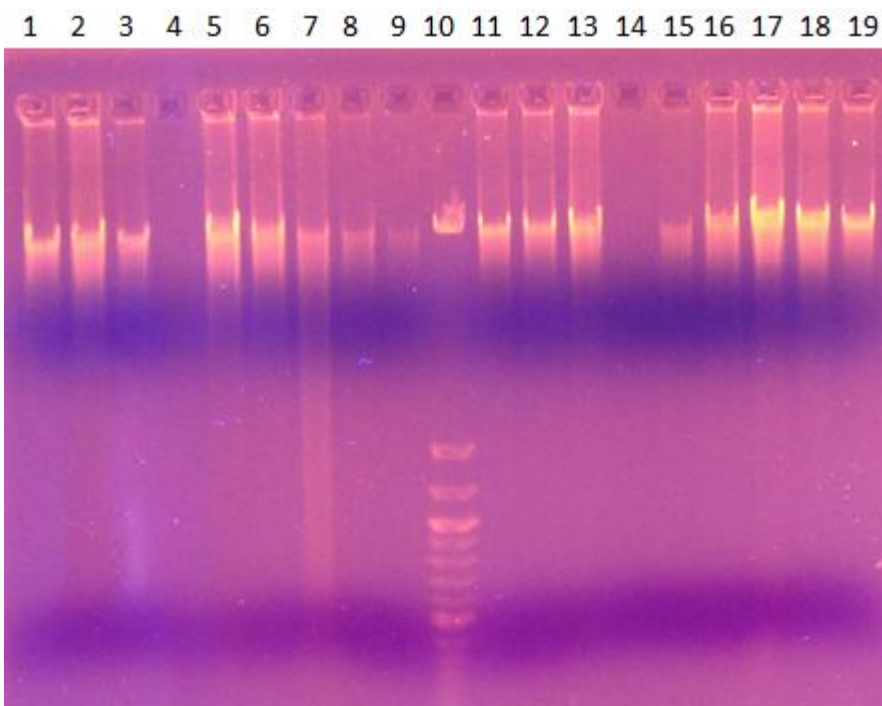
DNA vyzolovaná standartním izolačním kitem byla dále použita ke studiu poškození metodou AFM a gelové elektroforézy.

### Výsledky – gelová elektroforéza (studium cytotoxicity)



**Obr 28.:** Agarózová gelová elektroforéza DNA fragmentace - bez zakoncentrování. PDT působení vlivem PS TMPyP a ClAlPcS<sub>2</sub>, schéma nanesení:

- (1) kontrola K2 – 0  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 8,2 ng/ml
- (2) 1  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 12,6 ng/ml
- (3) 5  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 6,2 ng/ml
- (4) 50  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 2,0 ng/ml
- (5) K1 - 50  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 0  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 6,2 ng/ml
- (6) 0  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 14,6, ng/ml
- (7) 1  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 9,3 ng/ml
- (8) 5  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 2,0 ng/ml
- (9) 50  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 5,6 ng/ml
- (10) žebříček 100 - 1500 bp,
- (11) kontrola K2 - 0  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 7,9 ng/ml
- (12) 0,2  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 9,2 ng/ml
- (13) 1  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 9,3 ng/ml
- (14) 10  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 1 ng/ml
- (15) K1 – 10  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 0  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 12,6 ng/ml
- (16) kontrola K2 - 0  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 16,7 ng/ml
- (17) 0,2  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 15,3 ng/ml
- (18) 1  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 13,0 ng/ml
- (19) 10  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 6,7 ng/ml



**Obr 29.:** Agarózová gelová elektroforéza DNA po zakoncentrování vzorku. PDT působení vlivem PS TMPyP a ClAlPcS<sub>2</sub>, schéma nanesení:

- (1) kontrola K2 - 0  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 14,2 ng/ml
- (2) 0,2  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 16,0 ng/ml
- (3) 1  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 19,2 ng/ml
- (4) 10  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 0,8 ng/ml
- (5) kontrola K1 - 10  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 0 J/cm<sup>2</sup> izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 20 ng/ml
- (6) kontrola K2 - 0  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 22,2 ng/ml
- (7) 1  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 26,6 ng/ml
- (8) 5  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA 9,0 ng/ml
- (9) 50  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 4 h po PDT, koncentrace DNA -5,2 ng/ml
- (10) žebříček 100 bp – fragmenty 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp
- (11) kontrola K2 - 0  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 30,3 ng/ml
- (12) 0,2  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 42,6 ng/ml
- (13) 1  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 25,4 ng/ml
- (14) 10  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 8,6 ng/ml
- (15) kontrola K1 - 50  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 0 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 1,7 ng/ml
- (16) 0  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 24,3 ng/ml
- (17) 1  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 19,4 ng/ml
- (18) 5  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA 0,1 ng/ml
- (19) 50  $\mu\text{M}$  TMPyP, hustota energie 1 J/cm<sup>2</sup>, izolace DNA 6 h po PDT, koncentrace DNA -3,8 ng/ml

## Výsledky – kometová analýza (studium cytotoxicity)

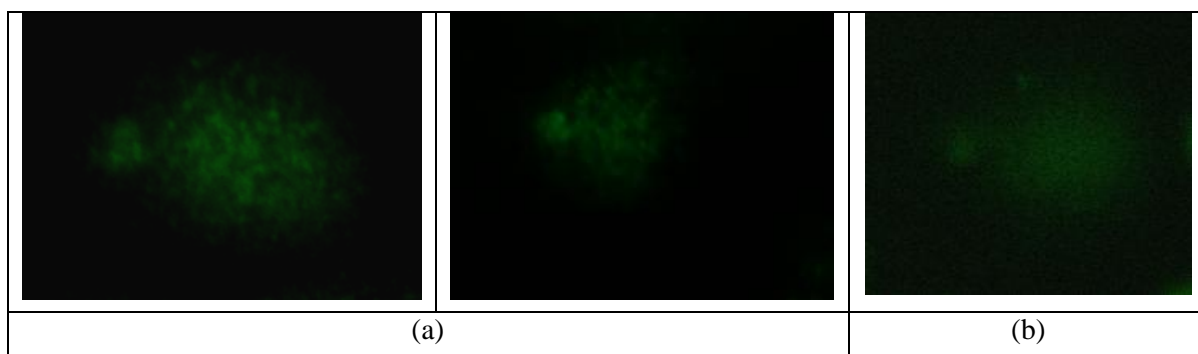
Při kometovém testu bylo sledováno chování jaderné DNA během elektroforézy v alkalickém prostředí. Do saturačního stavu platí úměra, že čím větší je poškození DNA (počet dvouvláknových zlomů), tím je větší migrace DNA během elektroforézy. Stupeň fragmentace DNA v jednotlivých buňkách byl kvantifikován pomocí obrazové analýzy programem COMET SCORE a popsán prostřednictvím vybraných parametrů: *% head DNA* (*% tail DNA*), *comet length*, *tail length* a *olive tail moment*.

- *% tail DNA* (*% head DNA*) - procentuální zastoupení DNA v ohonu (v hlavě). Tento parametr je nejméně ovlivnitelný vnějšími faktory, má rozsah 0-100%, je nejpoužívanějším a nejvíce reprodukovatelným markerem při srovnání výsledků mezi různými laboratořemi (Kumaravel et Jha 2006).
- *tail length* - délka ohonu je dobrým parametrem hodnotícím poškození DNA. Je důležité vzít v potaz, že od určité hranice – množství poškozujícího agens – dojde k ustálení migrace DNA v určité vzdálenosti, a proto je tento parametr užitečný pouze pro nízkou úroveň poškození (Olive 2002).
- *tail moment* – definován jako součin mezi *% tail DNA* a *tail length*, tedy procenta DNA v ohonu násobená délkou ohonu.
- *olive tail moment* – definován jako součin mezi *% tail DNA* a (*tail mean X* – *head mean X*), tedy procenta DNA v ohonu násobená vzdáleností mezi těžišti DNA v ohonu a hlavě komety. Protože tento parametr není měřen ve standartizovaných jednotkách, mohou různé programy analýzy obrazu udávat různé hodnoty (Kumaravel et Jha 2006), také saturace DNA barvivem může ovlivnit hodnoty tohoto markeru, proto je obtížné porovnávat tento parametr u výsledků z různých laboratoří.

Při hodnocení CA je třeba vzít v potaz roli fáze buněčného cyklu, ve které se buňka v okamžiku lyze nacházela a také vlastní omezení metody. V S-fázi obsahují buňky replikační struktury, jejichž odpověď na poškození je jiná, než u nereplikující DNA. Při alkalické CA se pak tyto replikační struktury chovají jako SBS a vykazují falešně pozitivní příspěvek k migraci DNA.

Dále jsou značně diskutovány komety s vějířovitě rozšířeným ocasem a neznatelným jádrem, tzv. ghosts. Někteří autoři tyto komety považují za znak apoptotického procesu (viz **obr. 30**), kdy vysoce fragmentovaná DNA již vymigrovala vlivem napětí z jádra (není viditelná) a detekovatelný je pouze slabý vějířovitě rozšířený „ocas“. (Morley et al., 2006).

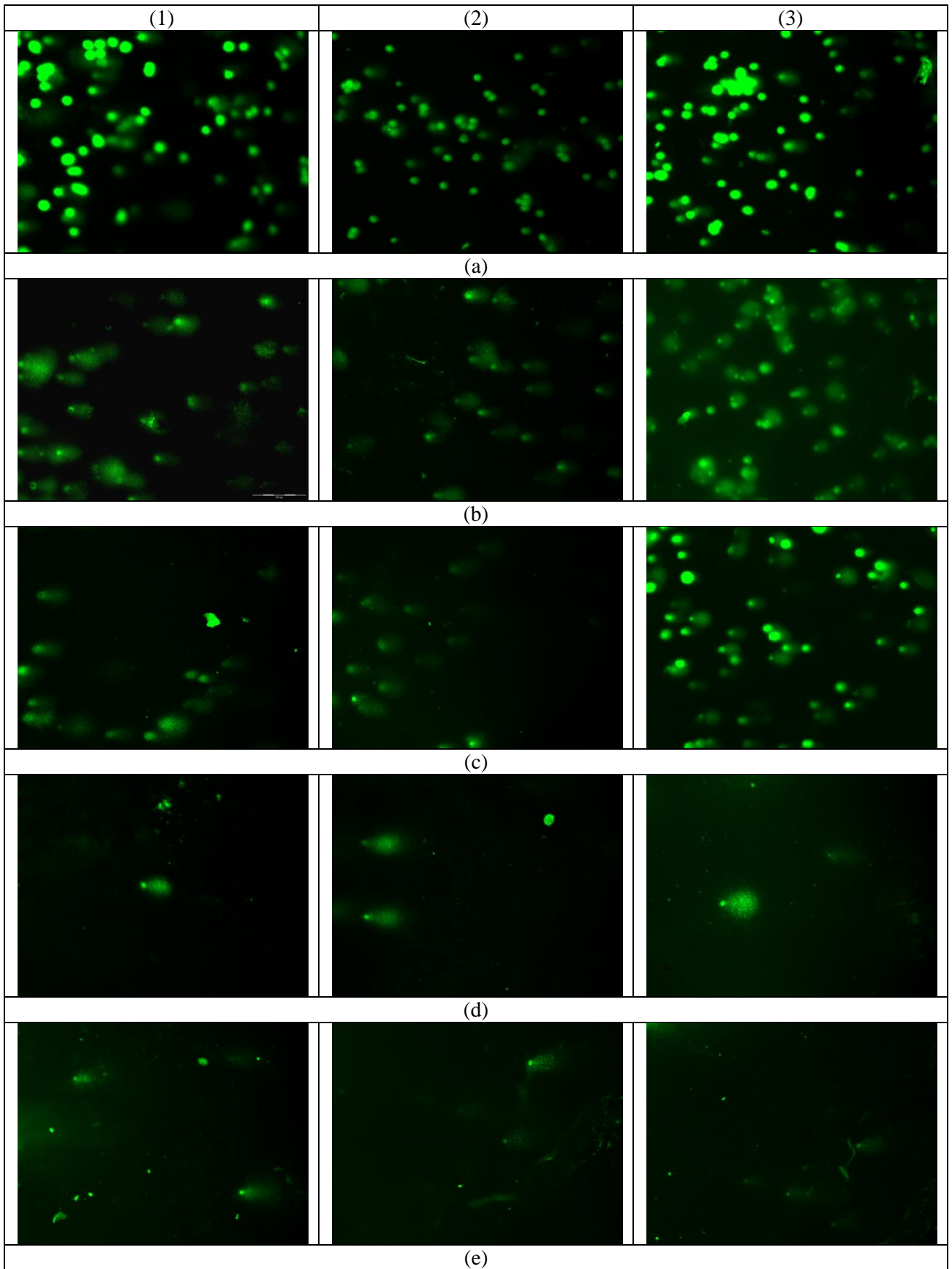


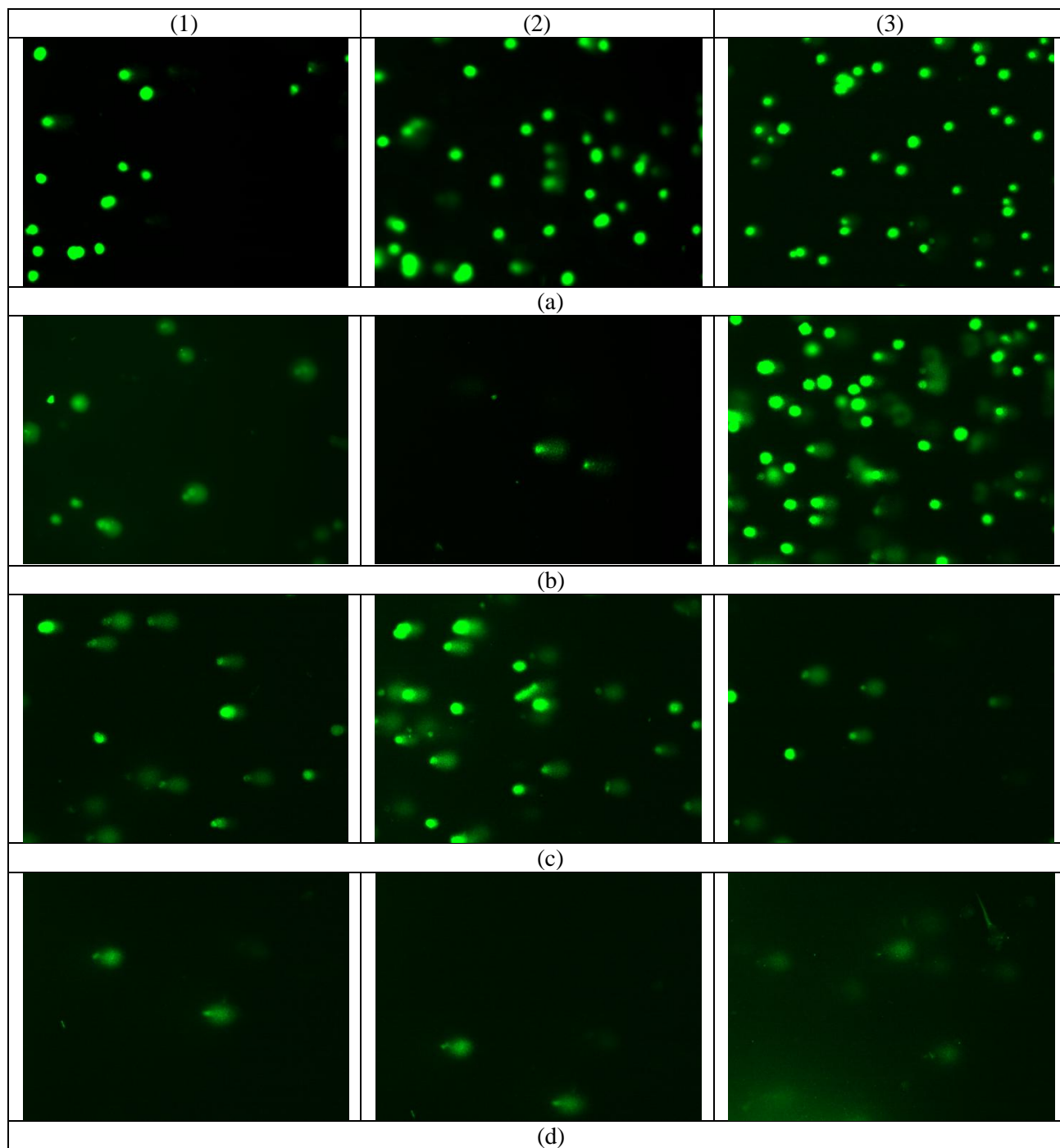


**Obr 30.:** Kometová analýza buněk poškozených fotodynamickým působením; tzv. „ghosts“,  
 (a) 1  $\mu\text{M}$  TMPyP, 4h po PDT (první dva vlevo); (b) 6h po PDT (poslední vpravo)

Na následující straně:

**Obr 31.:** Kometová analýza buněk po PDT (TMPyP);  
 (a) 0  $\mu\text{M}$  TMPyP, kontrola K1, 4h po PDT (a1,a2), 6 h po PDT (a3);  
 (b) 1  $\mu\text{M}$  TMPyP, 4h po PDT;  
 (c) 1  $\mu\text{M}$  TMPyP, 6h po PDT;  
 (d) 5  $\mu\text{M}$  TMPyP, 4h po PDT (d1), 6h po PDT (d2,d3);  
 (e) 50  $\mu\text{M}$  TMPyP, 4h (e1), 6h (e2,e3).





**Obr 32.:** Kometová analýza buněk po PDT (ClAlPcS<sub>2</sub>);

(a) kontrola K1, 0 μM ClAlPcS<sub>2</sub>, 4h po PDT a 6h po PDT (a1,a2), kontrola K2, 10 μM ClAlPcS<sub>2</sub>, 6 h po PDT (a3);

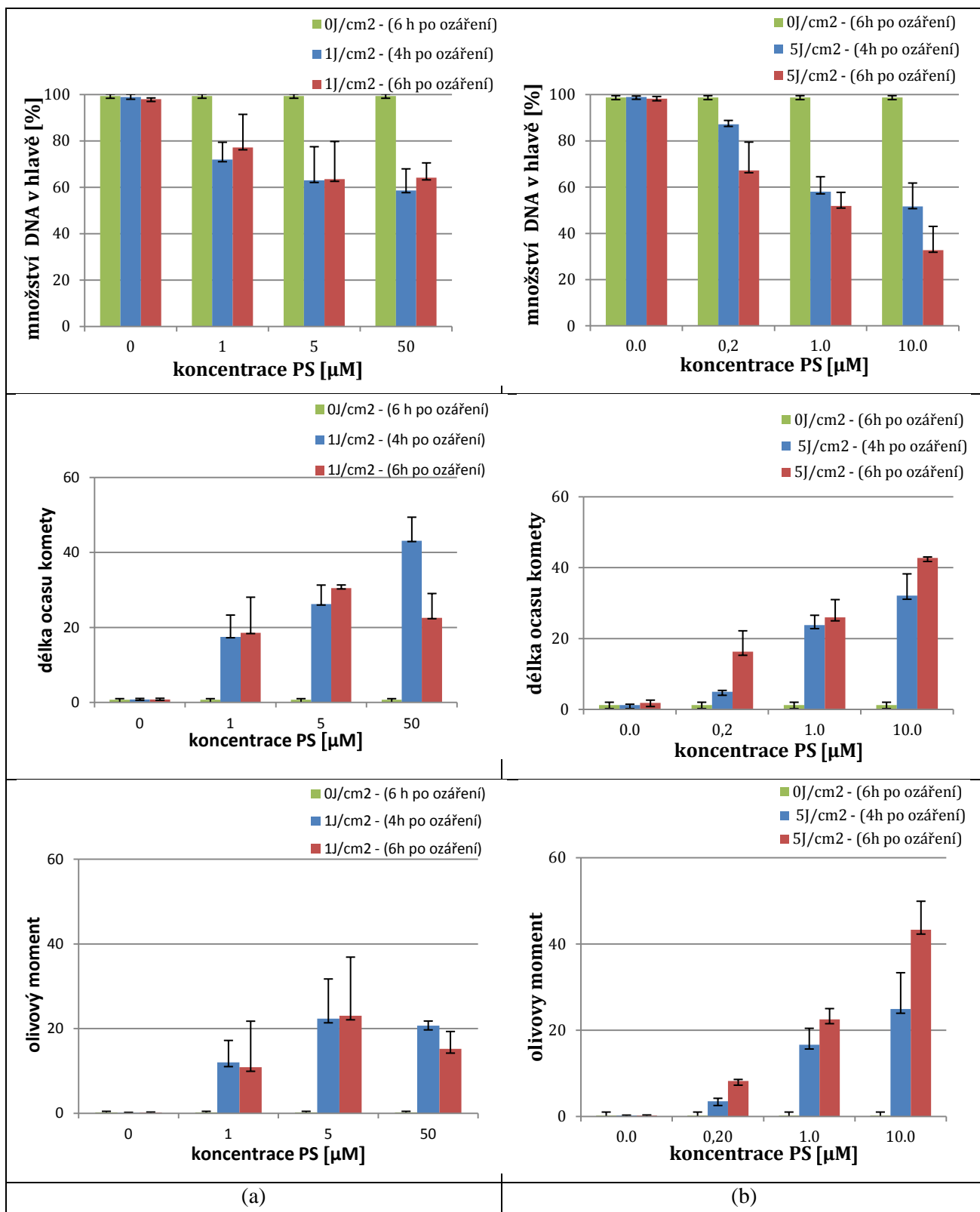
(b) 0,2 μM ClAlPcS<sub>2</sub>, 4h po PDT (b1,b2), 6 h po PDT (b3);

(c) 1 μM ClAlPcS<sub>2</sub>, 4h po PDT (c1,c2), 6h po PDT (c3);

(d) 10 μM ClAlPcS<sub>2</sub>, 4h po PDT (d1), 6h po PDT (d2,d3);

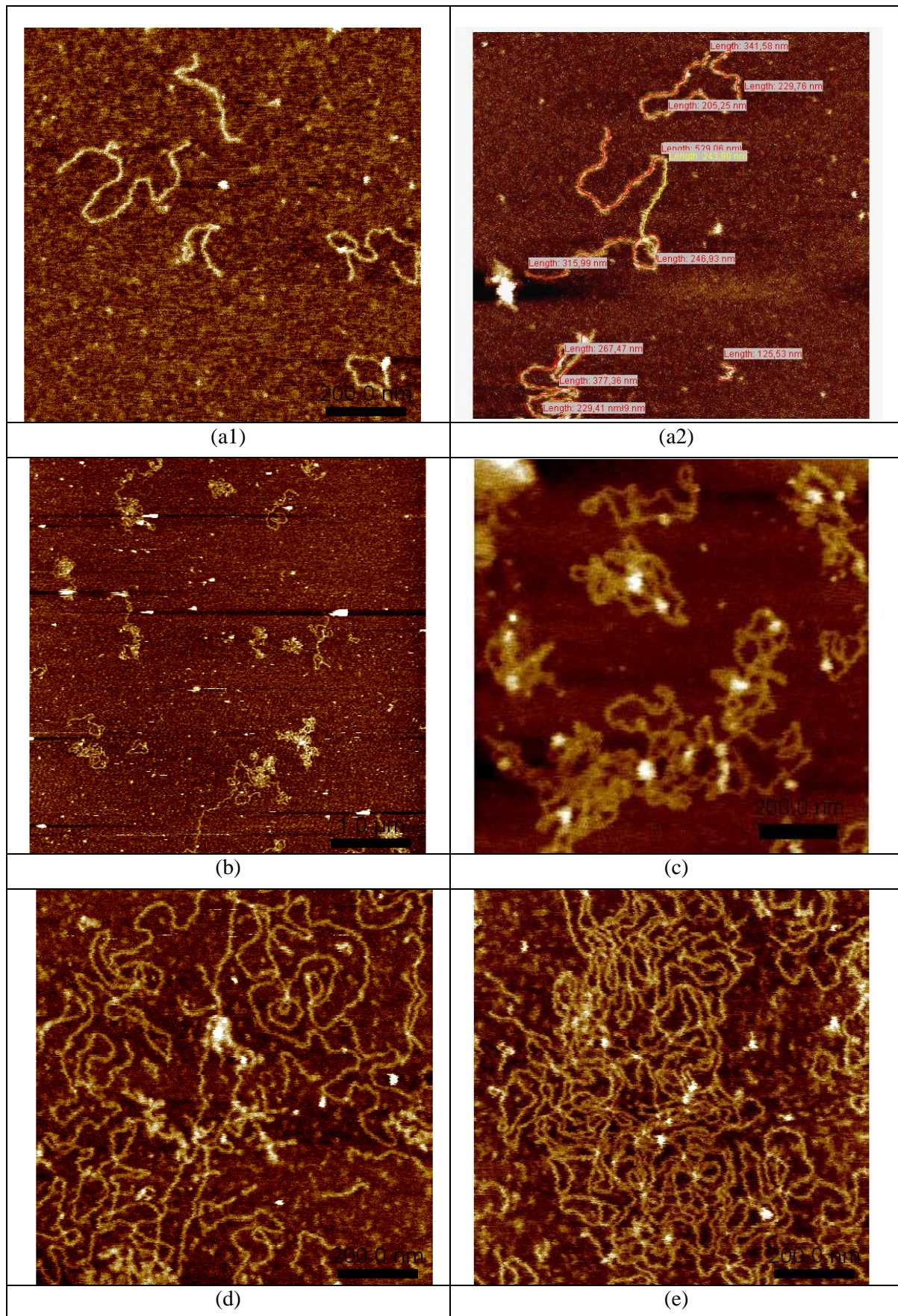
	koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	Hustota energie ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	% head DNA (%)	% tail DNA (%)	comet length	tail length	olive tail moment
K1 - TMPyP (6h)	50,0	0	99,39 $\pm$ 0,83	0,45 $\pm$ 0,60	20,51 $\pm$ 4,12	0,71 $\pm$ 0,32	0,23 $\pm$ 0,22
K2 - TMPyP (4h)	0,0	1	98,96 $\pm$ 1,20	1,04 $\pm$ 1,20	21,24 $\pm$ 1,85	0,81 $\pm$ 0,27	0,13 $\pm$ 0,08
K2 - TMPyP (6h)	0,0	1	98,00 $\pm$ 0,54	1,13 $\pm$ 0,54	21,27 $\pm$ 0,60	0,81 $\pm$ 0,32	0,14 $\pm$ 0,14
1 $\mu\text{M}$ TMPyP (4h)	1,0	1	72,02 $\pm$ 7,39	27,98 $\pm$ 7,40	41,16 $\pm$ 6,57	17,49 $\pm$ 5,83	12,01 $\pm$ 5,18
5 $\mu\text{M}$ TMPyP (4h)	5,0	1	63,06 $\pm$ 14,43	36,91 $\pm$ 14,45	53,09 $\pm$ 4,64	26,21 $\pm$ 5,11	22,36 $\pm$ 9,36
50 $\mu\text{M}$ TMPyP (4h)	50,0	1	58,67 $\pm$ 9,26	41,30 $\pm$ 9,20	61,34 $\pm$ 4,63	43,13 $\pm$ 6,28	20,69 $\pm$ 1,09
1 $\mu\text{M}$ TMPyP (6h)	1,0	1	77,16 $\pm$ 14,28	22,79 $\pm$ 14,27	29,08 $\pm$ 10,78	18,60 $\pm$ 9,48	10,91 $\pm$ 10,84
5 $\mu\text{M}$ TMPyP (6h)	5,0	1	63,54 $\pm$ 16,21	38,38 $\pm$ 14,86	59,60 $\pm$ 13,21	30,50 $\pm$ 0,84	23,07 $\pm$ 13,81
50 $\mu\text{M}$ TMPyP (6h)	50,0	1	64,17 $\pm$ 6,33	35,83 $\pm$ 6,33	43,28 $\pm$ 2,68	22,57 $\pm$ 6,49	15,20 $\pm$ 4,11
K1 - CIAIPcS2 (6h)	10,0	0	98,80 $\pm$ 0,68	1,23 $\pm$ 0,66	21,07 $\pm$ 3,57	1,20 $\pm$ 0,81	0,19 $\pm$ 0,14
K2 - CIAIPcS2 (4h)	0,0	5	98,94 $\pm$ 0,43	1,06 $\pm$ 0,43	20,55 $\pm$ 1,29	1,20 $\pm$ 0,24	0,19 $\pm$ 0,10
K2 - CIAIPcS2 (6h)	0,0	5	98,29 $\pm$ 0,87	1,71 $\pm$ 0,87	22,93 $\pm$ 0,43	1,80 $\pm$ 0,80	0,19 $\pm$ 0,13
0,2 $\mu\text{M}$ CIAIPcS2 (4h)	0,2	5	87,21 $\pm$ 1,59	13,63 $\pm$ 1,66	28,48 $\pm$ 1,32	4,97 $\pm$ 0,38	3,52 $\pm$ 0,67
0,2 $\mu\text{M}$ CIAIPcS2 (6h)	0,2	5	67,18 $\pm$ 12,25	20,58 $\pm$ 5,27	46,42 $\pm$ 5,06	16,27 $\pm$ 5,91	8,23 $\pm$ 0,33
1,0 $\mu\text{M}$ CIAIPcS2 (4h)	1,0	5	58,04 $\pm$ 6,39	42,16 $\pm$ 6,54	47,36 $\pm$ 2,97	23,80 $\pm$ 2,78	16,63 $\pm$ 3,80
1,0 $\mu\text{M}$ CIAIPcS2 (6h)	1,0	5	51,90 $\pm$ 5,80	47,71 $\pm$ 5,29	55,00 $\pm$ 1,00	26,00 $\pm$ 5,00	22,50 $\pm$ 2,50
10 $\mu\text{M}$ CIAIPcS2 (4h)	10,0	5	51,66 $\pm$ 10,07	48,34 $\pm$ 10,08	56,54 $\pm$ 2,24	32,11 $\pm$ 6,16	24,92 $\pm$ 8,40
10 $\mu\text{M}$ CIAIPcS2 (6h)	10,0	5	32,80 $\pm$ 10,18	67,20 $\pm$ 10,18	64,75 $\pm$ 4,71	42,77 $\pm$ 0,28	43,28 $\pm$ 6,62

**Tab. 6:** Výsledky – kometová analýza TMPyP a CIAIPcS<sub>2</sub> – hodnoty odpovídají střední hodnotě z mediánu ze čtyř nezávislých měření.



**Graf 2:** Parametry kometové analýzy (množství DNA v hlavě, délka ocasu komety, „olivový moment“) po fotodynamickém působení; (a) TMPyP a (b) ClAIPcS<sub>2</sub>

## Výsledky – AFM (studium cytotoxicity)



Na předchozí straně:

**Obr 33.:** AFM snímky DNA izolované z MCF-7 buněk po PDT (TMPyP), tapping mode, scan rate 0,2 Hz,

(a) 1  $\mu\text{M}$  TMPyP,  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ; (a2) snímek včetně obrazové analýzy jednotlivých fragmentů

(b) 5  $\mu\text{M}$  TMPyP,  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ;

(d) 50  $\mu\text{M}$  TMPyP,  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ,

(e) – K1 skenovaná oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$

Na následující straně:

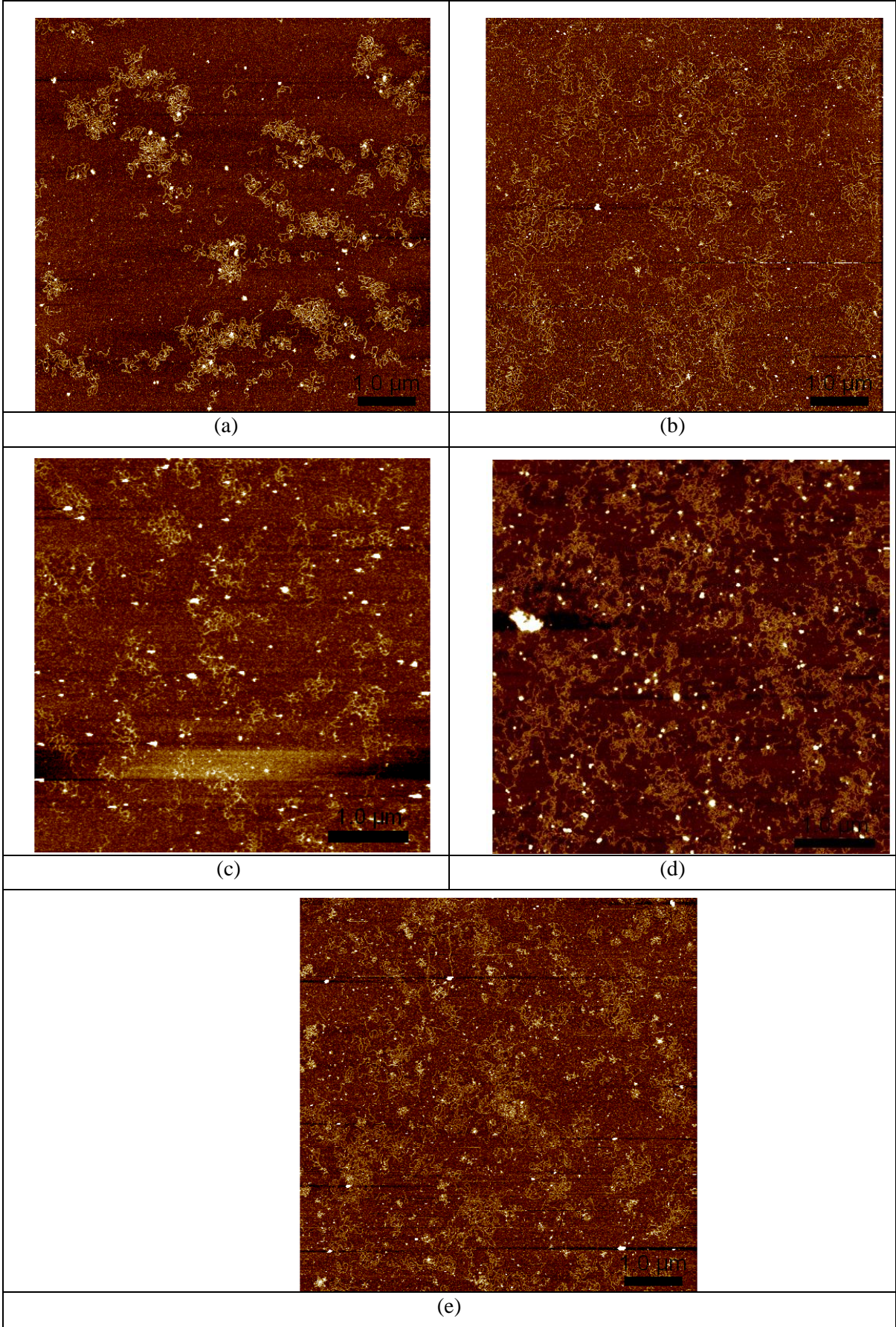
**Obr 34.:** AFM snímky DNA izolované z MCF-7 buněk po PDT (ClAlPcS<sub>2</sub>), tapping mode, scan rate 0,2 Hz, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$

(a) 0,2  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>,

(b) 1,0  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>,

(c,d) 10  $\mu\text{M}$  ClAlPcS<sub>2</sub>,

(e) – K1.





## 5.4. Diskuze – studium toxicity vybraných fotosenzitizérů vlivem PDT

Z dosavadních výzkumů je zřejmé, že způsob světlem indukované buněčné smrti je možno modulovat různými způsoby, nejen typem použitého senzitivizéru a jeho koncentrací. Svou roli také hraje vliv lokálního působení v buňce (Fabris et al., 2001), který je mimo jiné také podmíněn časovým odstupem, resp. délkou inkubace buněk se senzitivizérem před vlastním fotodynamickým působením (Kessel David, 1997; Oliveira et al., 2011). V této studii byl proto interval inkubace buněk se senzitivizérem držen konstantní (24h), což zajišťuje maximální vstřebání studovaného fotosenzitivizéru do buněk (Allison & Moghissi, 2013; Oliveira et al., 2011; Robertson et al., 2009).

Jedním z cílů fotodynamického působení je převažující apoptotický způsob smrti buněk ošetřených PDT terapií. S ohledem na biologickou proměnlivost studovaných linií, vybavení pracovišť a zejména použití různých dávek ozáření a koncentrací senzitivizérů se rozcházejí závěry ohledně způsobu buněčné smrti v publikacích různých vědeckých laboratoří, výzkum byl proto částečně také zaměřen na rozlišení způsobu buněčné smrti.

Studovaný TMPyP a CIAIPcS<sub>2</sub> jsou dva významné fotosenzitivizéry s ověřeným fotodynamickým účinkem na různých buněčných liniích. Jejich selektivní absorpce v tumorové tkáni (Acedo et al., 2014; Kassab Kawser, 2009; Saeko Tada-Oikawa, 2009) z nich činí přední senzitivizéry v oblasti použití PDT, ačkoliv každý z nich prezentuje odlišný způsob působení v buňce i odlišné excitační vlnové délky. TMPyP má excitační vlnovou délku v modré oblasti. Jeho hloubka průniku ve tkáni je tedy mnohem menší než u CIAIPcS<sub>2</sub>, který má excitační vlnovou délku v červené oblasti, což zároveň značně zvyšuje možnost použití tohoto PS v klinické praxi.

### Elektroforéza

Fragmentace DNA je jedním z klíčových rysů apoptotické smrti buňky, kdy kaspázou (kaspáza 3, v menší míře také kaspáza 7 a 9) aktivovaná DNasa (ICAD-CAD) štěpí v místech mezi nukleosomy DNA, preferenčně ve vzdálenostech o délce 180bp a jeho násobků (360,540 atd.). Detekovaná fragmentace DNA je všeobecně považována za projev apoptotické smrti buňky (Bortner et al., 1995; Nagata, 2000; Nagata et al., 2003; Semenov et al., 2004).

Z naměřených elektroforetických záznamů vyplývá, že při koncentracích fotosenzitivizéru odpovídajících IC<sub>50</sub> a vyšších, se u MCF-7 buněčných linií jemná fragmentace genomické DNA téměř nevyskytuje. U koncentrací fotosenzitivizéru nižších než je IC<sub>50</sub> se dá usuzovat na jistou míru apoptotické smrti buněk, zřetelnější bend se vyskytuje zejména u

1 $\mu$ M TMPyP (viz **obr.28**). Po zakoncentrování vzorku DNA izolované z poškozených buněk se náznak apoptotického štěpení genomu projevil také u druhého ze studovaných senzitizerů, a to u 0,2 $\mu$ M ClAlPcS<sub>2</sub> (viz **obr 29**). V obou případech byla dílčí fragmentace DNA patrná pouze u vzorků analyzovaných až 6h po PDT působení, zatímco u vzorků analyzovaných 4h po PDT působení se téměř neprojevila.

Výraznější míra apoptózy u senzitizeru TMPyP ve srovnání s ClAlPcS<sub>2</sub> koresponduje se známým mechanismem působení, zejména s konečnou lokací PS v buňce. TMPyP se váže primárně zejména v buněčném jádře přímo na DNA molekulu (lokalizace v malém žlábků) a v perinukleárním prostoru, v minoritní míře lze detekovat TMPyP také v cytosolu (Acedo et al., 2014; Kassab Kawser, 2009; Saeko Tada-Oikawa, 2009). Silná afinita TMPyP k DNA (malý žlábek a fosfátová kostra DNA) a produkce singletního kyslíku po ozáření vede s ohledem na krátkou dobu života a reakční poloměr 0,02 $\mu$ m k přímému poškození DNA, zejména oxidací guanosinu. Nevratné poškození DNA pak prostřednictvím kaspázového řetězce může spustit preferenčně apoptotickou cestu řízené buněčné smrti.

Oproti tomu druhý studovaný senzitizer, ClAlPcS<sub>2</sub>, se váže přednostně na buněčné orgány, zejména mitochondrie, dále pak také na endoplasmatické retikulum, aktinová filamenta cytoskeletu a lysozomy (Agostinis et al., 2011; Peng et al., 1991; Rosenthal, 1991). Po ozáření buněk inkubovaných s PS ClAlPcS<sub>2</sub> dojde v důsledku lokálního působení ROS k poklesu membránového potenciálu mitochondrií, zvýšení permeability vnější mitochondriální membrány a posléze k vylití cytochromu C do cytosolu. I když je uvolnění cytochromu C může být v závislosti na koncentraci fotosenzitizeru resp. působících ROS pro buňku letální událost, může část mitochondrií setrvat ve funkčním stavu a umožnit tak aktivaci apoptotického procesu (Plaetzer et al., 2002) např. prostřednictvím aktivací tzv. „receptorů smrti“ v membráně. To, zda buňka podstoupí apoptotickou cestu či zemře nekrotickou, je rozhodnuto zřejmě v důsledku souhry mnoha pro-apoptotických či nekrotických faktorů. Z těch pro-apoptotických jde např. o uvolnění Ca<sup>2+</sup> z endoplasmatického retikula (Mak et al., 2004), aktivaci kaspázy 12 (McGinnis 1999), prokaspázy 3 (Grebeňová et al., 2003), kaspázy 9 (Plaetzer et al., 2002), depolymeraci a štěpení skeletárních proteinů (Bursch et al 2000, Berlanda et al., 2010; Castano et al., 2005b; Plaetzer et al., 2002).

Zdá se, že právě stanovení správné koncentrace senzitizeru a hustoty energie (expozice) může ovlivnit preferenci apoptotického procesu před volbou pasivní nekrotické smrti buňky v důsledku fotodynamického působení, které nastává zřejmě v důsledku rozsáhlého poškození buněk.

Z výsledků gelové elektroforézy je zřejmé, že pro posouzení cytogenetického působení PDT s preferující volbou apoptotické smrti buňky je vhodné analyzovat vzorky až 6h po fotodynamickém působení.

### Kometová analýza

Jaderná DNA je v živé buňce organizována v terciální struktuře v nukleosomální jednotky. Nadšroubovicovitě vinutá DNA je tedy v agarózovém gelu poměrně pevně ukotvena a při následné elektroforéze se příliš nepohybuje a tvar komety kopíruje tvar jádra resp. buňky (viz **obr. 31a** a **obr. 32a**). Základním faktorem, určujícím zda se segment DNA objeví spíše v ocasu komety než v hlavě, je relaxace nadšroubovicového vinutí DNA, které jednoduše závisí na porušení vlákna dvoušroubovice a objevuje se nezávisle na pH.

Jednořetězcový zlom (SSB, single strand break) způsobí relaxaci superhelixového vinutí. Poškozením genotoxického agens vzniklé rozvinuté fragmenty DNA mohou vlivem napětí migrovat k anodě (15-20min) za vzniku specifického „ocasu“ či „ohonu“, vytvářejícího obraz komety, odpovídajícímu frekvenci zlomů ve vlákně DNA. V alkalické kometové analýze tedy počet rozvolněných smyček v ocasu komety odpovídá počtu zlomů DNA. S rostoucím stupněm poškození se více zvyšuje intenzita ocasu komety než jeho délka, která spíše odpovídá délce obsahujících smyček. Množství DNA v ocasu komety pak odrazí charakter poškození – délku expozice či koncentraci toxického agens.

Z obrazové analýzy naměřených komet u MCF-7 buněk po PDT vyplývá, že oba senzitivizéry TMPyP a ClAlPcS<sub>2</sub> jsou genotoxické, a to již při koncentracích 5x nižších, než odpovídá IC<sub>50</sub>, jak je zřejmé z **obr. 31** a **obr. 32**. Z **grafu 2** je dále zřejmé, že TMPyP vykazuje vyšší genotoxicitu ve srovnání s ClAlPcS<sub>2</sub> za použití hustoty energie a koncentrace fotosenzitivizéru odpovídající IC<sub>50</sub>, a to jak u buněk studovaných 4h po fotodynamickém působení, tak u buněk studovaných 6 h po fotodynamickém působení.

Zároveň se může z **grafu 2** zdát, že 10x vyšší koncentrace (oproti IC<sub>50</sub>) způsobuje menší poškození než koncentrace odpovídající IC<sub>50</sub>. Tento zdánlivý pokles poškození (resp. snížení hodnot u všech sledovaných parametrů kometové analýzy) je nejvíce zřejmý u TMPyPu a je způsoben faktem, že u vysokých koncentrací genotoxického agens (letální dávky) dochází u buněk k rozsáhlému poškození, že buňky již není možno kometovou analýzou detekovat, ať už v časnějším fázích – 4 h po ozáření, nebo v pozdějších – 6 h po ozáření. Detekovatelných komet v tomto vzorku je pouze cca 1/5 a méně ve srovnání s počtem komet ozářených na základě IC<sub>50</sub> a to u obou sledovaných senzitivizérů.

Z výsledků kometové analýzy můžeme také usuzovat na spuštění reparačních procesů, kdy po šesti hodinách je u sledovaného 1  $\mu$ M TMPyP v hlavě vyšší množství DNA oproti stejné situaci vyšetřované 4h po ozáření, viz **graf 2**.

CIAIPcS<sub>2</sub> vzhledem ke svému odlišnému způsobu distribuce v buňce prezentuje zřejmě nahromadění poškození v různých organelách s menším zastoupením poškození jádra. Proto s ohledem na způsob svého působení je CIAIPcS<sub>2</sub> méněcytotoxický než TMPyP (při srovnatelných hodnotách IC<sub>50</sub>).

### AFM zobrazení

DNA v lidském chromosomu obsahuje průměrně 10<sup>8</sup> až 3.10<sup>8</sup> párů bází, je 2 nm široká a řádově centimetry dlouhá. Na primární (sekvence nukleotidů) a sekundární (tvar dvoušroubovice) strukturu DNA navazuje nukleosomový řetězec, ve kterém je v pravidelných intervalech cca 140 bp navinuto vlákno DNA kolem proteinového jádra (oktamer histonů). Vzniká tak nukleosom, 10 nm silné chromatinové vlákno. Dalšího svinutí jaderné DNA je dosaženo řazením nukleosomového řetězce do závitů – solenoidu. Jedna otáčka solenoidu pak obsahuje 8-10 nukleosomů. Lidský chromosom pak obsahuje tisíce solenoidů. Degradace DNA v podobě oligonukleosomálních fragmentů o délce cca 180 bp je charakteristickým rysem apoptózy, kdy v oblasti mezi nukleosomy, kde DNA není stočena kolem histonu, CAD štěpí DNA na cca 180 bp fragmenty, jak bylo prokázáno v řadě studií (Janine D Miller, 2007; Kolarova et al., 2005).

DNA izolovaná z fototoxicky a zejména genotoxicky poškozených buněk zpravidla vykazuje zřetelně snížený stupeň vinutí (relaxaci nadšroubovicového vinutí DNA) v důsledku SSBs. Při současném vzniku DSBs pak může být zároveň zřetelná fragmentace vláknů DNA. Vzniklé fragmenty, resp. jejich délkové distribuce může být přímo vizualizována a kvantifikována metodou AFM na úrovni zobrazení jednotlivých molekul (Jiang et al., 2010; Tiner Sr et al., 2001).

Na základě obrazové analýzy AFM snímků DNA izolované z buněk vystavených fototoxickému působení senzitizeru TMPyP lze usuzovat, že zobrazená DNA (**obr. 33a**) vykazuje zřetelně vyšší zastoupení v podobě kratších fragmentů a relaxovaných struktur. Oproti tomu u kontrolních vzorků byla zobrazená DNA často kompaktní, bez možnosti zobrazit jednotlivá vlákna. V případě velkého zředění DNA (pod 0,1  $\mu$ g/ml) pak zobrazená DNA vykazovala zpravidla vláknité zamotané struktury bez počátku a konce (**obr. 33e**). Zobrazená DNA je na AFM snímcích zpravidla zřetelně relaxovaná, zřejmě v důsledku působení SSBs.

I když z AFM analýzy nelze samostatně usuzovat na apoptotický proces, lze s ohledem na výsledky z ostatních metod usoudit, že u vzorků vystavených působení  $1\mu\text{M}$  TMPyP při  $1\text{J}/\text{cm}^2$  byla částečně přítomna také jemná fragmentace DNA.

Oproti tomu u senzitizeru ClAlPcS<sub>2</sub> obrazová analýza jednotlivých molekul DNA výraznější jemnou fragmentaci DNA či pravidelný výskyt relaxovaných struktur, a to ani u nízkých koncentrací (**obr. 34(a-d)**). Na analyzovaných snímcích není výrazný výskyt fragmentů v důsledku DSBs a SSBs, zobrazená DNA obsahuje četné smyčky. Na probíhající apoptotické procesy nelze u ClAlPcS<sub>2</sub> na základě AFM snímků usuzovat.

Ačkoliv může být použití AFM v nanomedicině rychlou a spolehlivou metodou, je jeho zavedení v oblasti nanomedicíny teprve ve vývoji a je nutno tuto metodiku vždy použít ve srovnání s ostatními, již zavedenými, metodami. Největší předností této zobrazovací metody je použití malého množství DNA (zpravidla  $0,1\mu\text{l}$  –  $1,0\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci DNA řádově  $100\text{pg}/\text{ml}$  (Jiang et al., 2010) v závislosti na použité imobilizační technice. Druhou předností je rychlost, s jakou je možno výsledky obrazové analýzy získat.

## 6. Experimentální část III - Studium magnetických mikročástic metodou AFM

V této části práce jsou prezentovány výsledky studie syntetizovaných a komerčních magnetických nosičů (MMP), používaných k izolaci DNA z hrubých lyzátů. Morfologie a struktura těchto magnetických nosičů byla studována s ohledem na efektivnost reverzibilní adsorpce DNA a následného studia konformačních procesů DNA metodou AFM v průběhu reverzibilní adsorpce DNA na povrch magnetického nosiče.

### 6.1. Materiál a metody

#### Magnetické nosiče

##### Komerčně dostupné nosiče

dodavatel PurBiotech; složení: polymerní obal tvořen porézním borosilikátovým sklem, jádro superparamagnetickým oxidem železa, částice byly zkoumány ve dvou modifikacích:

- a) dále neupravené („uncoated“) magnetické mikročástice s převažující - OH funkční skupinou exprimovanou na povrchu částic, MPG uncoated;
- b) částice pokryté streptavidinem, MPG – STV coated.

##### Laboratorně připravené nosiče

magnetické částice byly vyvinuty výzkumnou skupinou Ing. Daniela Horáka, CSc. (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha), složení: magnetické poly(2-hydroxyethyl-co-glycidylmethakrylátové) mikročástice, lišící se metodikou přípravy (kódováno číslem částice), a tedy i obsahem železa, pokrytím funkčními skupinami, průměrem i obecně také funkční a povrchovou morfologií.

Typ magnetického nosiče	kód	Funkční skupiny	Předpokládaný průměr [μm]	AFM kód.
a) P(HEMA-co-GMA)	B 29,	-	2,86	8
P(HEMA-co-GMA)	B 29 ox	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> OH	2,86	9
b) PGMA	B 30	-	0,74	10
PGMA	B 30 ox		0,74	6 + BET č. 1
c) PGMA	B 135 ox	oleic acid	1,16	5
d) PGMA	B 77 ox		2,23	4 + BET č.2
e) P(GMA-MOEAA-EDMA)		-	4,8	1
f) HPS - B-M-NH <sub>2</sub>		-NH <sub>2</sub>	?	2
g) HPS - B- 22 - NH <sub>2</sub>		-NH <sub>2</sub>	5,7	3
h) HPS - B - 21		-		7 +BETč.3

**Tab. 7:** *přehled analyzovaných magnetických mikročástic*

### Imobilizace magnetických částic

S ohledem na jemný pohyb magnetického nosiče pod skenujícím hrotem bylo nutno napřed optimalizovat imobilizaci studovaného nosiče tak, aby nedocházelo k jeho pohybu v průběhu skenování. Pro imobilizaci kulových objektů větších rozměrů (mikrometry) je optimální využití porézních materiálů s definovaným průměrem póru. S ohledem na různé průměry studovaných magnetických nosičů (0,5μm až 12μm) byla k imobilizaci upřednostněna metoda zanoření částice do vrstvy pružného materiálu.

Pro uchycení magnetických nosičů se osvědčila imobilizace na agarózou pokryté krycí sklo (0,5% HMP agaróza, Serva). Zanoření magnetické částice bylo podpořeno neodýmovým magnetem, umístěným na spodní straně krycího skla. Cca 20μl suspence magnetických nosičů o koncentraci 30ng/ml (v DW) bylo napipetováno na agarózou čerstvě potažené potažené krycí sklo. Po cca 3 min inkubace byl povrch s imobilizovanými částicemi opláchnut DW a ponechán uschnout při pokojové teplotě. Do vlastního AFM měření byl vzorek uchován v exikátoru.

### AFM a OM zobrazení magnetických částic

Magnetické nosiče byly analyzovány nejprve optickým mikroskopem IX 81 (Olympus, Japan). Snímky sloužily k vyhodnocení stupně agregace částic, u částic P(HEMA-co-GMA, PGMA (B77 ox), P(GMA-MOEAA-EDMA) a HPS - B-22-NH<sub>2</sub> vedly získané snímky k ověření distribuce velikosti částic.

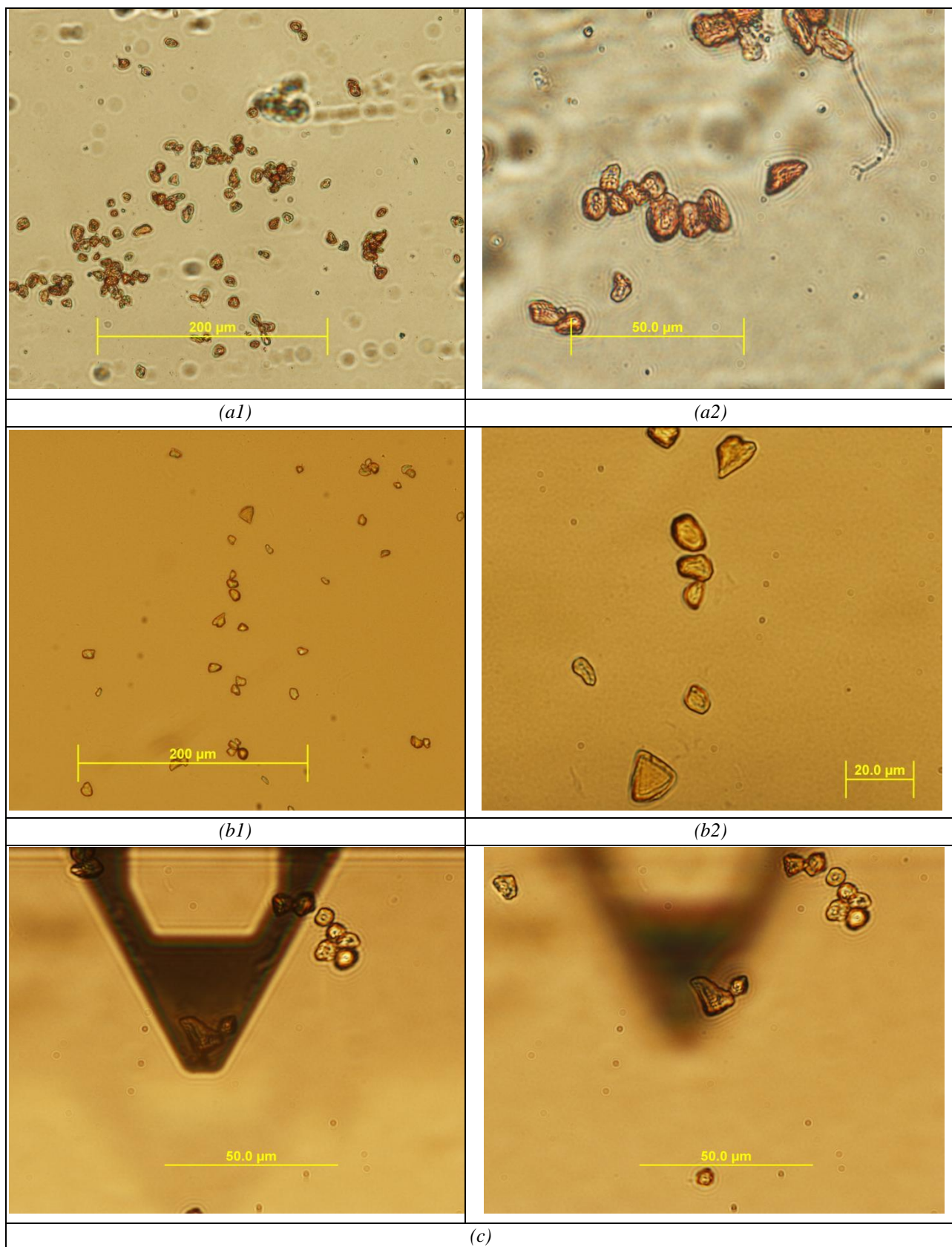
Data získaná AFM měřením byla nasnímana AFM Bioscope Catalyst (BRUKER, Santa Barbara, USA). AFM data byla snímána v pracovním režimu Scan Asyst, datový kanál height a peak force error, rozlišení 512x512 pixelů. Použití CM-AFM, NC-AFM a TP-AFM měřících režimů se u magnetických nosičů neosvědčilo, a to s ohledem na vibrace či laterální pohyb studované částice v důsledku působících sil mezi hrotem a částicí. Vibrační či laterální pohyb částice způsoboval vznik artefaktů v obrazu a znemožňoval jejich zobrazení metodou AFM. Scan Asyst pracovní režim byl jediný vyhovující pro AFM měření výškově velmi odlišných magnetických nosičů. Rychlost skenování 0,1 Hz, hroty vyrobeny z nitridu křemíku o rezonanční frekvenci 50-90 kHz a tuhosti  $0,4 \text{ N.m}^{-1}$ . Uvedené AFM snímky byly pouze proloženy rovinou (NanoScope software verze 1.4) a jsou zobrazeny bez dalších úprav.

AFM snímky poskytují informace o morfologii jednotlivých částic a jemné povrchové struktuře. Vyhodnocena data jsou v podobě *Rms* a *Ra*, zmíněna je distribuce velikosti částic a údaje o jemné morfologii povrchu částic s ohledem na vyhodnocení poréznosti částic.

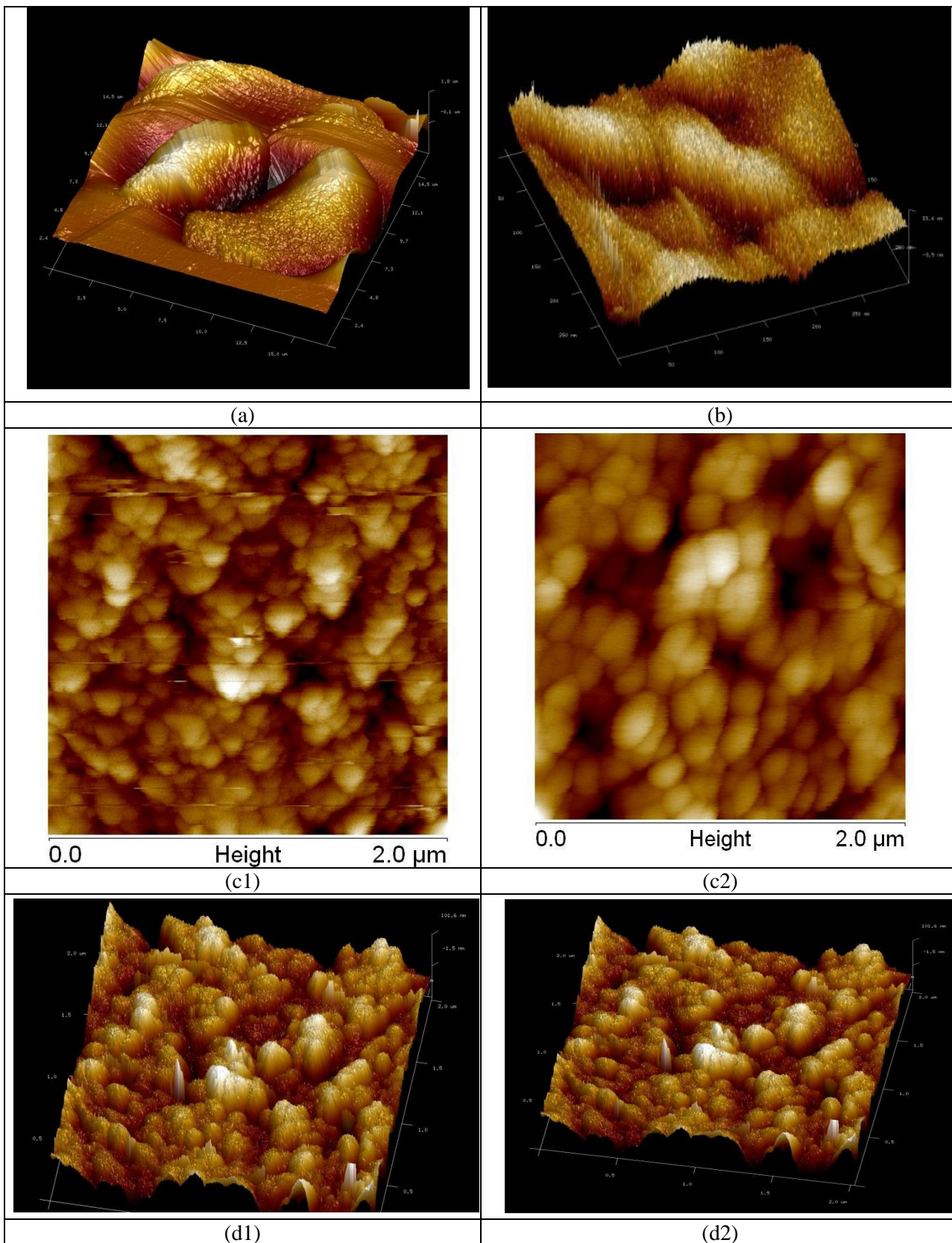
U vybraných magnetických částic byl také vyhodnocen specifický povrch metodou sorpce plynu ( $\text{N}_2$  a Kr). Vzorky byly přesušeny v dusíkové či kryptonové atmosféře při  $40^\circ\text{C}$  po dobu 24 hodin před vlastní BET analýzou.



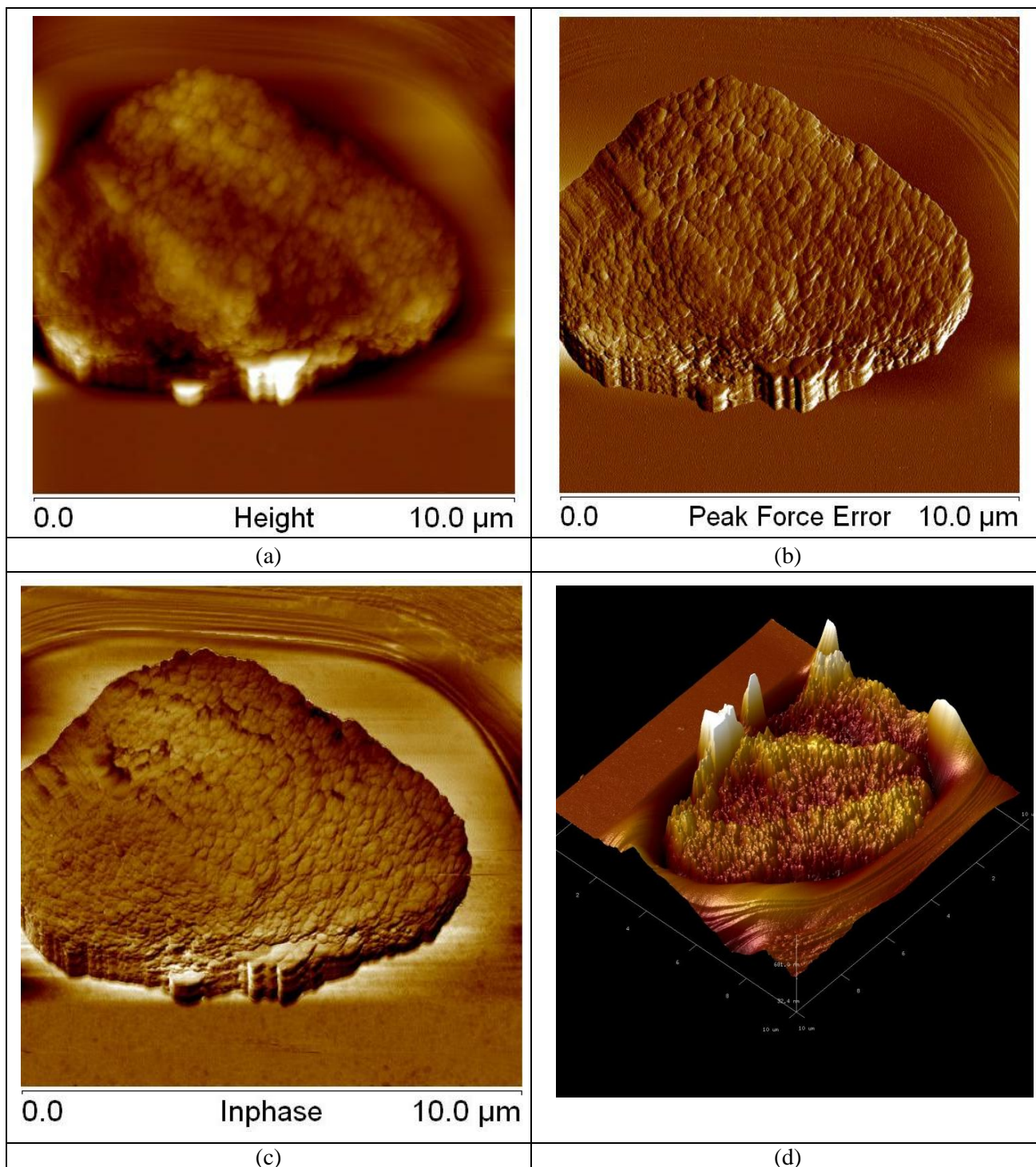
## 6.2. Výsledky - částice komerční



**Obr 35.:** OM snímky komerčních magnetických částic PurBiotech; Mikroskop OLYMPUS IX 81. (a) „uncoated“ ; (b) pokryté streptavidinem, (c) OM snímek s detailu nosníku s měřícím hrotem.



**Obr 36.:** AFM detailní snímky komerční magnetické částic (MPG--uncoated), výškový zobrazovací kanál, (a) – 3D rekonstrukce výškového kanálu, skenovaná oblast  $17 \times 17 \mu\text{m}^2$ , (b) – 3D rekonstrukce výškového kanálu, jemný zoom porézní oblasti - skenovaná oblast  $0,3 \times 0,3 \mu\text{m}^2$  (c1,c2) – 2D rekonstrukce výškového kanálu, skenovaná oblast  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ , (d1,d2) – 3D rekonstrukce výškového kanálu, skenovaná oblast  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ .



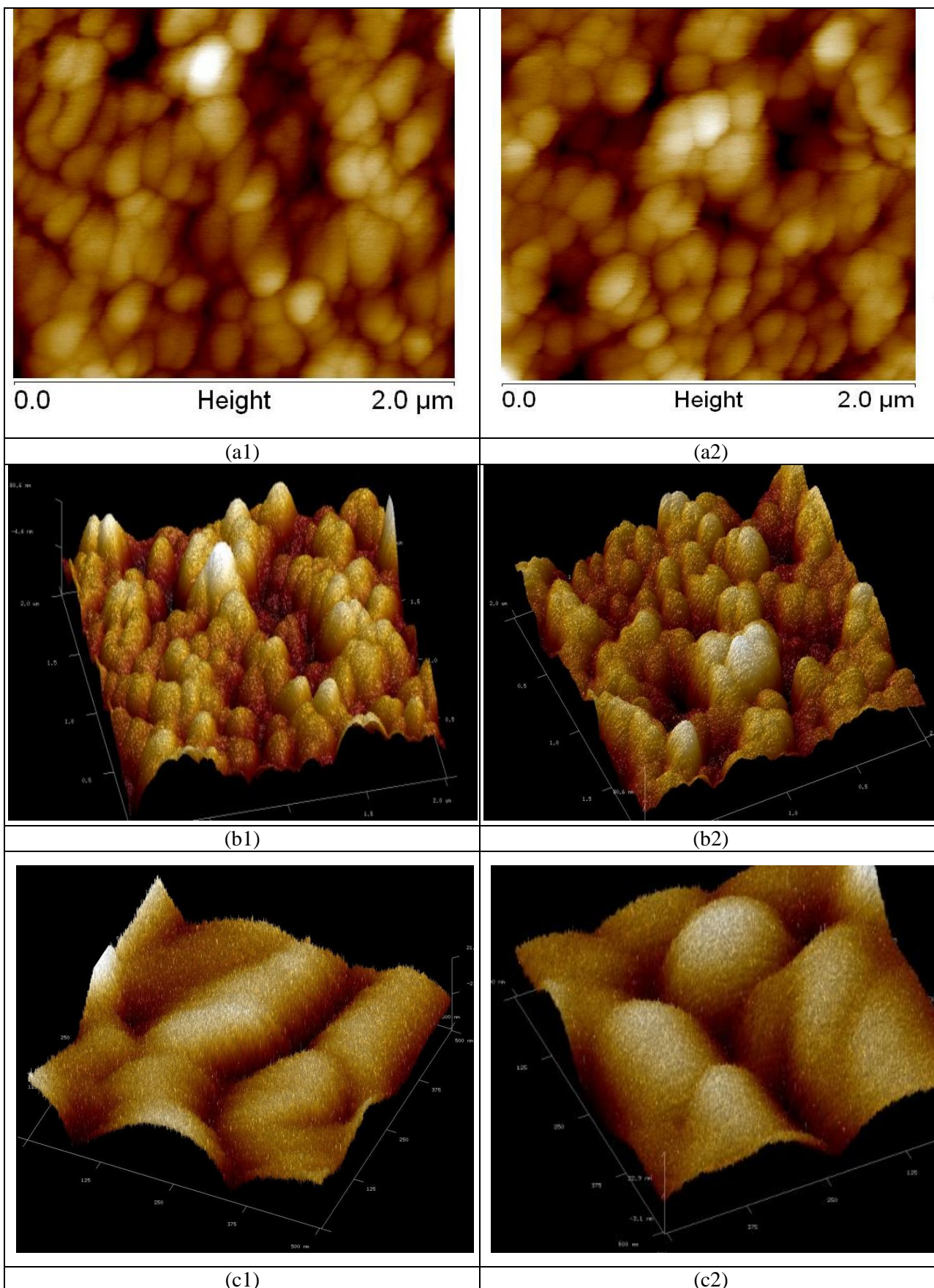
**Obr 37.:** AFM snímek komerční částice PurBiotech (MPG-STV-coated) - snímáný v jednotlivých datových kanálech;

(a) výškový kanál,

(b) peak-force error kanál,

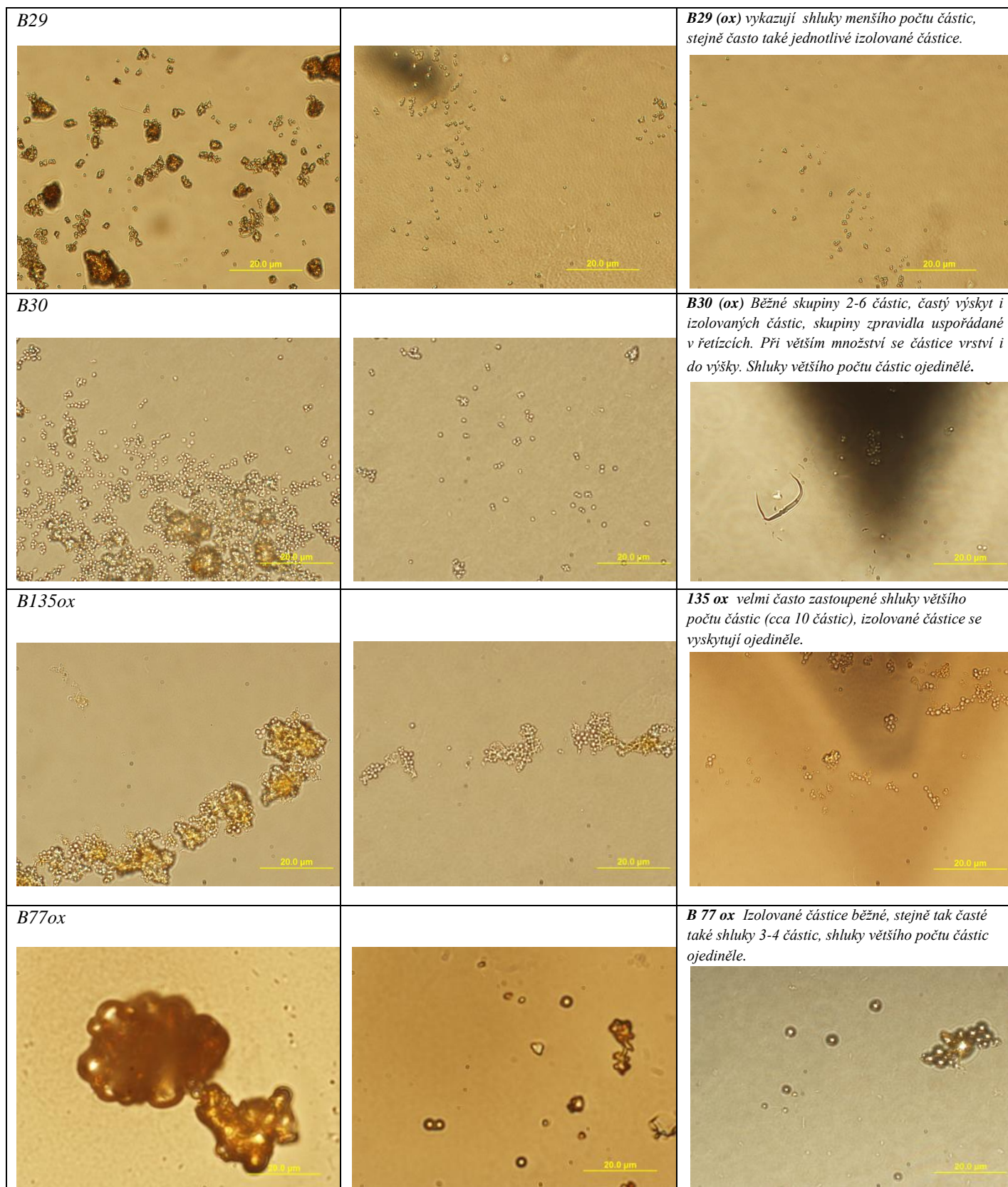
(c) inphase kanál,

(d) 3D projekce výškového kanálu.

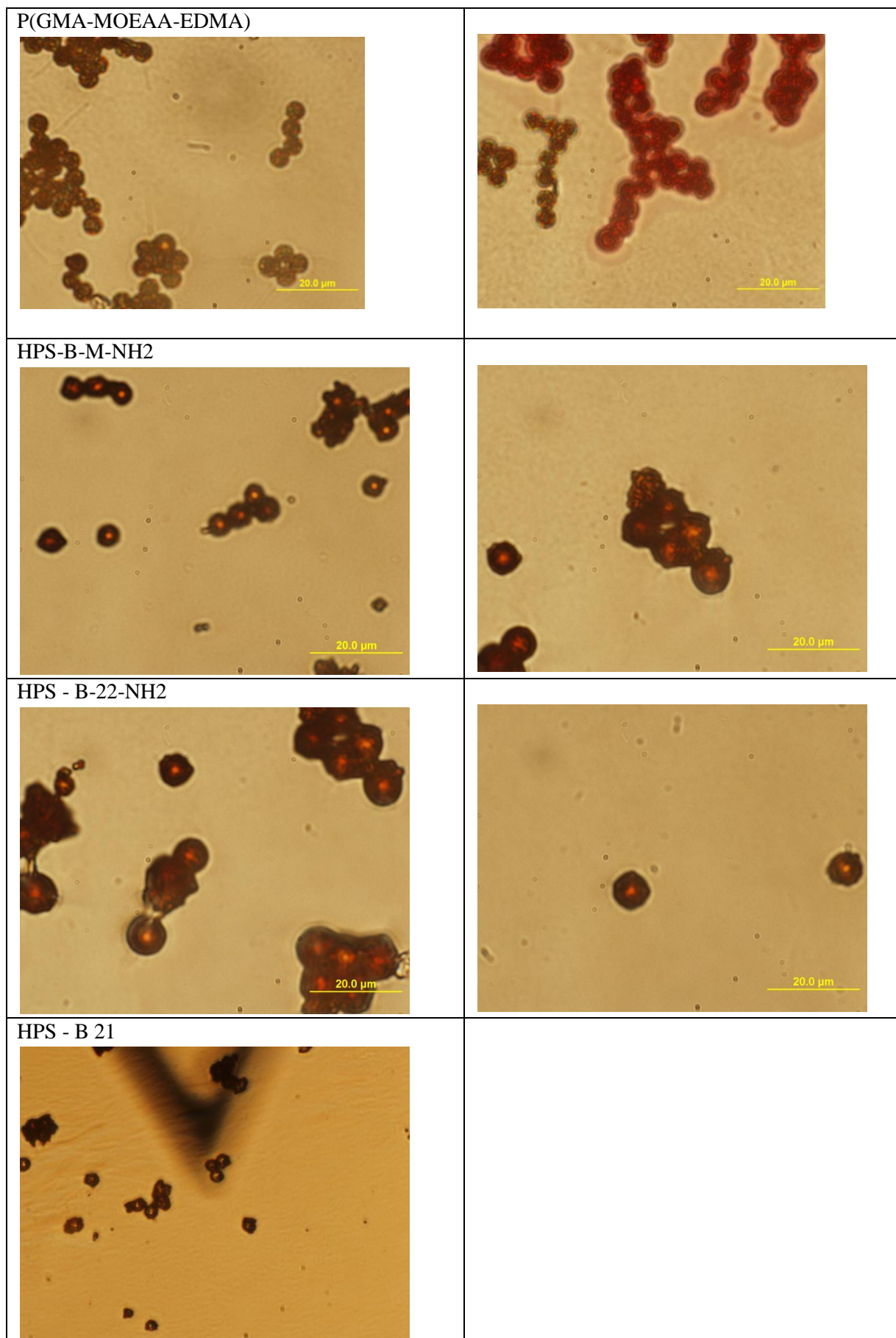


**Obr 38.:** AFM detailní snímky komerční magnetické částic (MPG-STV-coated), výškový zobrazovací kanál,  
 (a1, a2) – 2D rekonstrukce výškového kanálu, skenovaná oblast  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ,  
 (b1, b2) – 3D rekonstrukce výškového kanálu, skenovaná oblast  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ,  
 (c1, c2) – 3D rekonstrukce výškového kanálu, zoom porézní oblasti - skenovaná oblast  $0,3 \times 0,3 \mu\text{m}^2$ .

### 6.3. Výsledky - částice syntetizované

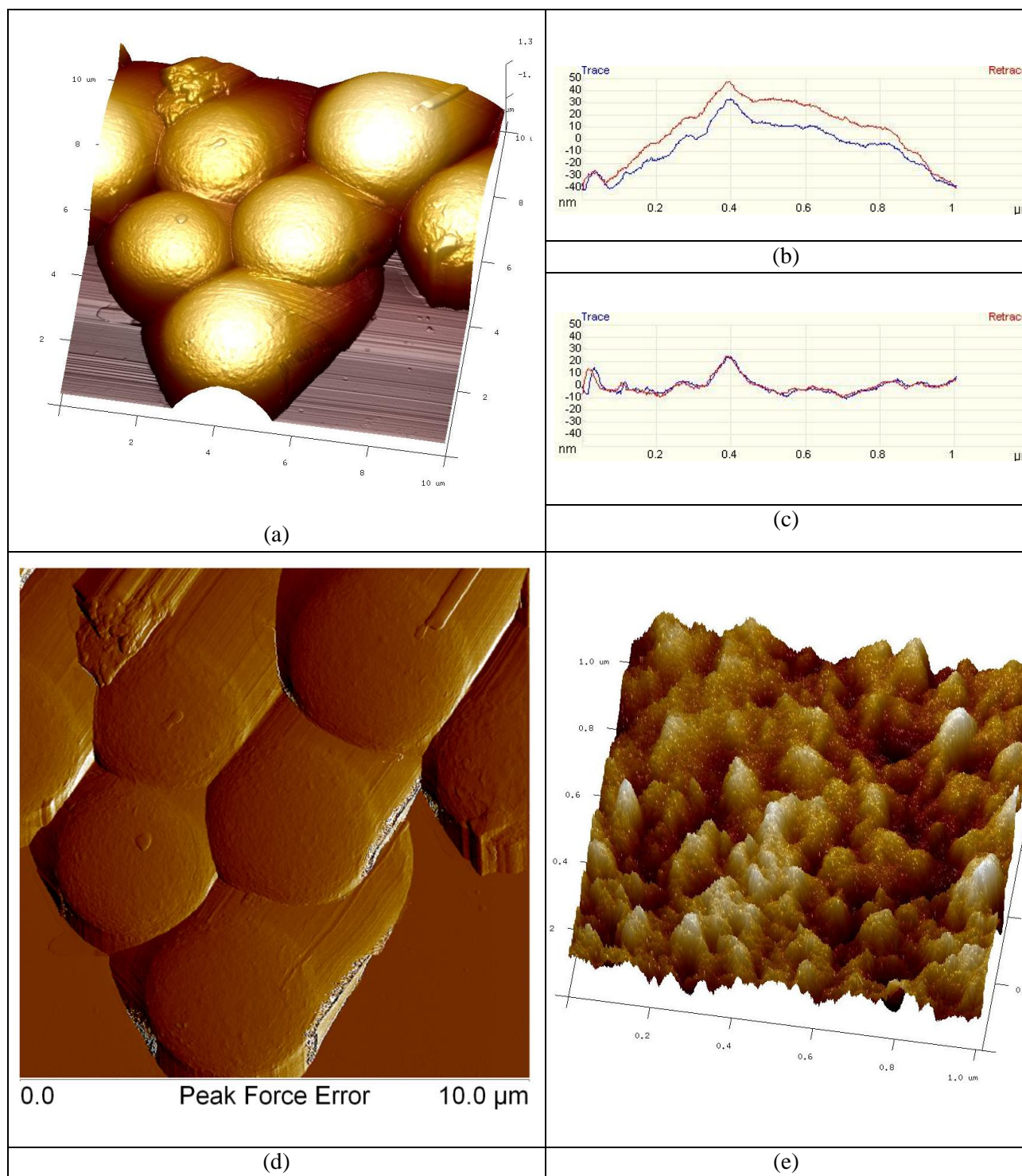


**Obr 39.:** OM snímky analyzovaných syntetizovaných částic B29 (ox), B30 (ox), B135 (ox), B77 (ox). Olympus IX 81.



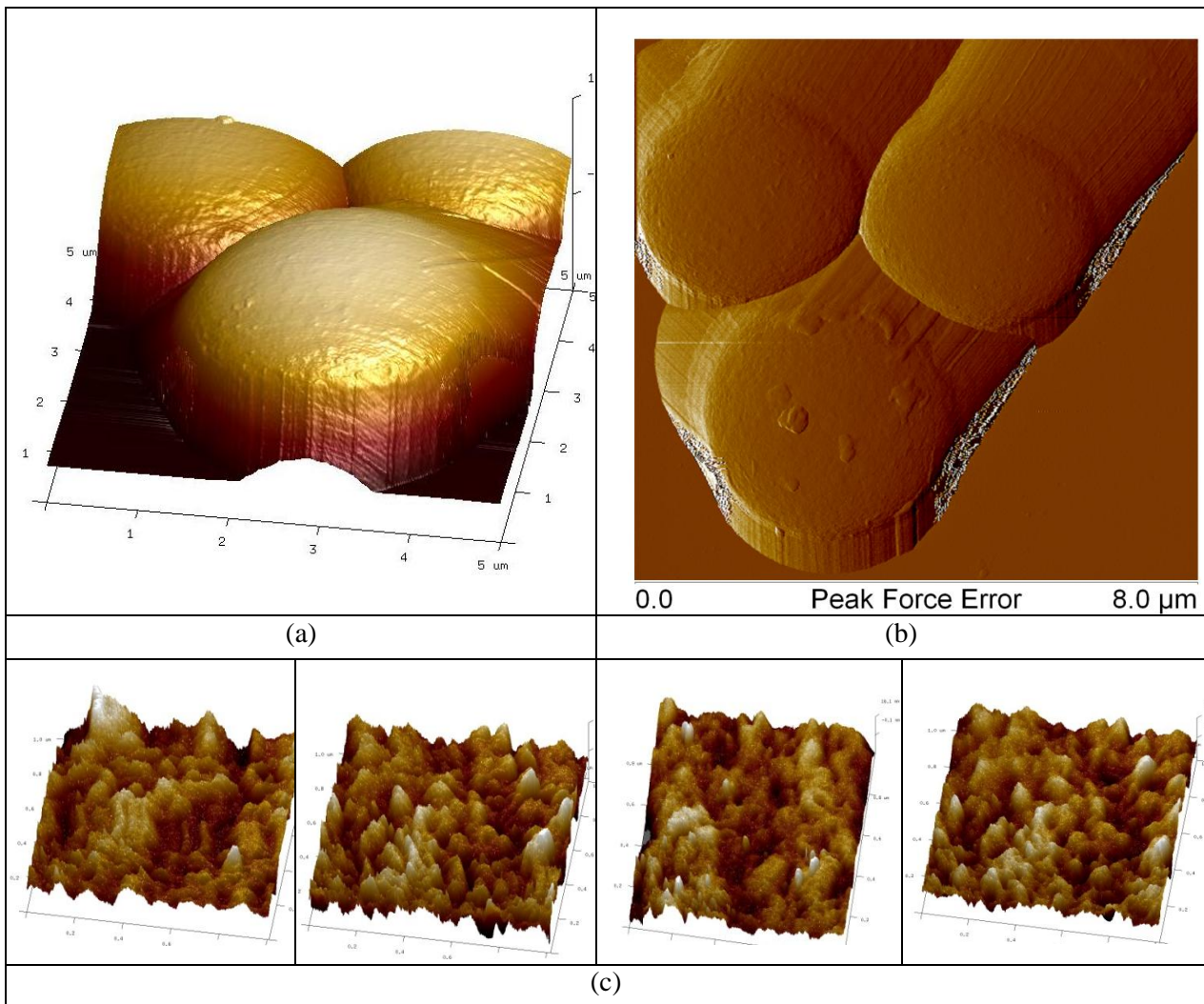
**Obr 40.:** OM snímky analyzovaných syntetizovaných částic *P(GMA-MOEA-EDMA)*; *HPS-B-M-NH2*; *HPS-B-22-NH2*, *HPS-B-21*, Olympus IX81.

## P(HEMA-co-GMA) – B29 (ox)



**Obr 41.:** AFM snímky magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA) – B29,  
 (a) 3D rekonstrukce výškového kanálu, skenovaná oblast  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ,  
 (b) Řádkový profil povrchu částice (skenovaná oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ) – bez proložení rovinou,  
 (c) Řádkový profil povrchu částice (skenovaná oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ) – proloženo rovinou 2.řádu,  
 (d) 2D rekonstrukce peak force error kanálu, skenovaná oblast  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ,  
 (e) 3D rekonstrukce výškového kanálu, zoom, skenovaná oblast – střed částice –  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ .

P(HEMA-co-GMA) – B29 (ox)



**Obr 42.:** AFM snímky magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA) – B 29 ox,

- (a) 3D rekonstrukce výškového kanálu, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ,
- (b) 2D rekonstrukce peak-force kanál, skenovaná oblast  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ ,
- (c) 3D rekonstrukce obrazu, výškový kanál, skenovaná oblast ze středu částice, plocha  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  – čtyři individuální částice, rozsah osy Z u všech AFM snímků do 30nm.

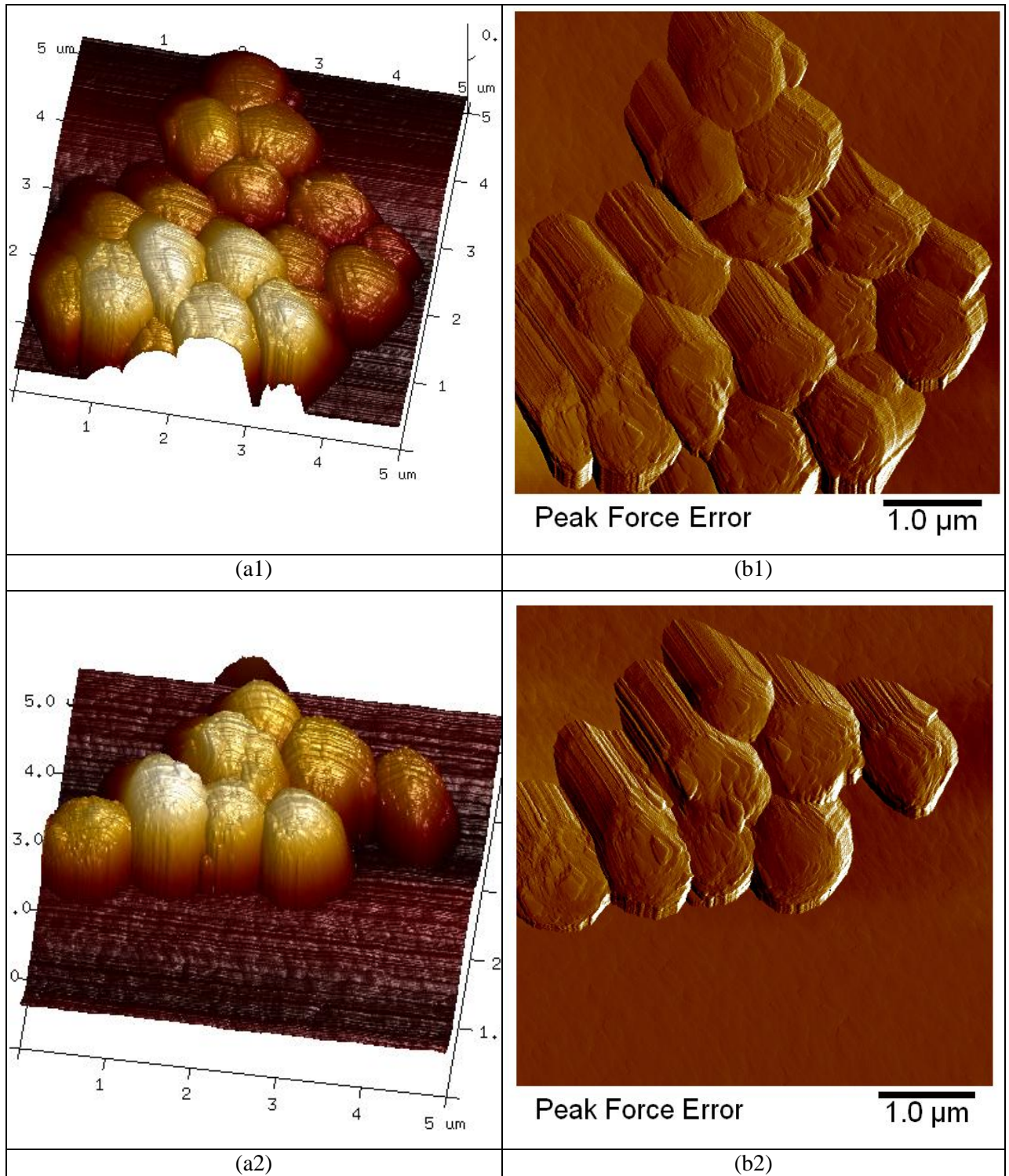
**Výstup:** B29 jsou částice pravidelného kulovitého tvaru, průměr částic je v malém rozptylu hodnot, z analýzy AFM snímků odpovídá  $d = (2,6 \text{ nm}; 3,3 \text{ nm})$ . AFM snímky nepotvrdily přítomnost vyvázaných nanočástic oxidů železa z jádra částice. Agregace částic: B29 vykazují četné shluky menšího počtu částic (2-6), stejně často se vyskytují také jednotlivé izolované částice. U větších shluků se částice nevrství do více řad nad sebou. Při porovnání výškových profilů u deseti nezávislých částic byla zjištěna tato data:

Rms (plocha $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )	Ra (plocha $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )	Rms (plocha $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ )	Ra (plocha $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ )
$5,4 \pm 0,9 \text{ nm}$	$3,6 \pm 0,9 \text{ nm}$	$3,5 \pm 0,7 \text{ nm}$	$2,3 \pm 0,7 \text{ nm}$

Jemný povrch částic B 29 je konzistentní, hladký, s minimálním výskytem hloubkových útvarů (viz obr. 41 a 42).

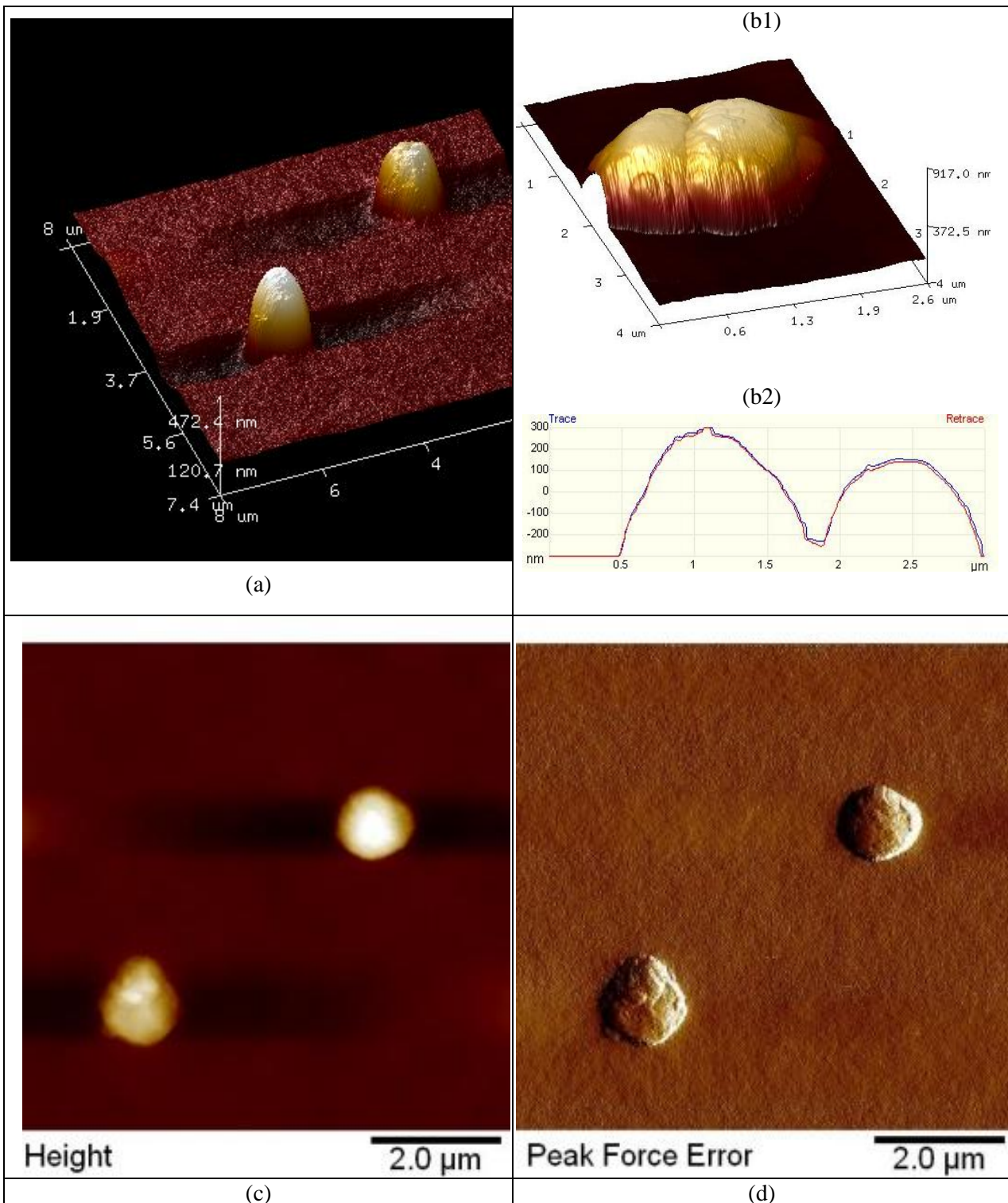


## PGMA – B 30 (ox)



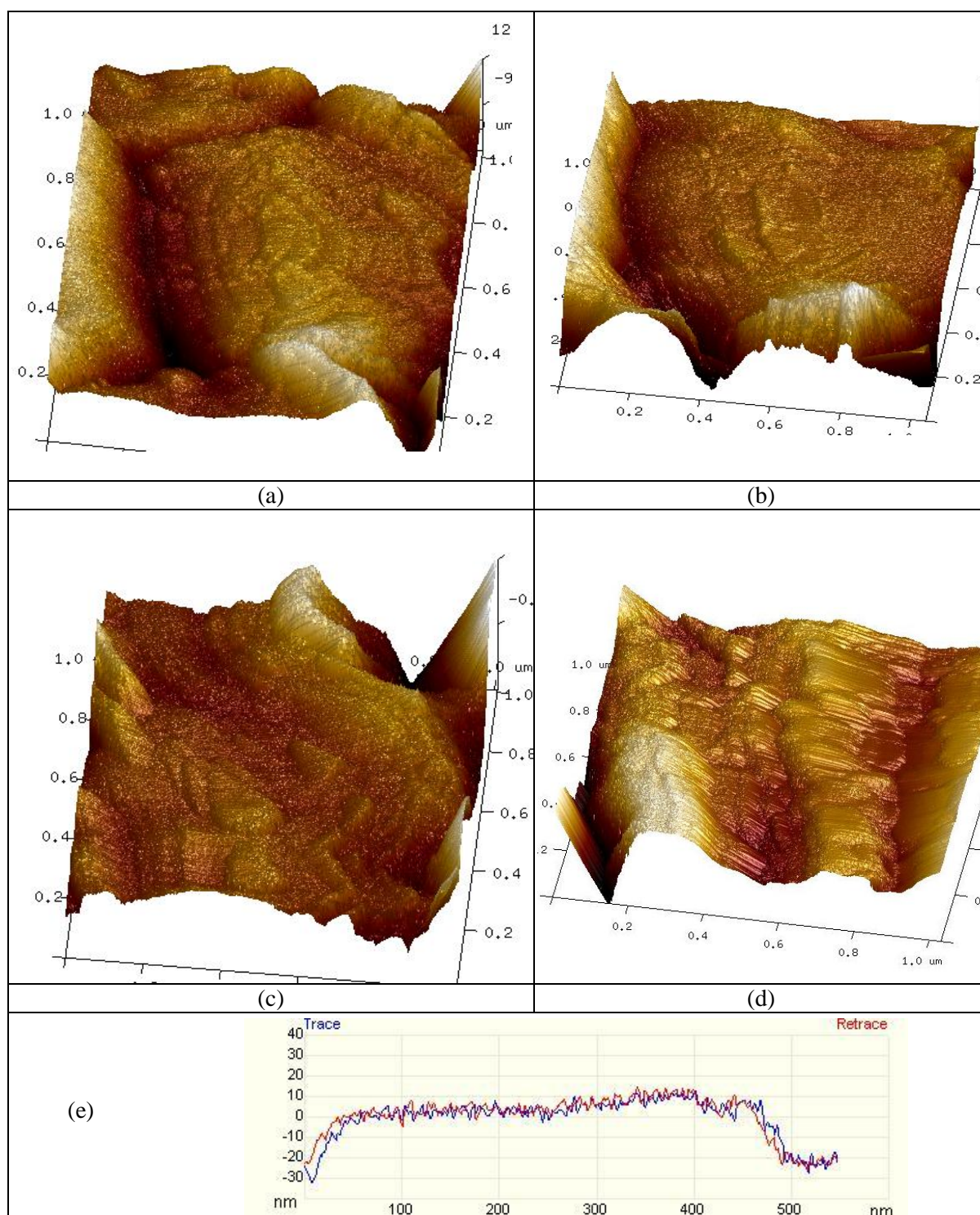
**Obr 43.:** AFM snímky magnetického nosiče PGMA – B30 (ox), různé shluky částic,  
(a1, a2) - 3D rekonstrukce výškového kanálu, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ,  
(b1, b2) - 2D rekonstrukce peak force error kanálu, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ .

PGMA – B30 (ox)



**Obr 44.:** AFM snímky magnetického nosiče PGMA – B30 (ox),  
 (a) 3D rekonstrukce výškového kanálu skenovaná oblast  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ ,  
 (b) shluk dvou částic (b1) 3D rekonstrukce výškového kanálu, (b2) sken řádku středem částic,  
 (c) 2D rekonstrukce výškového kanálu; skenovaná oblast  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ ,  
 (d) 2D rekonstrukce peak force error kanálu; skenovaná oblast  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ .

PGMA – B30 (ox)



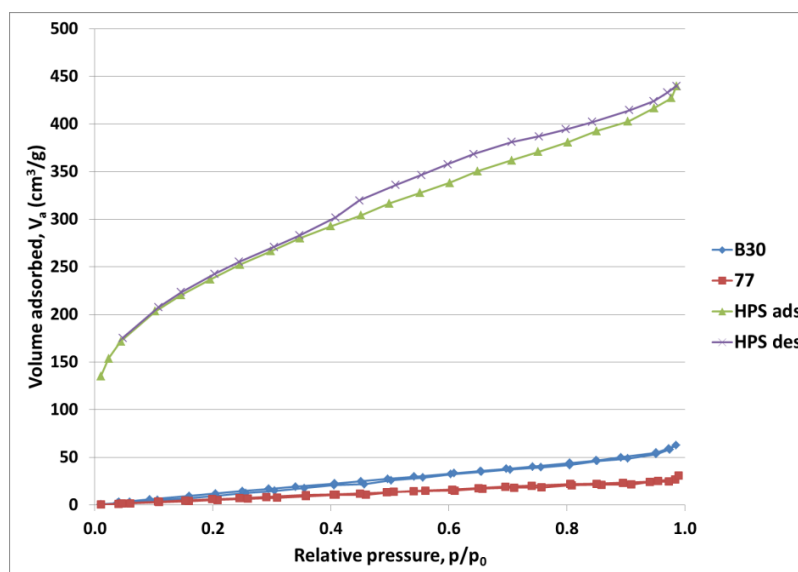
**Obr 45.:** AFM snímky magnetického nosiče PGMA – B30,  
 (a) až (d) - 3D rekonstrukce výškového kanálu, snímky různých částic, skenovaná oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ;  
 (e) řádkový profil veden středem částice. Snímek vystihuje distribuci výškového profilu povrchu částice.

**Výstup: B30 (ox)** jsou částice pravidelného kulovitého tvaru, průměr částic je ve velmi malém rozptylu okolo dodané průměrné hodnoty 0,74  $\mu\text{m}$ . AFM snímky nepotvrdily přítomnost vyvázaných nanočástic oxidů železa z jádra částice. Agregace: četné jsou přítomné shluky 2-10 částic, i výskyt izolovaných částic. U shluků je běžné uspořádání částic do řetízků. Při větším množství (cca 30 a více částic) se částice vrství do shluků tvořených z více vrstev nad sebou.

BET analýza: Při použití sorpčního plynu  $\text{N}_2$  byl stanoven povrch částic 71,5  $\text{m}^2/\text{g}$  částic, měření však vykazovalo systémové nedostatky. Při použití sorpčního plynu Kr byl stanoven povrch částic: 3,3  $\text{m}^2/\text{g}$  částic. Tato druhá hodnota je stanovena z BET izotermy (viz **obr. 46**, modrá křivka), jejíž tvar indikuje částice s neporézním povrchem. Tato zjištění odpovídají výsledkům AFM měření a analýzy drsnosti, kdy měření poukázala na hladký, konzistentní povrch bez přítomnosti pórů.

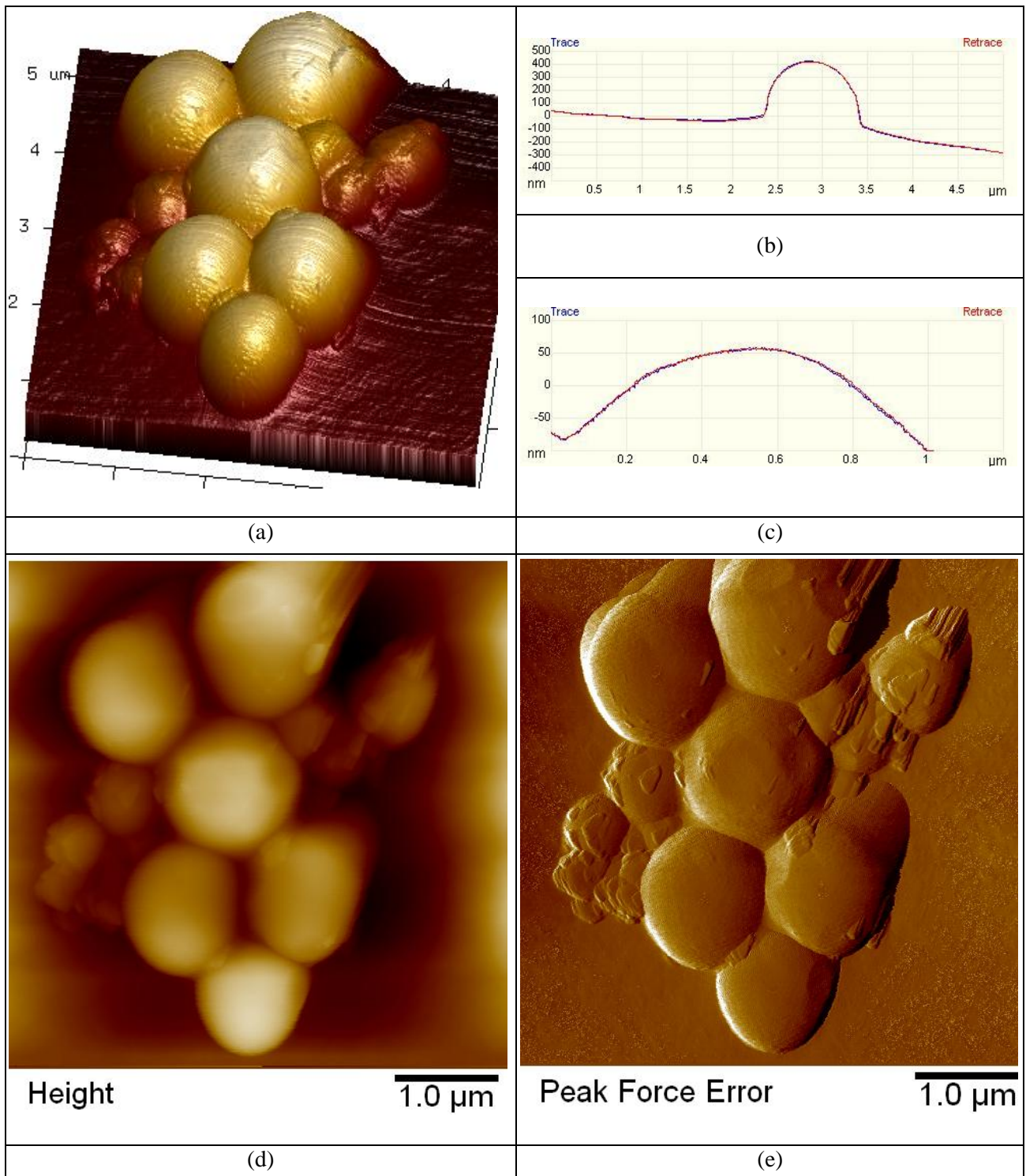
AFM analýza: Jemný povrch částice je konzistentní, poměrně hladký, s ojedinělým výskytem hloubkových či povrchově vystouplých útvarů o velikosti do deseti nm (**obr. 43** až **obr. 45**). Při porovnání výškových profilů jemného povrchu z deseti naměřených jednotlivých částic byla zjištěna tato data:

<i>Rms (plocha 1x1 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Ra (plocha 1x1 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Rms (plocha 0,2x0,2 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Ra (plocha 0,2x0,2 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>
-	-	5,4 $\pm$ 1,1 nm	4,4 $\pm$ 1,1 nm



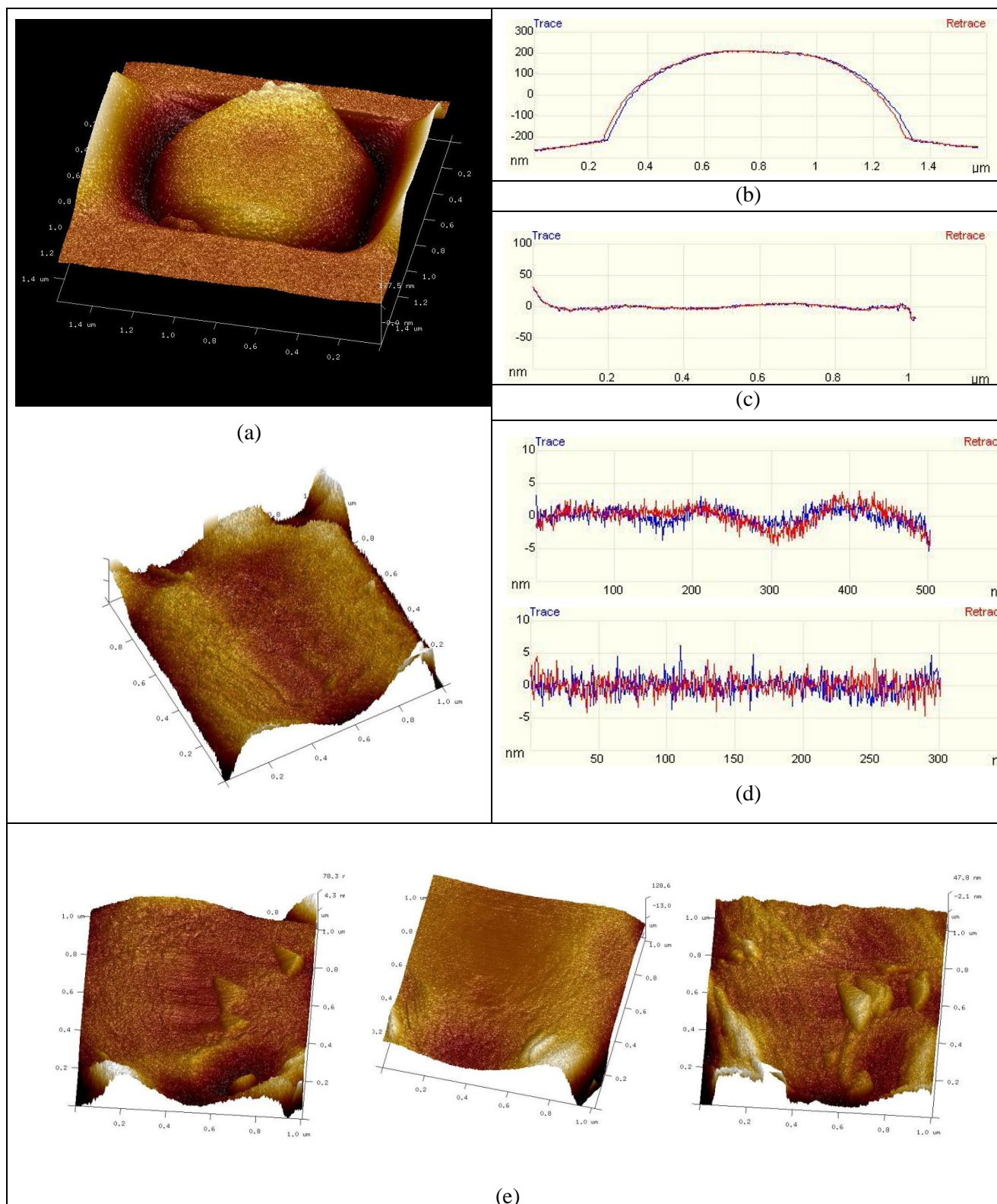
**Obr 46.:** BET izotermy analyzovaných částic B 30 ox (modrá křivka); B 77 (červená křivka) a HPS-B 21 (zelená a fialová křivka).

## PGMA – B 135 OX

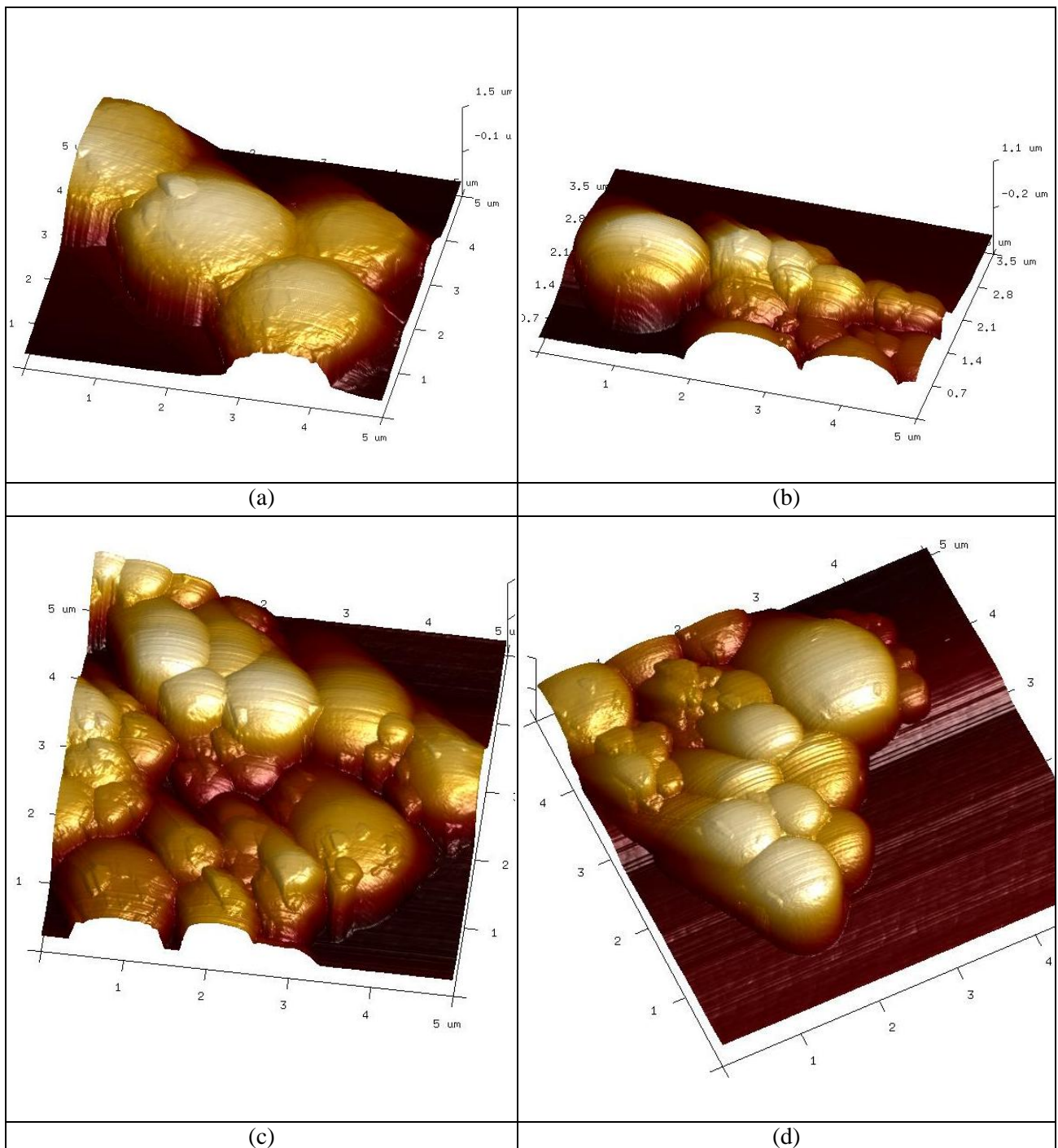


**Obr 47.:** AFM snímky magnetického nosiče PGMA – B135 ox, (a, d, e) snímek shluku částic, (b, c) snímek profilu izolované částice; (a) 3D rekonstrukce výškového kanálu, snímek shluku částic, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , (d) 2D rekonstrukce výškového kanálu, snímek shluku částic, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , (e) 2D rekonstrukce peak – force error kanálu, snímek shluku částic, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ .

## PGMA – B 135 OX



**Obr 48.:** AFM snímky magnetického nosiče PGMA – B135 ox; (a) - 3D rekonstrukce povrchu izolované častice, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  a  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , (b, c, d) řádkový profil vedený středem častice, různý zoom, (e)- 3D rekonstrukce výškového kanálu, snímek jemného povrchu tří různých častic, skenovaná oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ .



**Obr 49.:** AFM snímky magnetického nosiče PGMA – B135 ox; , (a-d) - 3D rekonstrukce výškového kanálu, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , snímky shluku částic ilustrují širokou distribuci velikostí a nadměrné shlukování částic.

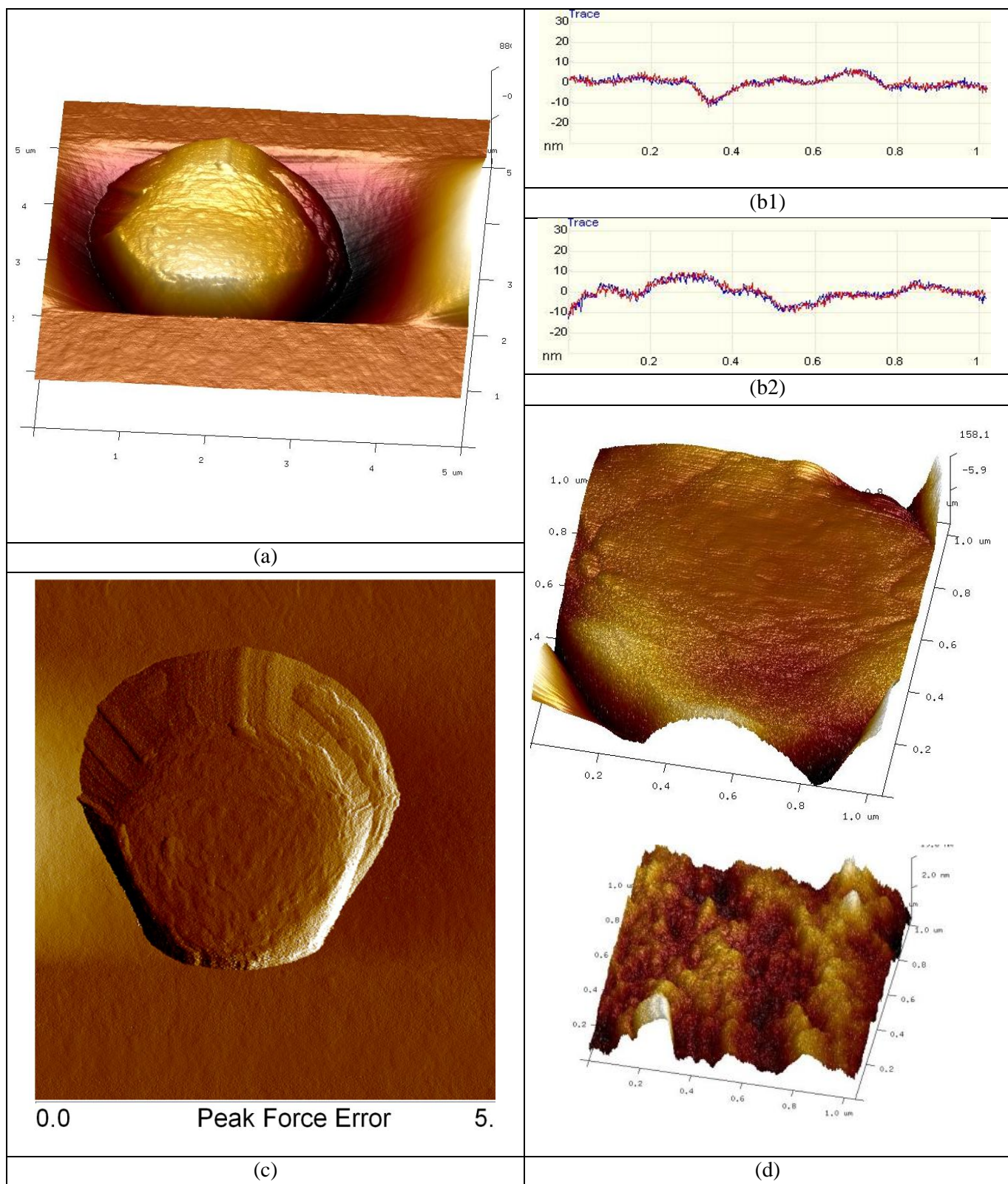
**Výstup: B 135 ox** jsou částice pravidelného kulovitého tvaru, průměr částic vykazuje nejširší distribuci velikostí okolo průměrné hodnoty 1,16  $\mu\text{m}$ . AFM snímky nepotvrdily přítomnost vyvázaných nanočástic oxidů železa z jádra částice. Částice B 135 ox vykazují největší míru agregace ze všech studovaných částic v první skupině. Částice se seskupují zpravidla do shluků 3-8 částic, čtené je uspořádání částic do řetízků. Ojedinele se vyskytují také izolované částice. U shluků tvořených větším počtem částic (30 a více) se částice vrství do více řad nad sebou.

Jemný povrch částice je konzistentní, zpravidla hladký, s minimálním výskytem hloubkových útvarů (viz **obr. 47-49**). Při porovnání výškových profilů u deseti nezávislých částic byla zjištěna tato data:

<i>Rms (plocha 1x1 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Ra (plocha 1x1 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Rms (plocha 0,2x0,2 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Ra (plocha 0,2x0,2 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>
-	-	2,1 $\pm$ 0,4 nm	1,6 $\pm$ 0,3 nm

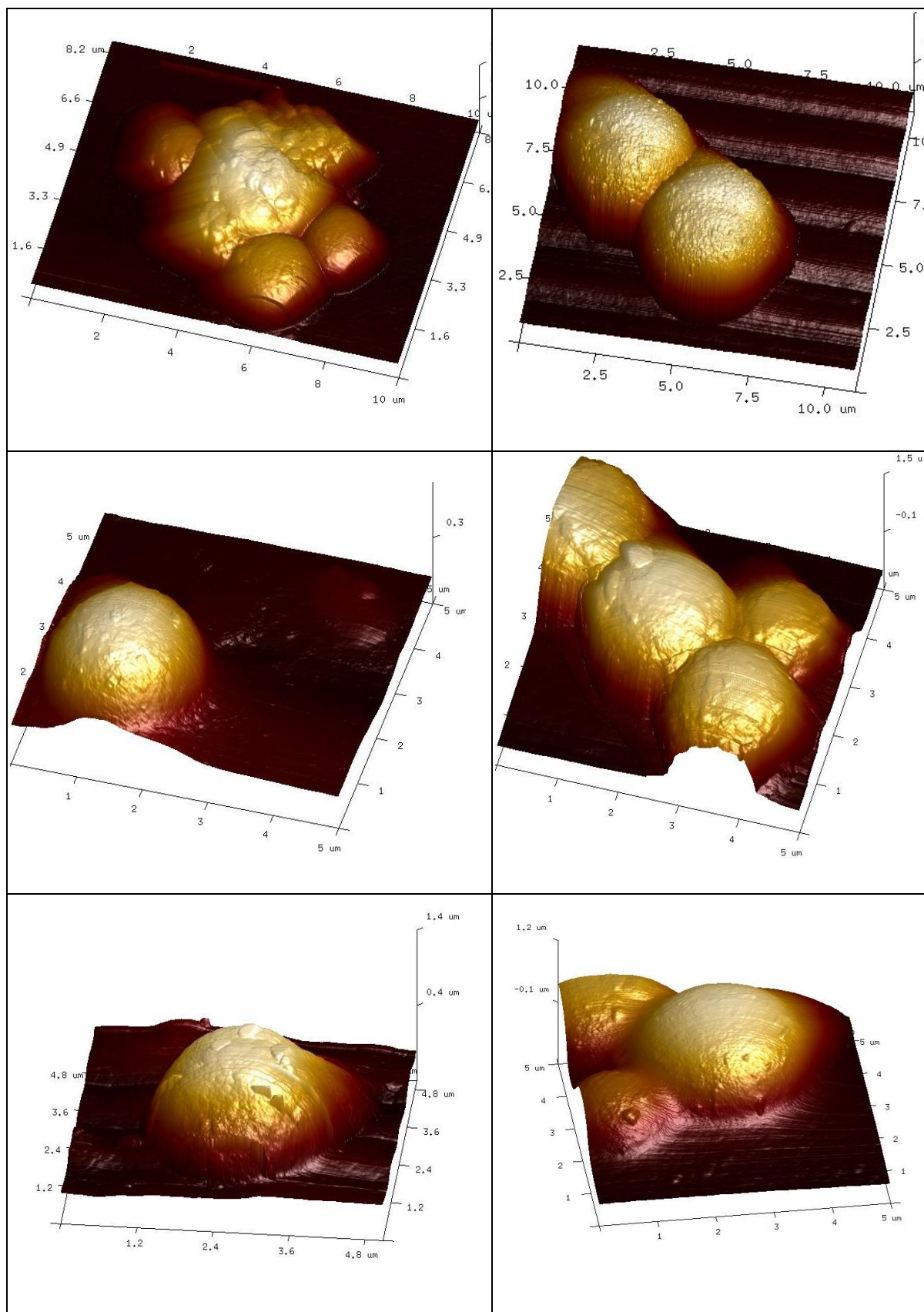


## PGMA – B 77 OX

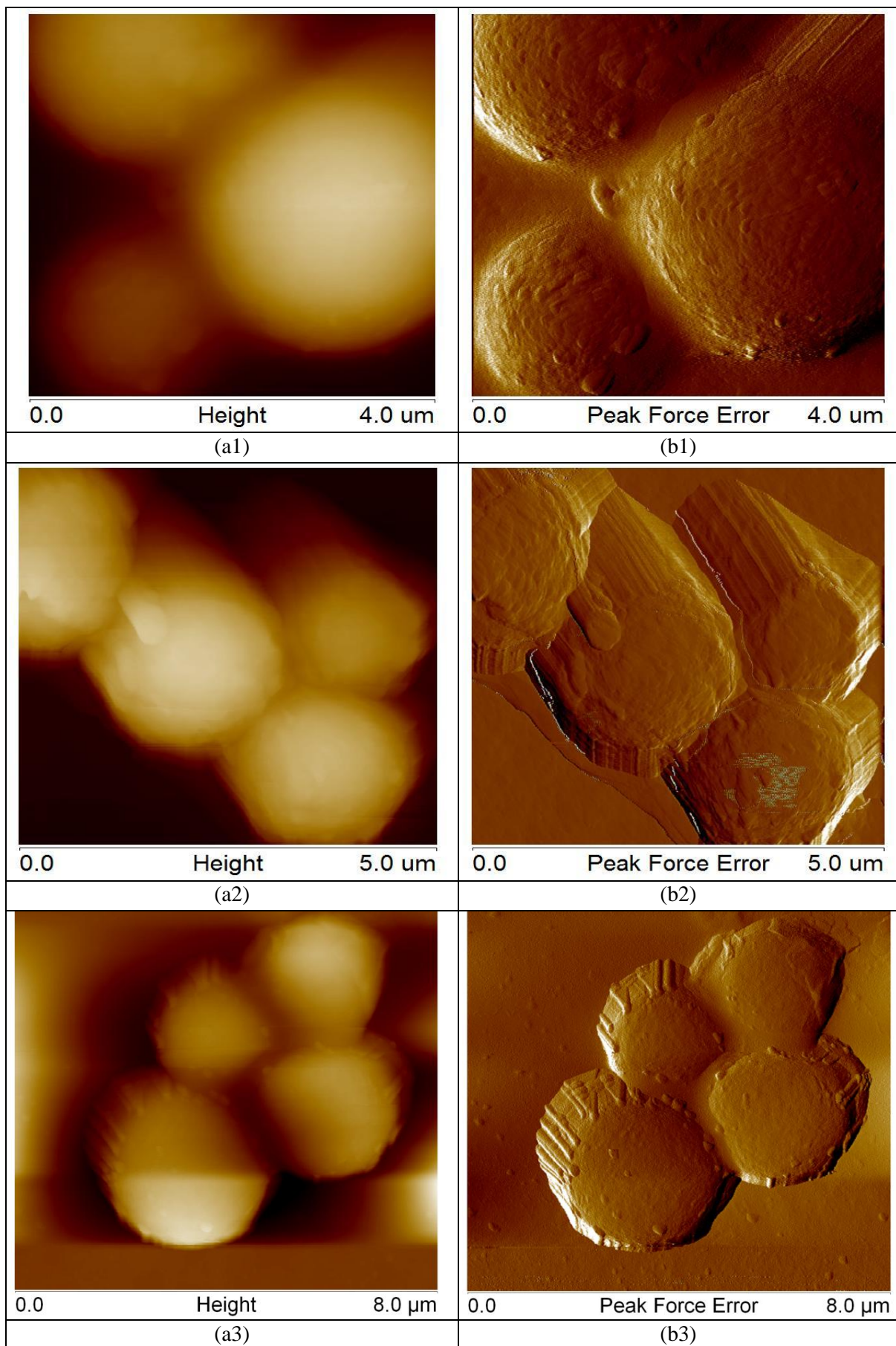


**Obr 50.:** AFM snímky PGMA – B77ox (a, c) scan celé částice, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ; (a) 3D projekce výškového kanálu, (b1,b2) řádkový profil vedený středem částice, (c) 2D projekce peak force error kanálu, (d) 3D projekce středu menší částice a větší částice, skenovaná oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , proloženo rovinou druhého řádu.

PGMA – B 77 OX

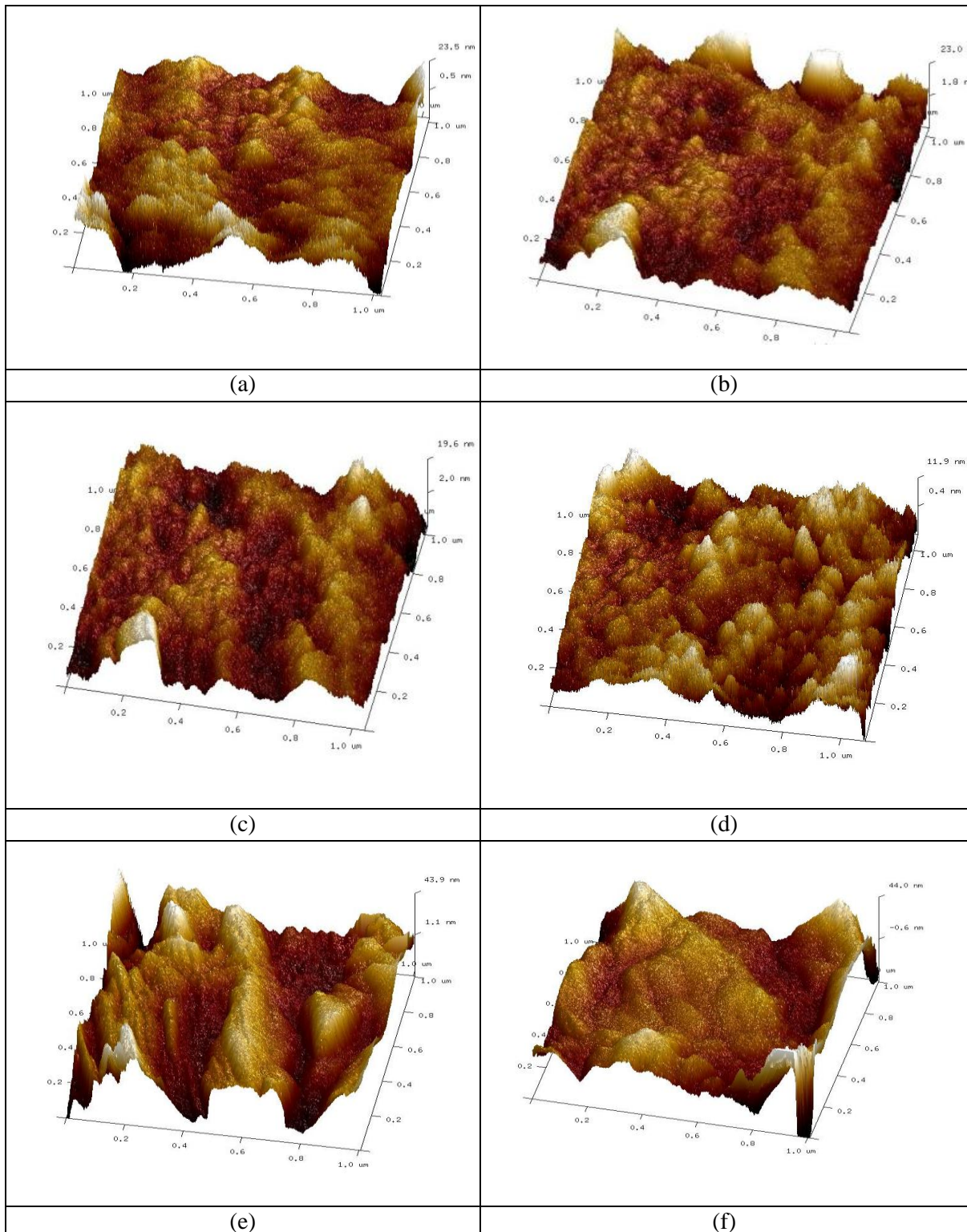


**Obr 51.:** AFM snímky PGMA – B77ox , 3D rekonstrukce výškového kanálu, scan celých částic, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ .



**Obr 52.:** AFM snímky PGMA – B77ox, 2D rekonstrukce (a) výškového (b) peak-force kanálu, (1,2,3) tři různé skupiny částic, skenovaná oblast (a1, b1)  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ , (a2, b2)  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , (a3, b3)  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ .

PGMA – B 77 OX



**Obr 53.:** AFM snímky PGMA – B77ox , 3D rekonstrukce výškového kanálu, zoom středem různých částic, skenovaná oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , (a – d) profil hladkých částic, maximální hodnoty v ose Z v rozsahu 10–15 nm; (e, f) profil méně hladkých částic, maximální hodnoty Z u nejvyšších výškových objektů v rozsahu 20 až 40 nm.

**Výstup: B 77 ox** jsou částice pravidelného kulovitěho tvaru, průměr částic vykazuje poměrně širokou distribuci okolo průměrné hodnoty 2,23  $\mu\text{m}$ . AFM snímky nepotvrdily přítomnost vyvázaných nanočástic oxidů železa z jádra částice. Agregace: u částic B 77 ox je častý výskyt shluků 3-6 částic, četný je také výskyt ojedinělých, izolovaných částic. Shluky většího počtu částic (20 a více částic) zpravidla vrství částice do více řad nad sebou.

**AFM analýza** jemného povrchu částic „odhalila“ dva typy částic, lišící se maximy svých povrchových útvarů v ose Z. Vizualizováno např. na **obr. 51d** a **obr. 53**.

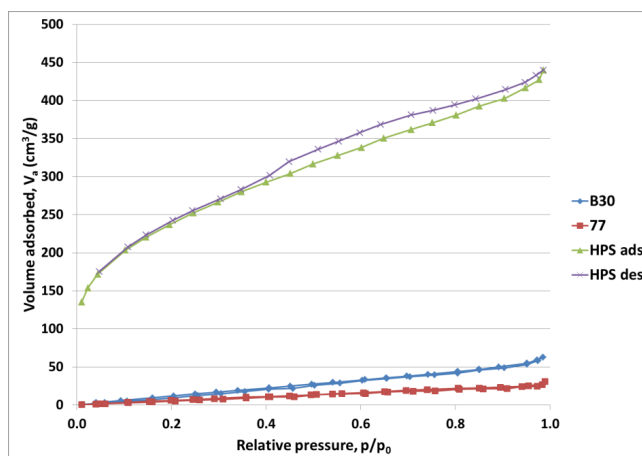
Částice s hladkým povrchem (plocha  $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ ):  $R_{ms} 1,6 \pm 0,3 \text{ nm}$ ;  $R_a 1,3 \pm 0,4 \text{ nm}$

Částice s hrubším povrchem (plocha  $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ ):  $R_{ms} 2,7 \pm 0,4 \text{ nm}$ ;  $R_a 2,3 \pm 0,5 \text{ nm}$

Průměrné hodnoty (z 15 individuálních částic):

$R_{ms}$ (plocha $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )	$R_a$ (plocha $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )	$R_{ms}$ (plocha $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ )	$R_a$ (plocha $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ )
$4,6 \pm 1,3 \text{ nm}$	$3,4 \pm 0,8 \text{ nm}$	$2,3 \pm 0,4 \text{ nm}$	$2,0 \pm 0,6 \text{ nm}$

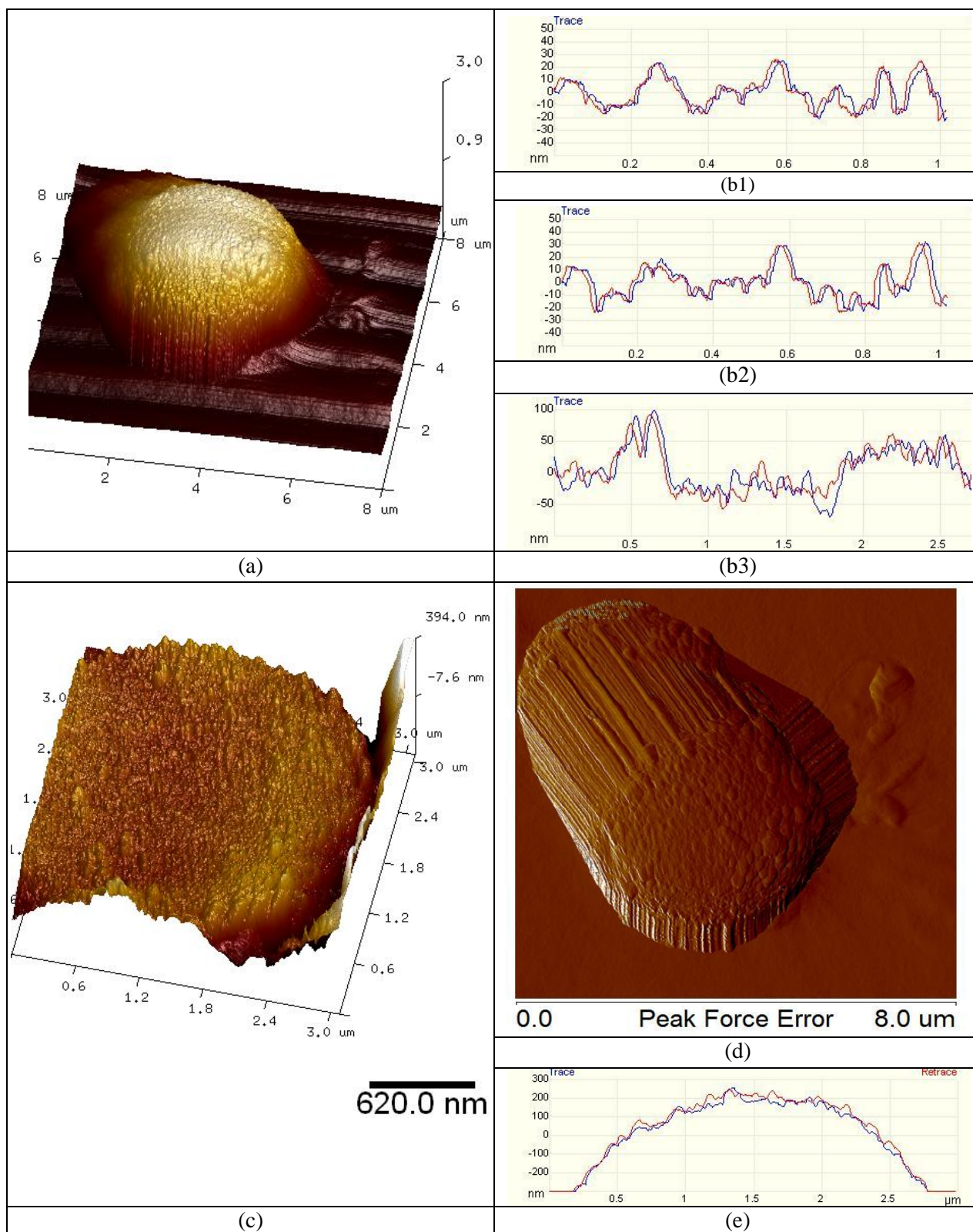
**BET analýza:** Při použití sorpčního plynu  $\text{N}_2$  byl stanoven povrch částic  $36,3 \text{ m}^2/\text{g}$  částic, měření však vykazovalo systémové nedostatky. Při použití sorpčního plynu Kr byl stanoven povrch částic:  $1,47 \text{ m}^2/\text{g}$  částic. Tato druhá hodnota je stanovena z BET izotermu (viz **obr. 54**, červená křivka) jejíž tvar indikuje hladké částice s neporézním povrchem. Tato zjištění odpovídají výsledkům AFM měření a analýzy drsnosti, kdy měření prokázala velmi hladký, konzistentní povrch magnetických nosičů PGMA B 77 ox.



**Obr 54.:** BET izotermu analyzovaných částic B 30 ox (modrá křivka); B 77 (červená křivka) a HPS-B - 21 (zelená a fialová křivka).

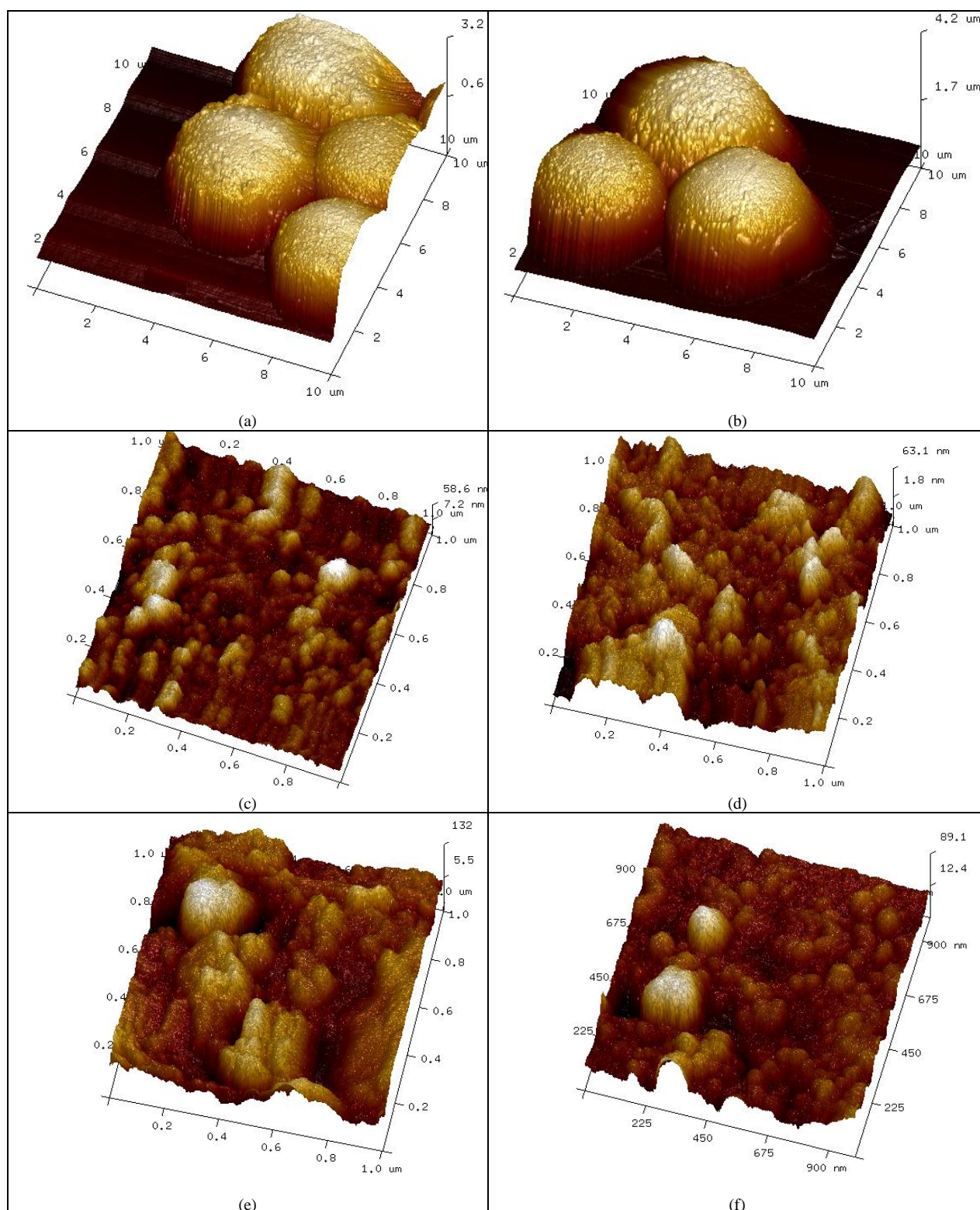
U částic **B 77 ox** lze na základě AFM měření a BET analýzy konstatovat, že jde o velmi hladké částice s bez přítomnosti pórů. Zároveň bylo z hlediska AFM měření nejtěžší částice B 77 ox podrobit kvalitnímu AFM snímání, neboť velmi často pod skenujícím hrotem vibrovaly. Uchycení B 77 bylo nejméně stabilní ze všech studovaných částic v první skupině.

## P(GMA – MOEAA – EDMA)



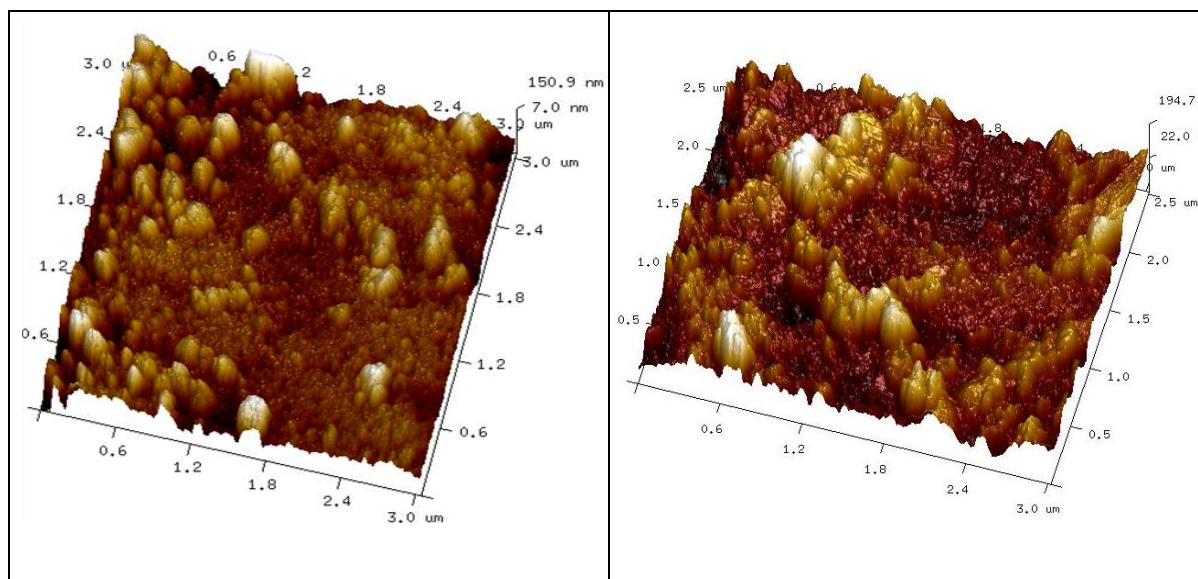
**Obr 55.:** AFM snímky magnetického nosiče P(GMA –MOEAA–EDMA), (a, c) 3D rekonstrukce výškového kanálu, různé individuální částice: (a) skenovaná oblast 8x8 μm<sup>2</sup> (c) skenovaná oblast 3x3 μm<sup>2</sup>, (d) 2D rekonstrukce peak-force error kanálu, skenovaná oblast 8x8μm<sup>2</sup> (b,e) řádkový profil vedený středem částice, různé částice, (b1, b2) řádek 1μm (b3, e) řádek 3μm, pozn: u řádkového profilu (b3) výšková data proložena rovinou 2 řádu.

P(GMA-MOEAA-EDMA)



**Obr 56.:** AFM snímky magnetického nosiče **P(GMA-MOEAA-EDMA)**, 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu; (a,b) morfologie tvaru různých částic, skenovaná oblast  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ , (c-f) jemný detail povrchu částice skenovaná oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ .

## P(GMA-MOEAA-EDMA)



**Obr 57.:** AFM snímky magnetického nosiče P(GMA-MOEAA-EDMA), 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu, skenovaná oblast  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ .

**Výstup:** P(GMA-MOEAA-EDMA) jsou velké částice pravidelného symetrického kulovitého tvaru, průměr částic vykazuje poměrně úzkou distribuci okolo průměrné hodnoty  $4,8 \mu\text{m}$ . AFM snímky nepotvrdily přítomnost vyvázaných nanočástic oxidů železa z jádra částice. Agregace: přítomny shluky i izolované částice, částice se nevrství do více řad nad sebou.

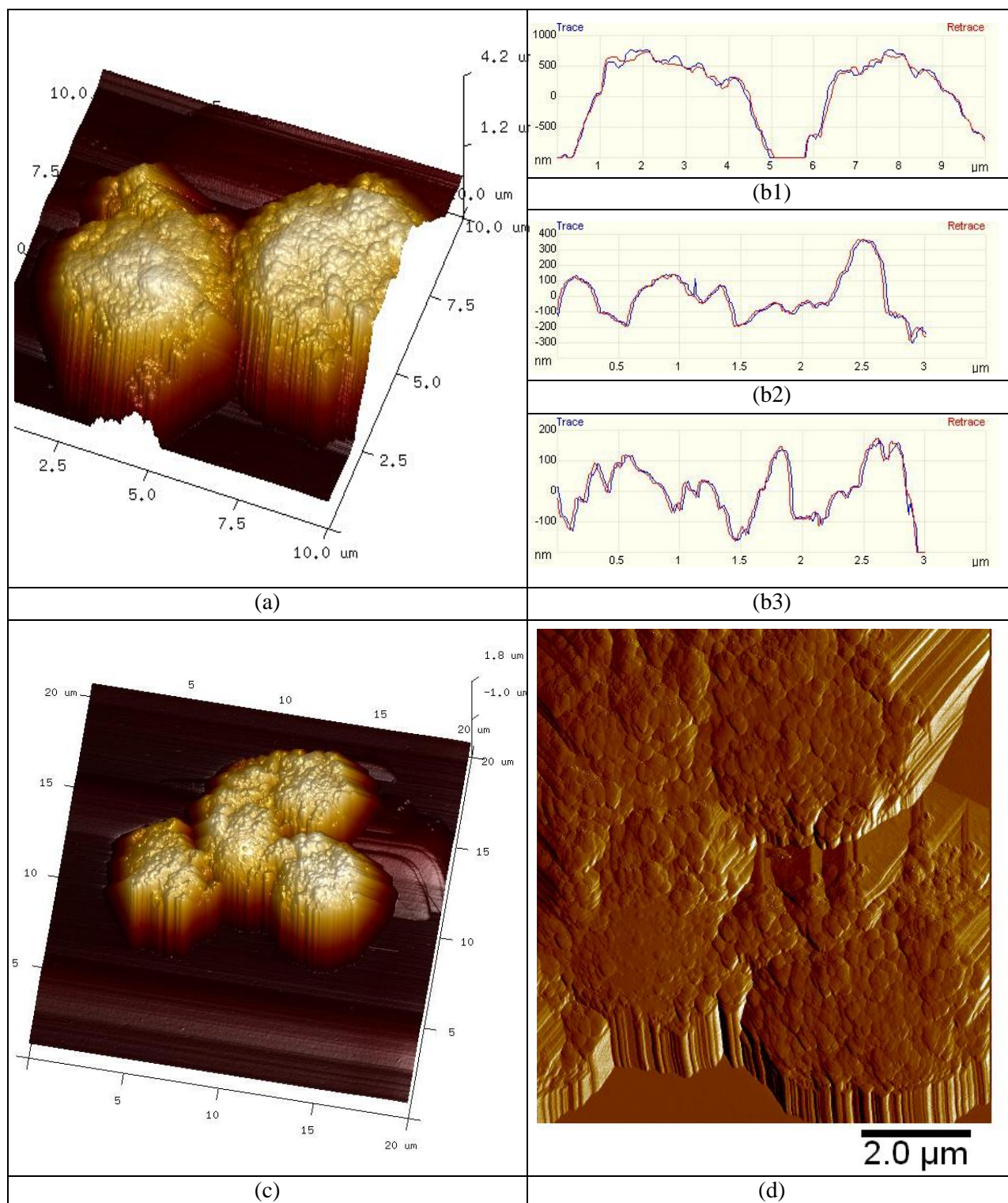
Jemný povrch částice je konzistentní, s výraznou strukturou s četným výskytem menších hloubkových útvarů, které však nemají pravidelnou strukturu či tvar (viz **obr. 55-57**).

Při porovnání výškových profilů u patnácti nezávislých částic byla zjištěna tato data:

<i>Rms</i> (plocha $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )	<i>Ra</i> (plocha $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )	<i>Rms</i> (plocha $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ )	<i>Ra</i> (plocha $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ )
$16,6 \pm 4,2 \text{ nm}$	$9,6 \pm 3,8 \text{ nm}$	$11,0 \pm 3,9 \text{ nm}$	$8,9 \pm 3,4 \text{ nm}$

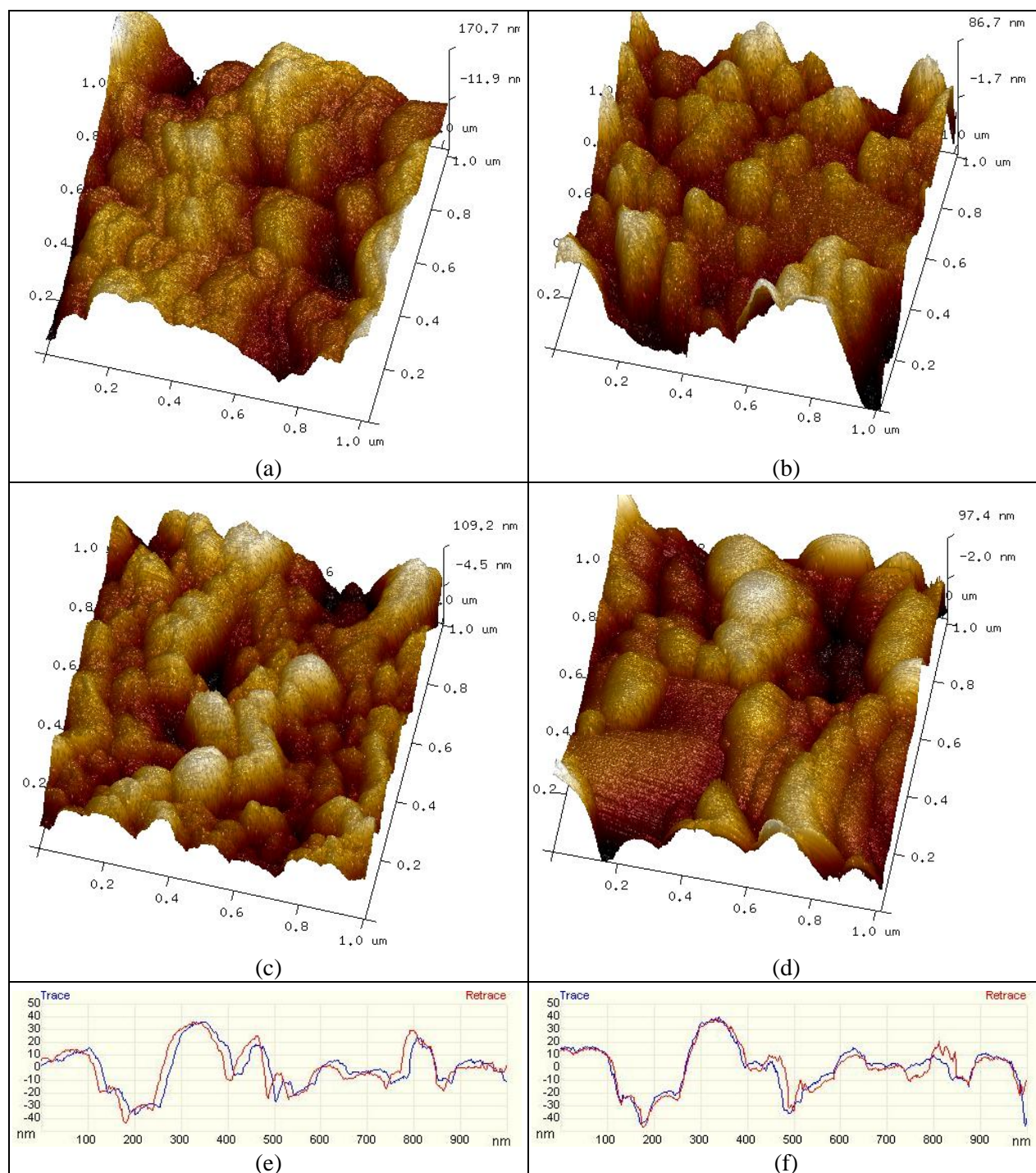


## HPS-B-M-NH<sub>2</sub>



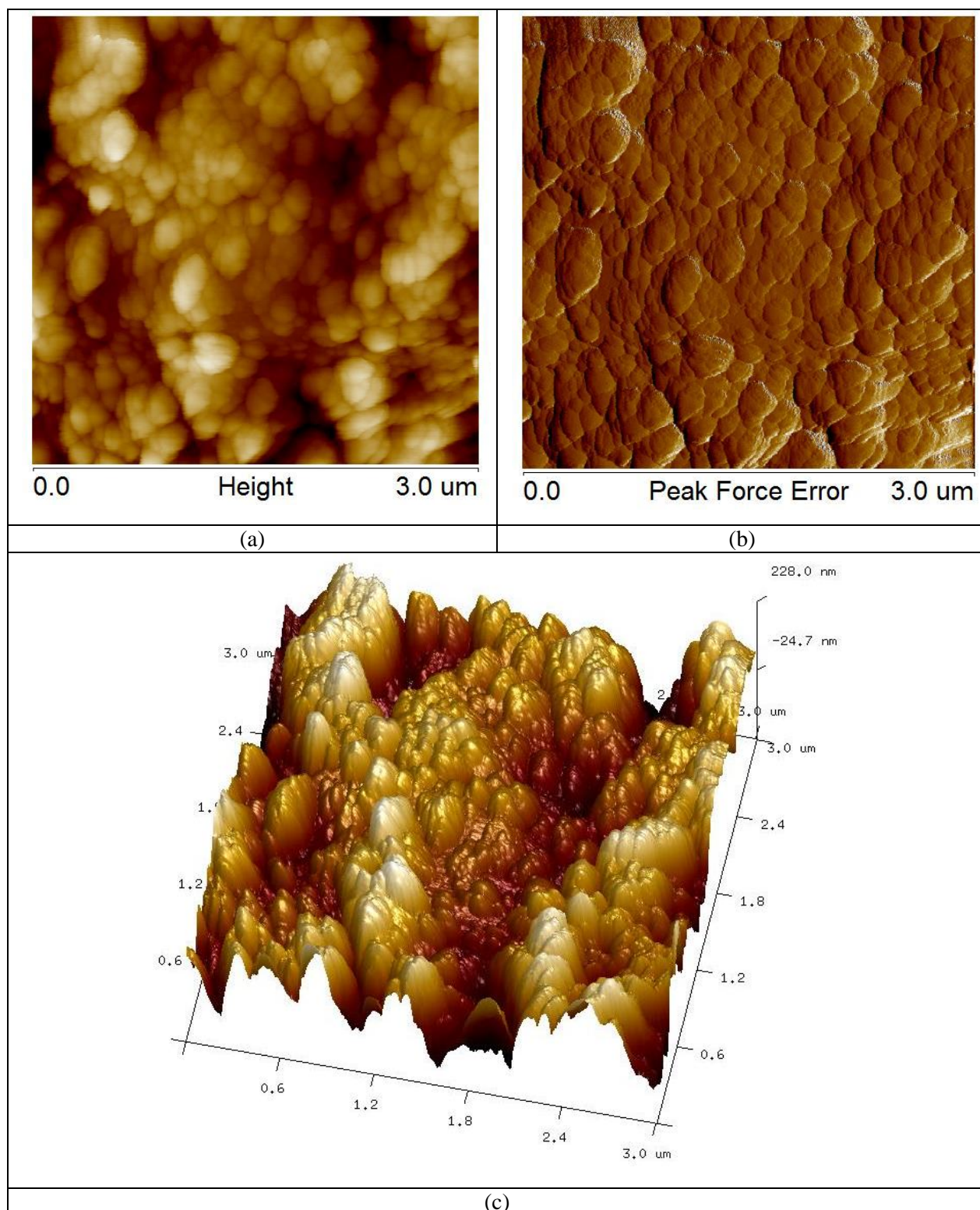
**Obr 58.:** AFM snímky magnetického nosiče HPS-B-M-NH<sub>2</sub>, (a, c) 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu, shluky částic, různé částice; (a) skenovaná oblast 10x10 μm<sup>2</sup>, (c) skenovaná oblast 20x20 μm<sup>2</sup> (b) řádkový profil středem částice, proloženo rovinou druhého řádu, (b1) délka 10 μm, (b2, b3) délka 3 μm, (d) 2D rekonstrukce obrazu, peak force error kanál, skenovaná oblast 10x10 μm<sup>2</sup>, týž částice jako v (c).

HPS-B-M-NH<sub>2</sub>



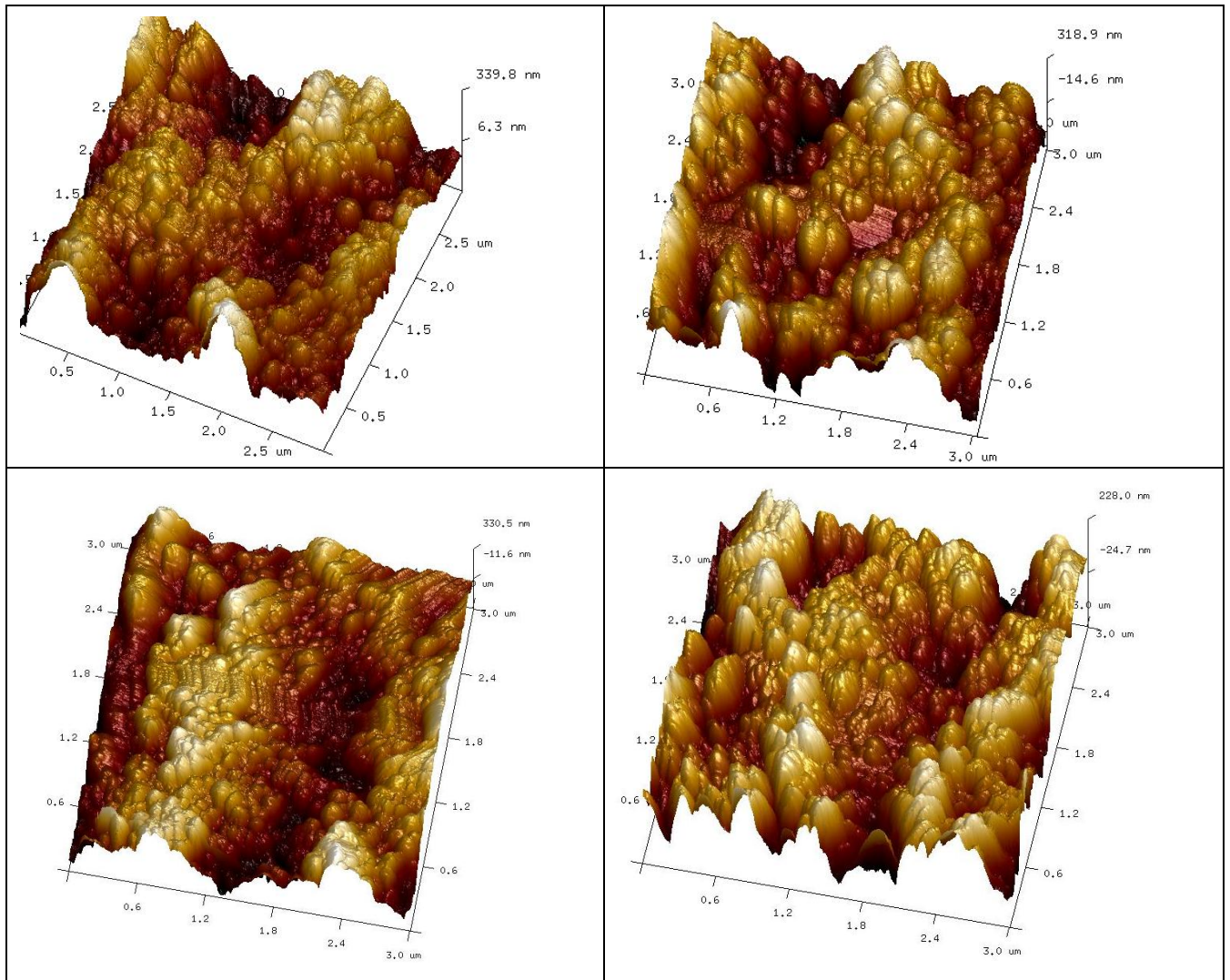
**Obr 59.:** AFM snímky magnetického nosiče HPS-B-M-NH<sub>2</sub>, (a-d) 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu; skenovaná oblast 1x1 μm<sup>2</sup>, (e, f) řádkový profil jemného detailu povrchu částice, proloženo rovinou druhého řádu, délka řádku 1 μm.

HPS-B-M-NH<sub>2</sub>



**Obr 60.:** AFM snímek magnetického nosiče **HPS-B-M-NH<sub>2</sub>**, různé vizualizace naměřených dat z téže skenované oblasti, skenovaná oblast  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ , (a) 2D rekonstrukce obrazu výškového kanálu, (b) 2D rekonstrukce obrazu peak force error kanálu (c) 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu.

HPS-B-M-NH<sub>2</sub>



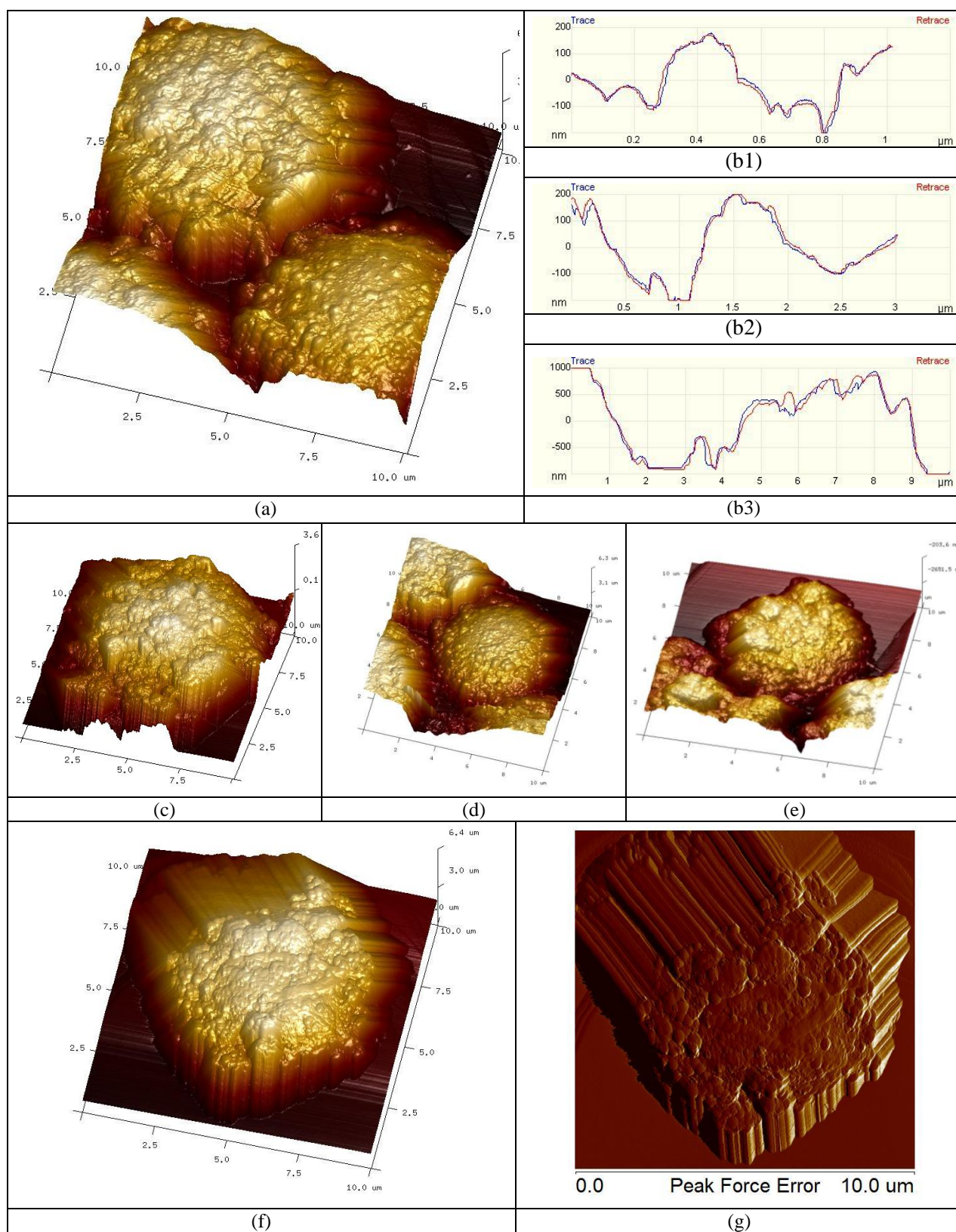
**Obr 61.:** AFM snímek magnetického nosiče HPS-B-M-NH<sub>2</sub>, 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu středu různých částic, skenovaná oblast 3x3μm<sup>2</sup>.

**Výstup:** HPS-B-M-NH<sub>2</sub> jsou velké kulové částice nepravidelného tvaru, s širší distribucí velikosti částic;  $d < 3,2$  ;  $5,2 > \mu\text{m}$ , medián průměru částice: 4,15 μm, modus průměru částice: 3,9 μm. Shluky částic i individuální částice bylo velmi obtížné skenovat z důvodu konvoluce velikosti hrotu a částice a vlastního pohybu částice pod hrotem během skenování. Částice HPS-B-M-NH<sub>2</sub> vykazují zřetelnou strukturu, s četným zastoupením rýh či propadlin. Tyto útvary jsou však zpravidla menšího rozsahu – o ploše cca 100x200 μm<sup>2</sup>, viz **obr. 58-61**. AFM snímky nepotvrdily přítomnost vyvázaných nanočástic oxidů železa z jádra částice. Částice se nevrství do více řad nad sebou.

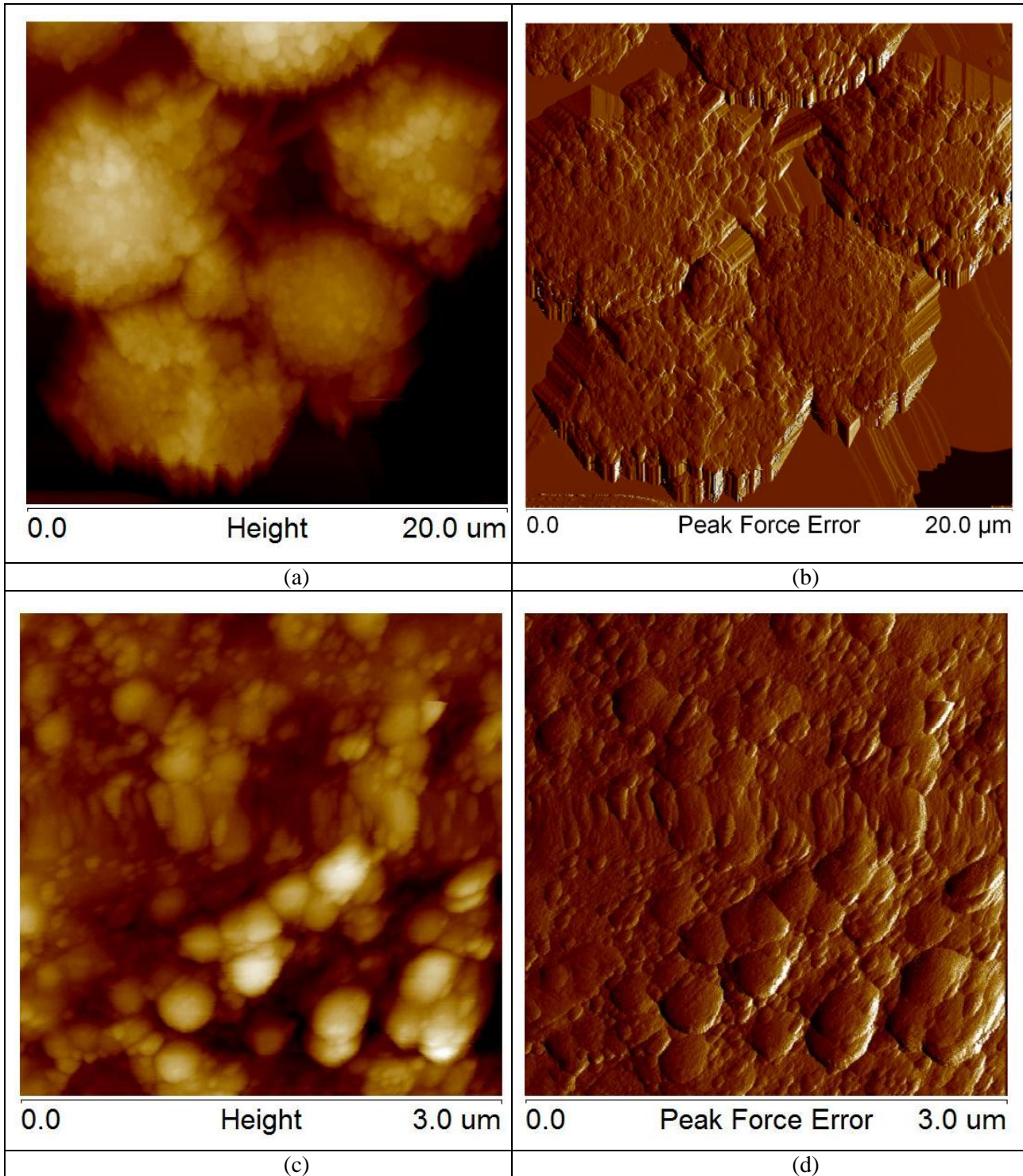
Při porovnání výškových profilů u patnácti nezávislých částic byla zjištěna tato data:

Rms (plocha 1x1 μm <sup>2</sup> )	Ra (plocha 1x1 μm <sup>2</sup> )	Rms (plocha 0,2x0,2 μm <sup>2</sup> )	Ra (plocha 0,2x0,2 μm <sup>2</sup> )
32,2 ± 10,5 nm	25,2 ± 7,6 nm	18,4 ± 4,9 nm	14,6 ± 3,8 nm

## HPS-B-22-NH<sub>2</sub>

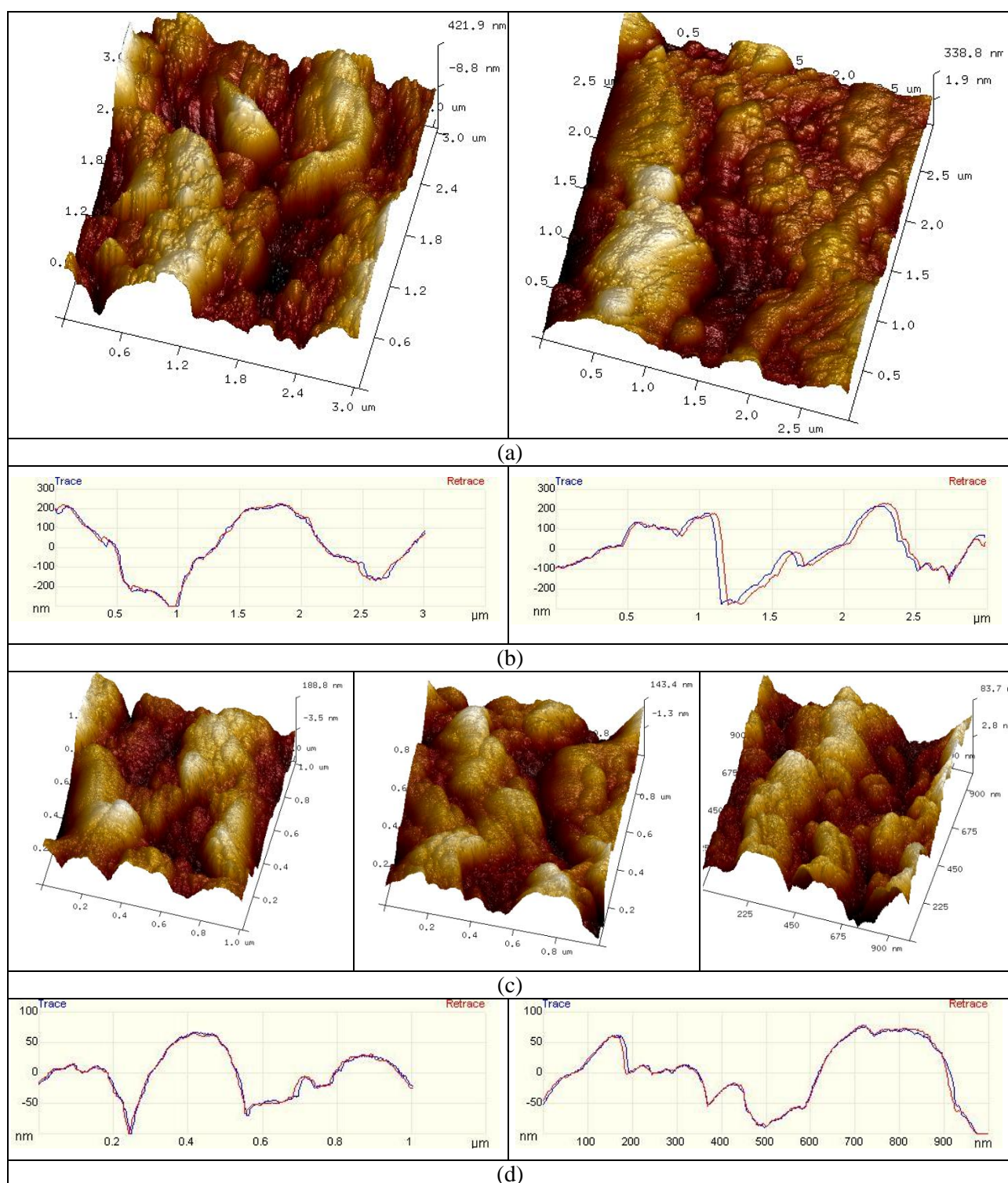


**Obr 62.:** AFM snímky magnetického nosiče HPS-B-22-NH<sub>2</sub>, (a, c, d, e, f) 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu, skenovaná oblast 10x10 μm<sup>2</sup>, různé částice; (b) řádkový profil středem částice, (b1) zoom 1 μm, (b2) zoom 3 μm; (b3) scan 10 μm, (g) 2D rekonstrukce obrazu peak force error kanálu, 10x10 μm<sup>2</sup>, týž částice jako v (f).



**Obr 63.:** AFM snímky magnetického nosiče **HPS-B-22-NH<sub>2</sub>**, (a) 2D rekonstrukce obrazu výškového kanálu skenovaná oblast  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ , (b) 2D rekonstrukce obrazu peak force error kanálu, skenovaná oblast  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  (c,d) zoom středu částice, skenovaná oblast  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ , (c) 2D rekonstrukce obrazu výškového kanálu, (d) 2D rekonstrukce obrazu peak force error kanálu.

HPS-B-22-NH<sub>2</sub>



**Obr 64.:** AFM snímky magnetického nosiče HPS-B-22-NH<sub>2</sub>, (a) 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu, střed částice, skenovaná oblast 3x3 μm<sup>2</sup>, (b) řádkový profil středem částice, zoom 3 μm, proloženo (c) zoom, skenovaná oblast 1x1 μm<sup>2</sup>, 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu (d) řádkový profil středem částice, zoom 1 μm, výšková data proložena rovinou druhého řádu.

## HPS-B-22-NH<sub>2</sub>

**Výstup:** HPS-B-22-NH<sub>2</sub> jsou velké kulové částice nejméně pravidelného tvaru ze všech studovaných částic s velmi širokou distribucí velikosti částic;  $d < 4,5 ; 8,8 > \mu\text{m}$ , kdy očekávaná průměrná hodnota průměru částice 5,7  $\mu\text{m}$  odpovídá nejvyšší četnosti průměru částice. Větší částice a shluky částic bylo velmi obtížné skenovat bez přítomnosti artefaktů zapříčiněných pohybem vzorku pod hrotem a také vlastní velikostí hrotu.

Částice HPS-B-22-NH<sub>2</sub> vykazují zřetelnou porézní strukturu, s četností cca 2 makropóry na oblast 3x3  $\mu\text{m}^2$ . Póry lze klasifikovat do tří velikostních kategorií: (a) malé úzké póry obdelníkového tvaru cca 100x300nm<sup>2</sup>, (b) velké obdelníkové póry tvaru cca 300x400 nm<sup>2</sup>, (c) póry o ploše cca 400x800nm<sup>2</sup>, viz **obr. 62** až **obr. 64**.

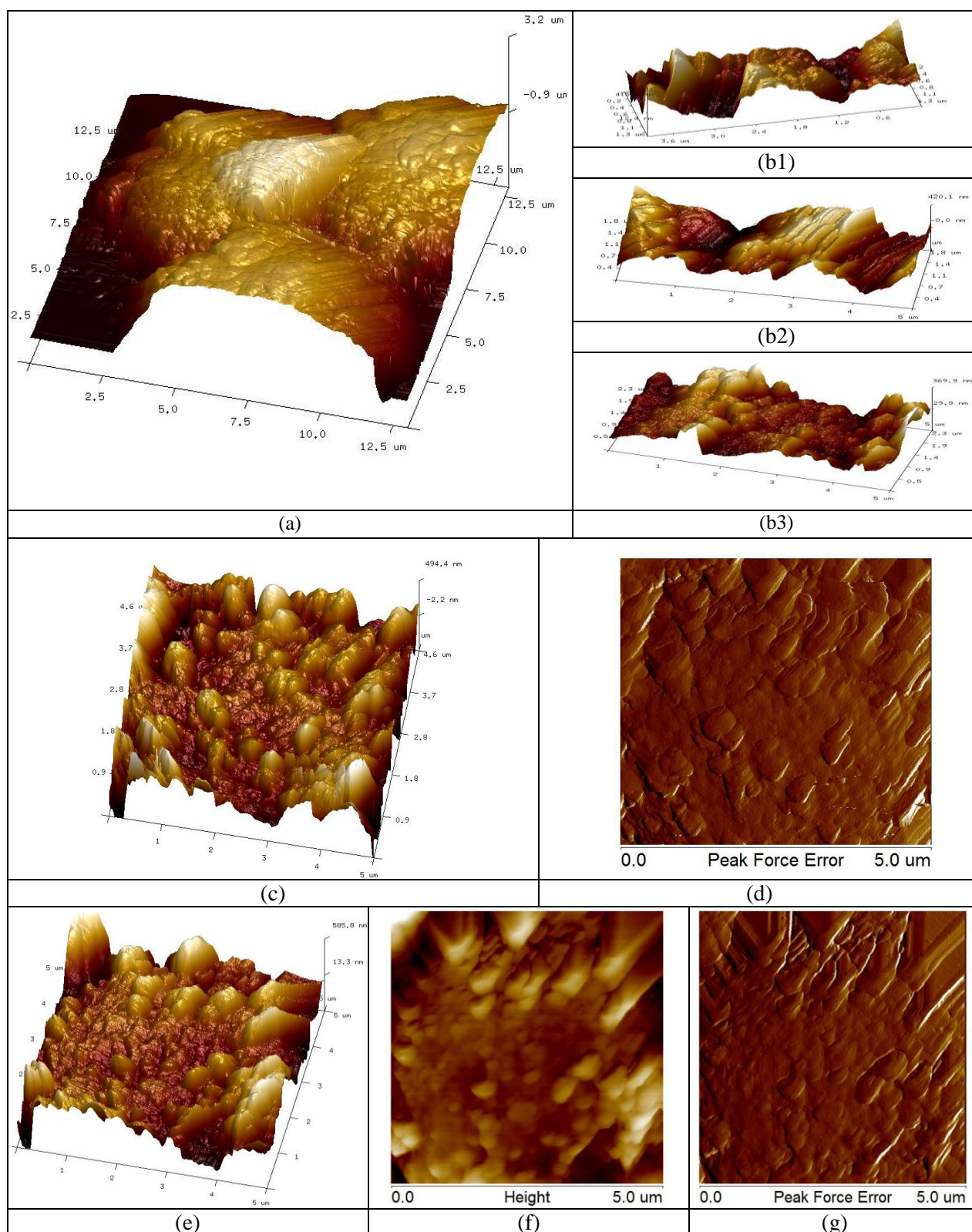
AFM snímky nepotvrdily přítomnost vyvázaných nanočástic oxidů železa z jádra částice. Agregace: přítomny shluky i izolované částice, částice se nevrství do více řad nad sebou.

Při porovnání výškových profilů u patnácti nezávislých částic byla zjištěna tato data:

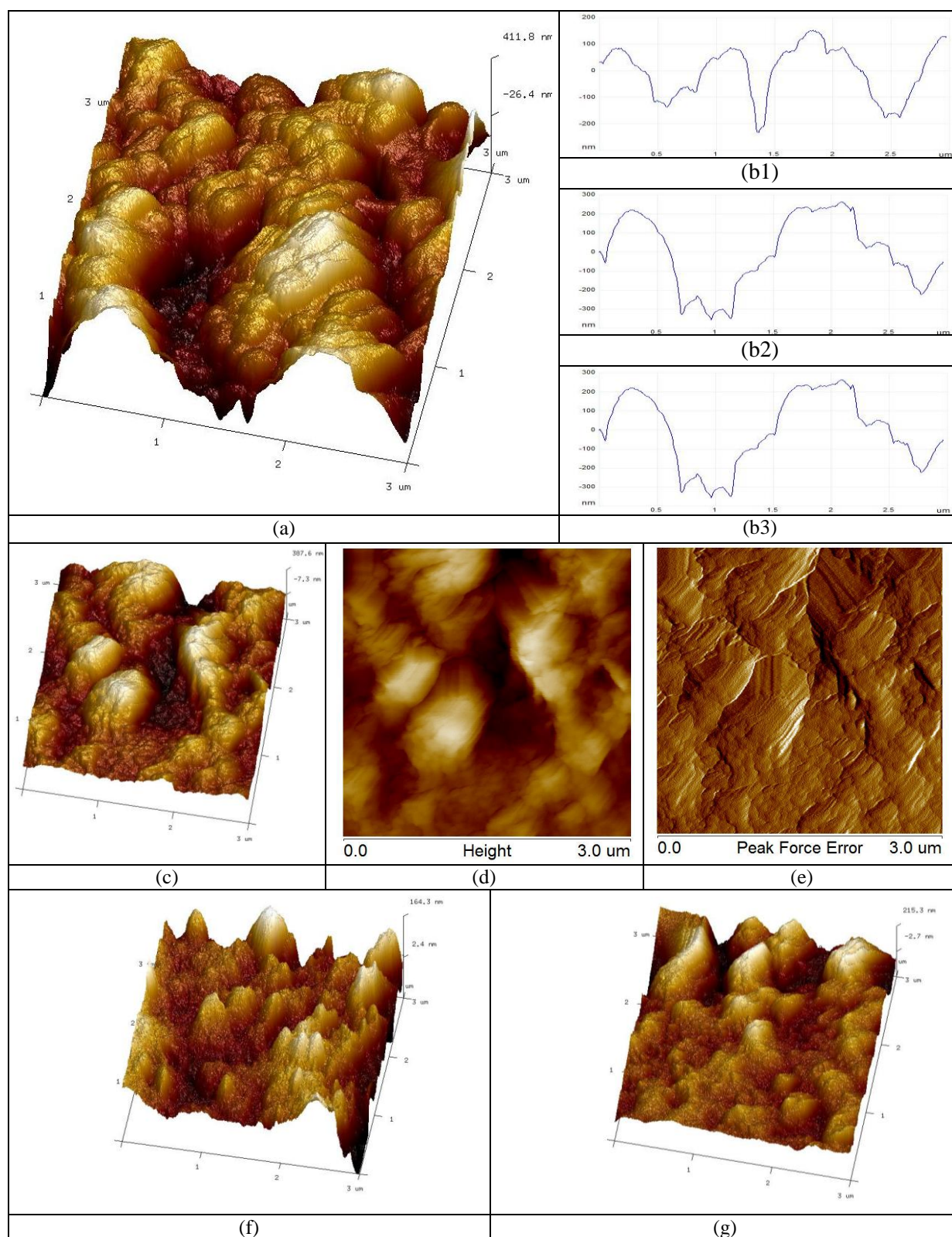
<i>Rms (plocha 1x1 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Ra (plocha 1x1 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Rms (plocha 0,2x0,2 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Ra (plocha 0,2x0,2 <math>\mu\text{m}^2</math>)</i>
46,2 ± 18,2 nm	36,4 ± 14,0 nm	25,5 ± 8,9 nm	19,9 ± 6,6 nm



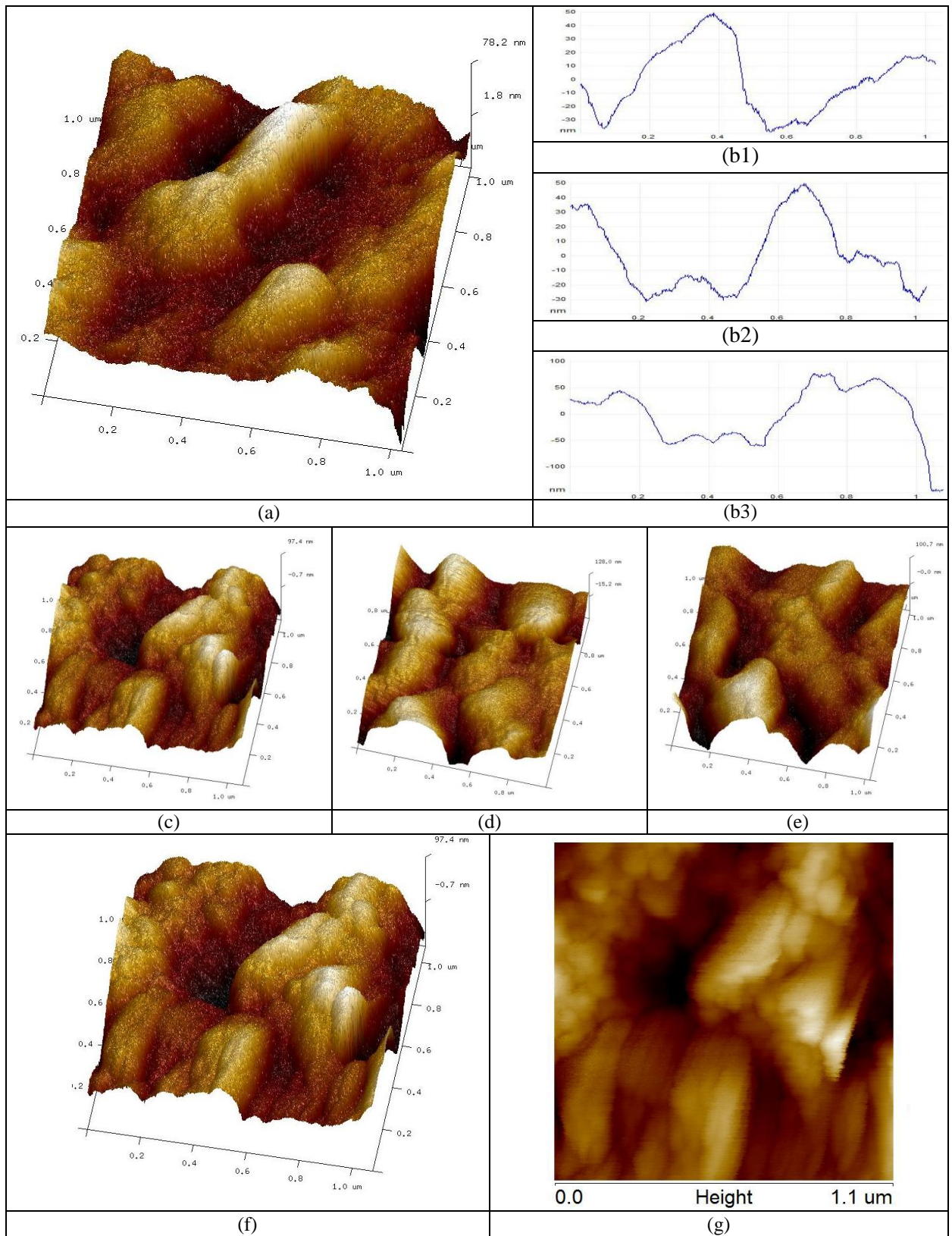
## HPS-B-21



**Obr 65.:** AFM snímky magnetického nosiče **HPS-B-21** (a, c, e) 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu, různé nosiče (a) oblast  $12 \times 12 \mu\text{m}^2$ , (b, e) oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , (b) 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu – výseč, (d, g) 2D rekonstrukce peak force error kanálu, skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , (f) 2D rekonstrukce obrazu výškového kanálu skenovaná oblast  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ .



**Obr 66.:** AFM snímky středu magnetického nosiče **HPS-B-21**, (a, c, f, g) různé částice, (a, c, f, g) 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu, skenovaná oblast  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ , (b) řádkový profil středem částice,  $3 \mu\text{m}$ , (d) 2D rekonstrukce obrazu výškového kanálu,  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ , (e) 2D rekonstrukce obrazu peak force error kanálu,  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ .



**Obr 67.:** AFM snímky středu magnetického nosiče **HPS-B-21**, různé částice, (a, c, d, e, f) 3D rekonstrukce obrazu výškového kanálu, skenovaná oblast 1x1 μm, (b) řádkový profil středem částice, 1 μm (g) 2D rekonstrukce obrazu výškového kanálu, 1x1 μm<sup>2</sup>, tatáž oblast jako v (f).

## HPS-B-21

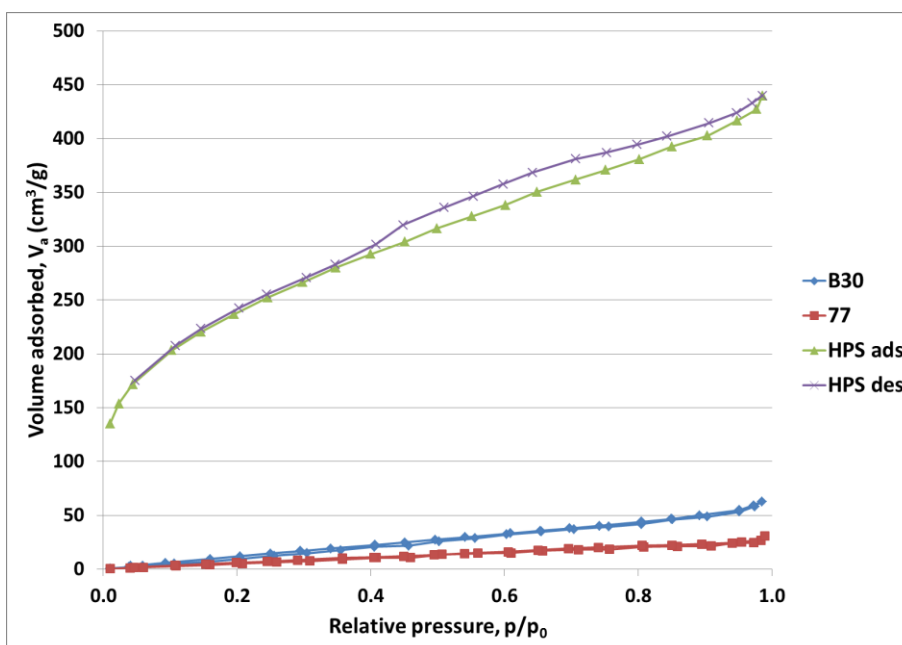
**Výstup: HPS-B-21** jsou velké částice nepravidelného kulového tvaru s velmi širokou distribucí velikosti částic;  $d < 5,8 ; 12,9 > \mu\text{m}$ . Částice s průměrem zpravidla větším než  $6 \mu\text{m}$  nelze snímat metodou AFM bez artefaktů zapříčiněných pohybem vzorku pod hrotem, vlastní velikostí hrotu a velikostí částic.

Částice **HPS-B-21** vykazují zřetelně strukturovaný povrch s četným výskytem rýh a mikropórů o šíři  $0,1-0,8 \mu\text{m}$  a hloubce  $0,050-0,300 \mu\text{m}$ , viz **obr. 65** až **obr. 67**. AFM snímky nepotvrdily přítomnost vyvázaných nanočástic oxidů železa z jádra částice. Agregace: přítomny shluky i izolované částice, částice se nevrství do více řad nad sebou.

Při porovnání výškových profilů u patnácti nezávislých částic byla zjištěna tato data:

$Rms$ (plocha $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )	$Ra$ (plocha $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )	$Rms$ (plocha $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ )	$Ra$ (plocha $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ )
$40,2 \pm 13,2 \text{ nm}$	$31,8 \pm 10,0 \text{ nm}$	$21,5 \pm 7,5 \text{ nm}$	$13,5 \pm 8,2 \text{ nm}$

BET analýza: Při použití sorpčního plynu  $\text{N}_2$  byl stanoven povrch částic  $810 \text{ m}^2/\text{g}$  částic. Tvar adsorpční BET izotermy HPS-B-21 (viz **obr. 68**, fialová a zelená křivka) potvrdil, že jde o mikroporézní částice.



**Obr 68.:** BET izotermy analyzovaných částic B 30 ox (modrá křivka); B 77 (červená křivka) a HPS-B- 21 (zelená a fialová křivka).

## 6.4. Diskuze – studium magnetických mikročástic metodou AFM

Magnetické nosiče nacházejí uplatnění v mnoha oborech přírodních věd, v analytických aplikacích, medicíně a biotechnologiích, neboť techniky založené na separaci magnetickými nosiči mají obrovský potenciál. Jsou tedy neustále hledány a rozvíjeny nové možnosti syntéz magnetických nosičů tak, aby tyto pokryly současnou širokou a různorodou poptávku.

U nově syntetizovaných magnetických nosičů je nezbytné popsat nejen magnetické vlastnosti a toxicitu částic, ale také morfologii a detailní strukturu povrchu. V tomto ohledu je mikroskopie atomárních sil unikátním nástrojem, poskytujícím bohaté informace o detailní struktuře zkoumaných povrchů a přispívá tak kvalitativně k získání nových informací, nezbytných k charakterizaci nově vyvíjených nosičů.

Závěrečná část dizertační práce se zabývá analýzou jemného povrchu a morfologie magnetických nosičů aplikovaných při ireverzibilní adsorpci DNA. Studovány byly komerčně dostupné nosiče a nosiče syntetizované, a to s cílem zhodnotit možnost AFM vizualizace nukleových kyselin adsorbovaných na povrchu magnetického nosiče.

### Komerční částice

Snímky optického mikroskopu MMP (**obr. 35**) prokázaly velmi nízký stupeň agregace částic u komerčních nosičů a širokou distribuci velikostí (Zapletalová H. et al., 2014). AFM snímky potvrdily nepravidelný tvar, zastoupený převážně sféroidem u obou studovaných komerčních borosilikátových magnetických nosičů (**obr. 36, 37**). Z detailních skenů povrchu nosiče (**obr. 38**) je zřejmá výrazná členitost částicového povrchu, která značně zvyšuje aktivní povrch částice.

Na povrchu modifikovaných i nemodifikovaných částic byly rozlišeny oblasti prohlubní a žlábků s nepravidelným tvarem a plochou cca 200 nm<sup>2</sup> až 600 nm<sup>2</sup>.

### Syntetizované částice

Snímky optického mikroskopu MMP ukazují na různý stupeň agregace studovaných částic (**obr. 39,40**). U částic menšího rozměru (viz **tab. č. 7**, a-d) zastoupených P(HEMA-co-GMA) a PGMA, byla nejvyšší míra agregace pozorována u částic B 135 ox (**obr. 39**). Naproti tomu částice B 29 a B 77 vykazovaly velmi malý stupeň agregace (četný výskyt také izolovaných částic). Díky nízké agregaci a malé velikosti byly tyto částice velmi vhodným objektem pro AFM měření.

Lze konstatovat, že analyzované částice B29, B 30, B 135 a B 77 vykazovaly ve srovnání s komerčními částicemi úzkou distribuci velikostí, jež byla ve shodě s dostupnými údaji o velikosti (DSL). Nejužší distribuci velikostí vykazovaly částice B 29 a B 30, následovaly částice B 135 a 77.

Všechny magnetické částice analyzované v první skupině vykazovaly symetrický kulový tvar a poměrně hladký a homogenní povrch bez přítomnosti pórů (**obr.41** až **obr.45**, **obr. 47** až **obr. 53**).

Nejvíce hladký povrch vykazovaly částice B 135 hodnotami  $Rms$  ( $2,1 \pm 0,4$ ) nm a částice B 77 s  $Rms$  ( $2,3 \pm 0,4$ ) nm. Následovaly částice B 29 s  $Rms$  ( $3,5 \pm 0,7$ ) nm a B 30 s hodnotou  $Rms$  ( $5,4 \pm 1,1$ ) nm. Na naměřených snímcích nebyly pozorovány jevy, jež by naznačovaly vyvazování železa z jádra částice.

Analýza porézností částic prostřednictvím BET analýzy potvrdila u vybraných analyzovaných částic (B 30 a B 77) hladký povrch bez přítomnosti pórů (**obr.46**) a koreluje se zjištěnými hodnotami  $Rms$ .

Částice HPS a P(GMA-MOEAA-EDMA) (viz **tab. č. 7**, e-h) shodně vykazovaly četné shluky částic, zastoupení izolovaných částic vhodných k AFM měření však bylo pro AFM měření dostatečné (**obr. 40**). Částice s velikostí nad cca 6  $\mu\text{m}$  nebylo možno snímat metodou AFM bez artefaktů. S ohledem na velikost částic těchto částic bylo AFM snímání značně náročnější.

Lze konstatovat, že analyzované částice a P(GMA-MOEAA-EDMA) a HPS vykazovaly poměrně širokou distribuci velikostí. Nejužší distribuci velikostí vykazovaly částice (GMA-MOEAA-EDMA), které jako jediné vykazovaly také kulově symetrický tvar. Ostatní částice HPS vykazovaly distribuci velikostí v rozsahu několika  $\mu\text{m}$  a nepravidelný kulový tvar.

Částice P(GMA-MOEAA-EDMA) také vykazovaly relativně nejhladší povrch ve srovnávané druhé skupině částic, a to  $Rms$  ( $11,0 \pm 3,9$ ) nm. Částice HPS vykazovaly hodnoty  $Rms$  zpravidla kolem 20 nm, nejvyšší povrchové nerovnosti vykazovaly částice HPS-B-22-NH<sub>2</sub> s  $Rms$  ( $25,5 \pm 8,9$ ) nm.

AFM snímky jemného povrchu studovaných částic z druhé skupiny prokázaly poréznost částic. Tyto závěry také potvrdila BET analýza částic HPS-B-21. Při použití sorpčního plynu N<sub>2</sub> byl stanoven povrch těchto částic 810m<sup>2</sup>/g částic a tvar adsorpční BET izotermy (**obr. 68**) ukazuje, že jde o mikroporézní částice.

Imobilizační technika, jež ukotvila magnetické nosiče v agarózové vrstvě, často vykazovala své slabiny. Nedostatečné uchycení v kombinaci s velikostí částice často způsobovalo laterální pohyb magnetického nosiče v průběhu skenování na vzduchu (a tím vznik četných artefaktů ve snímaném obrazu). Proto nedoporučuji tuto imobilizační techniku, jež ukotvuje nosiče prostřednictvím zanoření do agarózové vrstvy pro studium nosiče v kapalném prostředí..

Dále nebyla potvrzena přímá souvislost mezi průměrem částic a jejich porozitou, uvedená např. v (J. Liu et al., 2010).

Při analyzování výsledků AFM analýzy a jejich srovnání s dalšími metodami bylo zjištěno, že zde není zřejmý vliv porozity částic na magnetické chování částic či provázanost mezi efektivitou reverzibilní adsorpce DNA na magnetické nosiče v souvislosti se zjištěnou hladkostí či porozitou částic (Trachtová et al., 2015).

## 7. Závěr

V úvodní, metodické části dizertační práce, byly na základě rešerše vybrány dva imobilizační procesy vedoucí k uchycení nukleových kyselin ke slídivému povrchu pro následné AFM zobrazení, a to (a) modifikace bivalentními kationty (hořečnatými a nikelnatými) (b) metodiky používající silanizační činidla – APTES, APDMES a APS. Vhodnost těchto metodik byla ověřena v širokém spektru modifikací. AFM zobrazení nukleových kyselin ukázala, že oba vybrané bivalentní kationty jsou vhodné k imobilizaci nukleových kyselin, avšak pouze nikelnaté kationty prokázaly takřka 100% úspěšnost při imobilizaci nukleových kyselin ke slídivému povrchu. Ověřován byl také vliv pufového roztoku (HEPES, TRIS, PBS). Z AFM zobrazení imobilizované NK na slídivém povrchu vyplynulo, že vyšší koncentrace bivalentních iontů v nanášecím roztoku vede zřejmě ke stáčení DNA, jejímu zkondenzování a následně i desorpci ze slídivého povrchu. Dále bylo ověřeno, že při vyšších koncentracích tvoří molekuly DNA zpravidla nepravidelnou síť, ve které již nejsou jednotlivé molekuly DNA rozlišeny. Při nižších koncentracích DNA pak naopak nedochází k uchycení dostatečného počtu DNA vláken a AFM snímání je neefektivní (Zapletalová, H. 2012).

**Na základě stanovených cílů práce byla na Ústavu lékařské biofyziky zavedena imobilizační metoda k uchycení nukleových kyselin prostřednictvím bivalentních kationtů; optimální a reprodukovatelná kombinace - 20mM HEPES 1mM NiCl<sub>2</sub> pH 7,8. Koncentrace nanášené DNA v rozmezí 0,5μg/ml – 5μg/ml.**

Vedle imobilizační techniky vedoucí k uchycení DNA prostřednictvím bivalentních kationtů byly na Ústavu lékařské biofyziky také testovány metody imobilizace prostřednictvím alkokoxysilanů, a to v širokém spektru variant: metoda napařením, silanizací v polárním či organickém rozpouštědle za použití různých silanizačních činidel - komerční APTES, APDMES a vlastní syntetizovaný APS.

Jako nejefektivnější byla vyhodnocena metoda imobilizace v **APDMES** parách a prostřednictvím **APS**. Při modifikaci silanizačními činidly se obecně jako klíčové jevílo precizní udržení bezvodého prostředí, při modifikaci v parách pak dostatečná evakuace exikátoru rotační vývěvou (10Pa).

Povrchy slídy silanizované **APTES** z vodné fáze (metoda B) a v nepolárním rozpouštědle (metody C1 a C2) vykazovaly znaky silanizovaného povrchu, avšak nebyly dostatečně reprodukovatelně homogenní, častý byl výskyt lokálních vad a strukturních nerovností, počet uchycených molekul DNA byl nedostatečný. Příčinou nestejných výsledků silanizačních technik B, C1 a C2 by mohla být částečná hydrolyza APTES činidla, resp.



absence redestilačního kroku u použitého APTES. Použití zapékacího kroku u technik A1, B a C1, C2 se oproti původním předpokladům (Crampton et al., 2005) neosvědčilo. Zapékání silanizovaných slíd naopak zvýšilo drsnost studovaných povrchů a četnost lokálních defektů ve vytvořené silanové vrstvě a nevedlo ke sjednocení silanizované vrstvy.

Protože **APS**, aminopropyltriethoxysilatan, je komerčně nedostupné silanizační činidlo, byly nejprve testovány metody syntézy APS. Z možných teoretických variant byla vybrána termodynamická a kinetická cesta a optimalizovány podmínky syntézy (teplota, tlak, přítomnost katalyzátoru a způsoby přečištění) tak, aby získaný produkt obsahoval minimální množství zpolymerizovaných bočních produktů a jeho použití vedlo k reprodukovatelnému zavedení AFM modifikačního protokolu, vedoucího k uchycení DNA a následnému AFM zobrazení.

V průběhu syntéz a následného použití APS v modifikačním procesu slídových povrchů bylo experimentálně zjištěno, že APS, výsledný produkt syntézy, lze přečistit rozpuštěním v toluenu, čímž dojde k odstranění nerozpustných vstupních reaktantů. Následnou krystalizací byl získán přečištěný produkt bez přítomných oligomerů. Produkty APS syntézy před a po přečištění byly srovnány a jejich vhodnost pro AFM imobilizaci NK byla ověřována (MALDI-TOF, rentgenová krystalografie, *Rms* hodnoty silanizovaných povrchů). Na základě hmotnostní spektrometrie a AFM analýzy (*Rms* hodnoty) bylo ověřeno, že v přečištěném produktu došlo k výraznému snížení výskytu dimerů, což vedlo k úspěšnému a reprodukovatelnému zobrazení DNA metodou AFM (Zapletalová H. et al., 2016).

**Na Ústavu lékařské biofyziky byla dále zavedena metoda modifikace slídového povrchu prostřednictvím APS z vodné fáze a APDMES prostřednictvím napaření (metoda A2). Obě modifikační techniky vykazují nejvyšší hodnoty kontaktního úhlu (APDMES) při současném udržení nejnižších hodnot *Rms* a současném zachování plošné homogenity modifikovaných, AFM zobrazovaných ploch. Slídové povrchy modifikované APS a APDMES vykazovaly vlastnosti žádané při uchycení nukleových kyselin a jsou tedy vhodnými povrchy např. ke studiu konformačních změn či dynamických procesů nukleových kyselin metodou AFM. Bylo ověřeno, že AFM mikroskopie je vhodnou metodou pro zobrazení nukleových kyselin.**

**V návaznosti na zavedené metodiky zobrazení jednotlivých molekul DNA AFM mikroskopii byla následně ověřováno zavedení AFM zobrazení molekul DNA při studiu cytotoxicity vyvolané fotodynamickým působením.**

Ke studiu cytotoxicity vybraných senzitivizérů TMPyP a ClAlPcS<sub>2</sub> byla zvolena nádorová buněčná linie MCF-7 a následující koncentrace fotosenzitivizérů: 1 μM TMPyP, 5 μM TMPyP a 50 μM TMPyP při hustotě energie 1 J/cm<sup>2</sup>; a koncentrace 0,2 μM ClAlPcS<sub>2</sub>, 1 μM ClAlPcS<sub>2</sub> a 10 μM ClAlPcS<sub>2</sub> při hustotě energie 5 J/cm<sup>2</sup>. Studium cytotoxicity vybraných fotosenzitivizérů bylo realizováno třemi odlišnými metodami, gelovou elektroforézou, kometovou analýzou a mikroskopií atomárních sil. Kometovou analýzou bylo potvrzeno, že oba studované fotosenzitivizéry mají silný genotoxický účinek, kdy první ze studovaných PS, TMPyP má větší genotoxický účinek než ClAlPcS<sub>2</sub> při koncentracích a hustotě energie odpovídající IC<sub>50</sub>.

Ačkoliv životnost MCF-7 buněk po PDT působení poklesla při použití TMPyP o koncentraci 5 μM TMPyP při hustotě energie 1 J/cm<sup>2</sup> na cca 60 % (MTT test), studie prostřednictvím kometové analýzy ukázaly rozsáhlé cytotoxické poškození studovaných buněk při 5ti násobně menší hodnotě koncentrace fotosenzitivizéru. Taktéž při testování 1 μM ClAlPcS<sub>2</sub>, hustota energie 5 J/cm<sup>2</sup>, poklesla životnost buněk linie MCF-7 na cca 60 % (MTT test), výsledky kometové analýzy však ukázaly rozsáhlé cytotoxické poškození studovaných buněk už při 5ti násobně menší hodnotě koncentrace fotosenzitivizéru. Při srovnání cytotoxického působení obou senzitivizérů však bylo poškození způsobené vlivem ClAlPcS<sub>2</sub> a zářením slabší (závěr kometové analýzy).

Dále se nepotvrdilo, že by MCF-7 buňky nebyly schopny apoptotických procesů z důvodu potlačené exprese kaspázy 3. Z naměřených výsledků se zdá, že potlačená exprese kaspázy 3 nebrání rozvoji apoptotického procesu při použití fotosenzitivizéru o malých koncentracích, a to zejména u TMPyP, který má vyšší genotoxické působení než druhý sledovaný senzitivizér, ClAlPcS<sub>2</sub>.

Z uvedených výsledků dále vyplývá, že pro vyhodnocení genotoxicity prostřednictvím kometové analýzy je výhodnější delší (6h) interval časového odstupu od fotodynamického působení – a to s ohledem na případné reparační procesy či dostatečný rozvoj apoptotického procesu u MCF-7 buněk. Při delším úseku od PDT působení (18h-24h) však nebylo poškození buněk kometovou analýzou zachytitelné – zřejmě z důvodu vzniku apoptotických těles či (a to zejména) z důvodu nadměrného rozpadu buněk (data nejsou zveřejněna).

Ze studia poškození DNA vyvolaného PDT působením je zřejmé, že u hodnot odpovídajících IC<sub>50</sub> a vyšších dochází ke smrti buněk, a to zejména přes nekrotické procesy, tedy přes buněčnou lyzi a vylití buněčného obsahu. Tento velmi rychlý a vysoký stupeň poškození buněk pak znehodnocuje interpretaci výsledků kometové analýzy, a to u obou studovaných senzitivizérů.

**Mikroskopie atomárních sil se osvědčila ke zobrazení DNA izolované z buněk poškozených fotodynamickým působením. Bylo však zjištěno, že interpretace výsledků vyžaduje další nezávislé metody.**

**V případě senzitizeru TMPyP lze na základě zjištěných výsledků a AFM zobrazení izolované DNA usuzovat, že došlo k částečnému výskytu apoptózy ( $1\mu\text{M}$  TMPyP,  $1\text{J}/\text{cm}^2$ ) neboť AFM snímky prokázaly přítomnou fragmentovanou DNA (Zapletalová H., 2016).**

**U druhého senzitizeru nebyla fragmentace DNA výrazná, a to ani u nízkých koncentrací fotosenzitizeru a hustot energie ( $0,2\mu\text{M}$  CIAIPcS<sub>2</sub>,  $5\text{J}/\text{cm}^2$ ). Tento závěr je ve shodě se srovnatelnými publikovanými výsledky a je zřejmě způsoben odlišným procesem cytotoxického působení druhého studovaného senzitizeru.**

Závěrečná část dizertační práce se zabývá analýzou morfologie a jemného povrchu magnetických nosičů aplikovaných při ireverzibilní adsorpci DNA. Metodou AFM byly studovány komerčně dostupné nosiče a nosiče syntetizované, a to s cílem analyzovat povrch nosiče a zhodnotit možnost AFM vizualizace nukleových kyselin adsorbovaných na povrchu magnetického nosiče. Dílčím záměrem bylo zhodnotit možnosti zavedení metodik studia magnetických nosičů metodou AFM v kapalině, a to při dynamické změně iontových podmínek simulujících vlastní ireverzibilní proces adsorpce DNA a jeho zobrazení.

**Bylo prokázáno, že všechny studované nosiče vykazují nerovný povrch, na němž není možno standardním AFM měřením zobrazit vlákno adsorbované a relaxované DNA tak, aby byla molekula DNA odlišena od pozadí nosiče, tvořeného prostorově strukturovaným povrchem. Nejhladší ze studovaných magnetických nosičů vykazoval *Rms* ( $2,1 \pm 8,9$ ) nm - pro B 135 ox. Magnetický nosič s největšími výškovými rozdíly na svém povrchu byla částice HPS-B-22-NH<sub>2</sub> s *Rms* ( $25,5 \pm 8,9$ ) nm.**

S ohledem na značnou povrchovou nerovnost studovaných magnetických nosičů lze konstatovat, že na jejich povrchu není možné rozlišit relaxované adsorbované vlákno DNA. Lze předpokládat, že kombinace mikroskopie atomárních sil a simultánní optické fluorescenční mikroskopie by mohla problém obejít a přispět k rozlišení DNA adsorbované na povrchu nosiče za předpokladu, že DNA je adsorbovaná na nosič v přítomnosti chaotropních solí a PEG, kdy je vlákno DNA v kompaktním tvaru a fluorescenční signál dostatečný.

V případě AFM měření je také možné vlákno DNA adsorbované na povrchu nosiče snímat v režimu elasticity (obecně plošné AFM snímání mechanických vlastností). Tento přístup může být také jednou z dalších alternativ, jak prostřednictvím mikroskopie atomárních sil rozlišit adsorbované molekuly DNA na nerovném povrchu magnetického nosiče.

## 8. Souhrn

Mikroskopie atomárních sil je relativně novou, minimálně invazivní zobrazovací a analytickou metodou, která je používána v širokém spektru analyzovaných vzorků a aplikací. Mikroskopie atomárních sil je založena na kombinaci rastrového skenování v rovině  $XY$  vzorku a citlivého nano posunu v ose  $Z$  zprostředkovaného piezo systémem, monitorovaným nejčastěji optickou cestou. Vedle zobrazovací funkce v 2D a 3D rekonstrukci obrazu je mikroskopie rozšířena o analýzu povrchových vlastností vzorku, jako je analýza lokální tuhosti (elasticity), hrubosti povrchu či v případě speciálních nosníků o magnetické vlastnosti studovaných vzorků.

V předložené dizertační práci jsem se zabývala třemi různými oblastmi, jejichž spojovacím prvkem byla moderní mikroskopie atomárních sil zaměřená na studium nukleových kyselin.

V prvním projektu jsem se zabývala možnostmi uchycení a následného zobrazování nukleových kyselin na slídovém substrátu. Na pracovišti lékařské biofyziky jsem zavedla metodu uchycení molekul nukleových kyselin prostřednictvím bivalentních kationtů a prostřednictvím triethoxysilanů - plynnou a kapalnou formou. Vzhledem k tomu, že uchycení nukleových kyselin těmito metodami nebylo dostatečně stabilní pro opakované zobrazování v kapalině, byla dále zavedena a optimalizována syntéza triethoxysilatranu, méně citlivého cross-linkeru, používaného standardně k uchycení nukleových kyselin na slídovém povrchu ve světových laboratořích (Zapletalová H. et al., 2016a).

V druhé části předložené práce jsem se věnovala aplikaci mikroskopie atomárních sil při studiu poškození DNA vyvolaného fotodynamickým působením. Studované linie MCF-7 byly vystaveny působení dvou fotosenzitizérů: TMPyP a CIAIPcS<sub>2</sub>. Vlastní poškození DNA jsem sledovala metodou kometové analýzy, AFM analýzy jednotlivých molekul a elektroforézou. Výsledky prokázaly vysokou účinnost obou senzitizerů na vybrané buněčné linii a to již při malých koncentracích a hustotách energie. Apoptotický způsob smrti byl však oproti původnímu předpokladu minimálně zastoupen. Tento jev potvrdila jak gelová elektroforéza, tak AFM analýza (Zapletalová H. et al., 2016b).

Třetí oblastí aplikace mikroskopie atomárních sil bylo studium magnetických nosičů, používaných k rutinní izolaci DNA z hrubých vzorků. Povrch magnetických nosičů, komerčních a syntetizovaných, byl analyzován metodou AFM s ohledem na poréznost a

drsnost nosičů. Bylo prokázáno, že všechny studované nosiče vykazují nerovný povrch, na němž není možno standardním AFM měřením zobrazit vlákno adsorbované a relaxované DNA tak, aby byla molekula DNA odlišena od pozadí nosiče, tvořeného prostorově strukturovaným povrchem. Nejhladší ze studovaných magnetických nosičů vykazoval  $Rms$  ( $2,1 \pm 8,9$ ) nm - pro B 135 ox. Magnetický nosič s největšími výškovými rozdíly na svém povrchu byla částice HPS-B-22-NH<sub>2</sub> s  $Rms$  ( $25,5 \pm 8,9$ ) nm.

## 9. Summary

Atomic force microscopy is a relatively new, minimally invasive imaging and analytic method used in a wide range of samples and applications. Atomic force microscopy is based on a combination of raster scan in the XY plane of the sample and the sensitive nano displacement in the Z axis piezo-mediated system. Besides imaging function (2D and 3D image reconstruction) is AFM extended by microscopy analysis of the surface properties of the sample, such as analysis of the local stiffness (elasticity), surface roughness, or in case of special tips on the magnetic properties of the studied samples.

This thesis describes the results of three different experiment branches interconnected by DNA as the main experimental object and the technique of atomic force microscopy (AFM).

The methodology of immobilization and reproducible imaging was established at Department of Biophysics as described in the first part of made PhD thesis. Three immobilization platforms presented here are based on different immobilization strategies. The first platform exploits imaging of dsDNA attached on mica surfaces via electrostatic interactions through the presence of bivalent cations. The second platform exploits dsDNA attached via alkoxysilanes. The third platform is focused on improvement of APS synthesis and APS-DNA immobilization strategy. AFM topography measurements then monitor the variation of reproducibility, *Rms* of modified surfaces and height of the undesirable nanostructures at different immobilization strategies.

The second part is focused on visualization of DNA changes induced by photodynamic treatment. The changes in DNA length induced by TMPyP and ClAlPcS<sub>2</sub> photosensitizers were observed and analysed by AFM, electrophoresis and comet analysis. Direct measurement of the length of DNA strands reveals a shortening of the DNA at very low photosensitiser concentrations and light doses signalling apoptotic process 1 $\mu$ M TMPyP and 1J/cm<sup>2</sup>. Variations in the conformational changes and length that occur in DNA as a result of PDT may have implications for the application.

In the third part of PhD thesis the different magnetic micro particles were analysed by AFM. The morphology and surface roughness was analysed. Detail structure analysis and *Rms* values may have implications for the employment of these particles in the effective and selective reversible DNA attachment in the process of DNA isolation.

## 10. Seznam použité literatury

- Acedo, P., Stockert, J.C., Cañete, M. & Villanueva, A. (2014). Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. *Cell Death & Disease* 5(3): pg1122.
- Acres, R.G., Ellis, A.V., Alvino, J., Lenahan, C.E., Khodakov, D.A., Metha, G.F. & Andersson, G.G. (2012). Molecular Structure of 3-Aminopropyltriethoxysilane Layers Formed on Silanol-Terminated Silicon Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C* 116(10): 6289–6297.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K.A., Foster, T.H., Girotti, A.W., Gollnick, S.O., ... Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61(4): 250–281.
- Aikens, J. & Dix, T.A. (1991). Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *Journal of Biological Chemistry* 266(23): 15091–15098.
- Aissaoui N., L.B. (2011). Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction, Stability, and Influence on Protein Adsorption. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 28(1): 656–65.
- Allen, M.J., Dong, X.F., O'Neill, T.E., Yau, P., Kowalczykowski, S.C., Gatewood, J., ... Bradbury, E.M. (1993). Atomic force microscope measurements of nucleosome cores assembled along defined DNA sequences. *Biochemistry* 32(33): 8390–8396.
- Allison, R.R. & Moghissi, K. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical Endoscopy* 46(1): 24–29.
- Altaf, M., Saksouk, N. & Côté, J. (2007). Histone modifications in response to DNA damage. *Mutation Research* 618(1-2): 81–90.
- Ambrož, M. (2013, May 15). Analýza struktury DNA s pomocí mikroskopu AFM. Master's thesis. Retrieved 12 August 2015, from [http://is.muni.cz/th/175628/prif\\_m\\_b1/](http://is.muni.cz/th/175628/prif_m_b1/)
- Ando, T., Uchihashi, T., Kodera, N., Yamamoto, D., Miyagi, A., Taniguchi, M. & Yamashita, H. (2008). High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 456(1): 211–225.
- An, H. & Jin, B. (2012). Prospects of nanoparticle–DNA binding and its implications in medical biotechnology. *Biotechnology Advances* 30(6): 1721–1732.
- Argaman, M., Golan, R., Thomson, N.H. & Hansma, H.G. (1997). Phase imaging of moving DNA molecules and DNA molecules replicated in the atomic force microscope. *Nucleic Acids Research* 25(21): 4379–4384.
- Arora P. S, J.G.M. (1995). Aminohydroxysiloxanes on E-Glass Fibers. *Langmuir* 11(6).
- Babincová, M., Čičmanec, P., Altanerová, V., Altaner, Č. & Babinec, P. (2002). AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy. *Bioelectrochemistry* 55(1–2): 17–19.
- Banfalvi, G. (1986). Structural organization of DNA. *Biochemical Education* 14(2): 50–59.
- Bates, A.D. & Maxwell, A. (2005). *DNA Topology*. Also available as: Hardback | eBook.
- Beland F.A. & Poirier M.C. (1994). DNA Adducts and Their Consequences. In *Methods to Assess DNA Damage and Repair: Interspecies Comparisons* (Tardif., Vol. 1994). John Wiley and Sons.
- Bell, N.A.W. & Keyser, U.F. (2014). Nanopores formed by DNA origami: A review. *FEBS Letters* 588(19): 3564–3570.



- Berensmeier, S. (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(3): 495–504.
- Berge, T., Jenkins, N.S., Hopkirk, R.B., Waring, M.J., Edwardson, J.M. & Henderson, R.M. (2002). Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercalinium visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research* 30(13): 2980–2986.
- Berlanda, J., Kiesslich, T., Engelhardt, V., Krammer, B. & Plaetzer, K. (2010). Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 100(3): 173–180.
- Bezanilla, M., Drake, B., Nudler, E., Kashlev, M., Hansma, P.K. & Hansma, H.G. (1994). Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope. *Biophysical Journal* 67(6): 2454–2459.
- Bhushan, B., Kwak, K.J., Gupta, S. & Lee, S.C. (2009). Nanoscale adhesion, friction and wear studies of biomolecules on silane polymer-coated silica and alumina-based surfaces. *Journal of the Royal Society Interface* 6(37): 719–733.
- Binnig, Quate & Gerber. (1986). Atomic force microscope. *Physical Review Letters* 56(9): 930–933.
- Boichot S., E. Delain\_ and E. Le Cam, Fromm M., Cunniffe S., P. O’Neill‡, J. C. Labrunes§, A. Chambaudet, O’Neill P.-O., Chambaudet Ch. & Cam E.L. (2002). Investigation of radiation damage in DNA by using Atomic Force Microscopy, *Radiation Protection Dosimetry* 99(4): 143–145.
- Borovok, N., Molotsky, T., Ghabboun, J., Cohen, H., Porath, D. & Kotlyar, A. (2007). Poly(dG)–poly(dC) DNA appears shorter than poly(dA)–poly(dT) and possibly adopts an A-related conformation on a mica surface under ambient conditions. *FEBS Letters* 581(30): 5843–5846.
- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B.E. & Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 5(1): 21–26.
- Bradbury, S. (1968). The Microscope in Victorian Times. In S. BRADBURY (ed.), *The Microscope Past and Present*. Pergamon.
- Bruce Armitage. (1998). Photocleavage of Nucleic Acids. *1998* 98: 1171–1200.
- Bucak, S., Yavuzturk, B. & Demir, A. (2012). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Surface Modifications and Application in Drug Delivery. In A. D. Sezer (ed.), *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*.
- Bussiek, M., Mücke, N. & Langowski, J. (2003). Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution. *Nucleic Acids Research* 31(22): e137.
- Bustamante, C. & Rivetti, C. (1996). Visualizing protein-nucleic acid interactions on a large scale with the scanning force microscope. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 25: 395–429.
- Buytaert, E., Dewaele, M. & Agostinis, P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1776(1): 86–107.
- Cadenas, E. & Sies, H. (1998). The lag phase. *Free Radical Research* 28(6): 601–609.
- Cam E. L. & Landousy F. (2010). Probing DNA-Protein Interactions with Atomic Force Microscopy.
- Cao, M., Deng, L. & Xu, H. (2015). Study of PNA–DNA hybridization by AFM-based single-molecule force spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 470: 46–51.

- Castano, A.P., Demidova, T.N. & Hamblin, M.R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1(4): 279–293.
- Castano, A.P., Demidova, T.N. & Hamblin, M.R. (2005a). Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2(2): 91–106.
- Castano, A.P., Demidova, T.N. & Hamblin, M.R. (2005b). Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2(1): 1–23.
- Cerreta, A., Vobornik, D. & Dietler, G. (2013). Fine DNA structure revealed by constant height frequency modulation AFM imaging. *European Polymer Journal* 49(8): 1916–1922.
- Chen, L., Haushalter, K.A., Lieber, C.M. & Verdine, G.L. (2002). Direct visualization of a DNA glycosylase searching for damage. *Chemistry & Biology* 9(3): 345–350.
- Cherny, D.I. & Jovin, T.M. (2001). Electron and scanning force microscopy studies of alterations in supercoiled DNA tertiary structure. *Journal of Molecular Biology* 313(2): 295–307.
- Choucroun, P., Gillet, D., Dorange, G., Sawicki, B. & Dewitte, J.D. (2001). Comet assay and early apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 478(1–2): 89–96.
- Chrissey, L.A., Lee, G.U. & O’Ferrall, C.E. (1996). Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films. *Nucleic Acids Research* 24(15): 3031–3039.
- Ciccia, A. & Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell* 40(2): 179–204.
- Collins, A.R. (2009). Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681(1): 24–32.
- Collins, A.R. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840(2): 794–800.
- Collins, A.R. & Gaivão, I. (2007). DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. *Molecular Aspects of Medicine* 28(3–4): 307–322.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., ... Štětina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23(3): 143–151.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(10): 1195–1214.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173(1): 33–38.
- Crampton, N., Bonass, W.A., Kirkham, J. & Thomson, N.H. (2005). Formation of Aminosilane-Functionalized Mica for Atomic Force Microscopy Imaging of DNA. *Langmuir* 21(17): 7884–7891.
- Crampton, N., Bonass, W.A., Kirkham, J. & Thomson, N.H. (2006). Studying silane mobility on hydrated mica using ambient AFM. *Ultramicroscopy* 106(8–9): 765–770.
- Cui, Z.-G., Piao, J.-L., Rehman, M.U.R., Ogawa, R., Li, P., Zhao, Q.-L., ... Inadera, H. (2014). Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by withaferin A. *European Journal of Pharmacology* 723: 99–107.
- Dahle, J., Steen, H.B. & Moan, J. (1999). The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density. *Photochemistry and Photobiology* 70(3): 363–367.

- Davids, L.M. & Kleemann, B. (2011). Combating melanoma: the use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. *Cancer Treatment Reviews* 37(6): 465–475.
- Dhawan, A., Anderson, D. & Britain, R.S. of C. (Great. (2009). *The Comet Assay in Toxicology*. Royal Society of Chemistry.
- Di Santo, G., Tobenas, S., Adamcik, J. & Dietler, G. (2007). Force spectroscopy on DNA by FM-AFM. *arXiv:0712.1424 [physics]*. Retrieved from <http://arxiv.org/abs/0712.1424>
- Dizdaroglu, M. (2015). Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 763: 212–245.
- Dufrêne, Y.F. (2002). Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *Journal of Bacteriology* 184(19): 5205–5213.
- Dumitriu, A.-C., Cazacu, M., Shova, S., Turta, C. & Simionescu, B.C. (2012). Synthesis and structural characterization of 1-(3-aminopropyl)silatrane and some new derivatives. *Polyhedron* 33(1): 119–126.
- Dušinská, M., Račlová, K., Lietava, J., Somorovská, M., Petrovská, H., Dobříková, P. & Collins, A. (1999). Elevated DNA damage in lymphocytes from ankylosing spondylitis patients. In J. T. K. T. Salonen (ed.), *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*. 433–436.
- Ebner, A., Hinterdorfer, P. & Gruber, H.J. (2007). Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers. *Ultramicroscopy* 107(10–11): 922–927.
- El-Hussein, A., Harith, M. & Abrahamse, H. (2012). Assessment of DNA Damage after Photodynamic Therapy Using a Metallophthalocyanine Photosensitizer. *International Journal of Photoenergy* 2012: e281068.
- Enderlein, J. (2014). 4.09 - Advanced Fluorescence Microscopy. In A. Brahme (ed.), *Comprehensive Biomedical Physics*. Oxford: Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444536327004093>
- Erie, D.A., Yang, G., Schultz, H.C. & Bustamante, C. (1994). DNA bending by Cro protein in specific and nonspecific complexes: implications for protein site recognition and specificity. *Science* 266(5190): 1562–1566.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M. & Cooke, M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research* 567(1): 1–61.
- Fabris, C., Valduga, G., Miotto, G., Borsetto, L., Jori, G., Garbisa, S. & Reddi, E. (2001). Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis. *Cancer Research* 61(20): 7495–7500.
- Fang, Y. & Hoh, J.H. (1998). Surface-directed DNA condensation in the absence of soluble multivalent cations. *Nucleic Acids Research* 26(2): 588–593.
- Feng, X.J. & Jiang, L. (2006). Design and Creation of Superwetting/Antiwetting Surfaces. *Advanced Materials* 18(23): 3063–3078.
- Forchhammer, L., Ersson, C., Loft, S., Möller, L., Godschalk, R.W.L., van Schooten, F.J., ... Möller, P. (2012). Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol. *Mutagenesis* 27(6): 665–672.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. & Siede, W. (1995). *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press.
- Fronczek, D.N., Quammen, C., Wang, H., Kisker, C., Superfine, R., Taylor, R., ... Tessmer, I. (2011). High accuracy FIONA–AFM hybrid imaging. *Ultramicroscopy* 111(5): 350–355.
- Furre, I.E., Shahzidi, S. & Moller M.T. (2006). Furre IE, Moller MT, Shahzidi S et al. Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by

- hexaminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis* 11:2031–2042. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 11(11): 2031–42.
- Galligan, J.J., Rose, K.L., Beavers, W.N., Hill, S., Tallman, K.A., Tansey, W.P. & Marnett, L.J. (2014). Stable histone adduction by 4-oxo-2-nonenal: a potential link between oxidative stress and epigenetics. *Journal of the American Chemical Society* 136(34): 11864–11866.
- Garaj-Vrhovac, V. & Kopjar, N. (2003). The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis* 18(3): 265–271.
- Geisse, N.A. (2009). AFM and combined optical techniques. *Materials Today* 12(7–8): 40–45.
- Glick, D., Barth, S. & Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* 221(1): 3–12.
- Gołek, F., Mazur, P., Ryszka, Z. & Zuber, S. (2014). AFM image artifacts. *Applied Surface Science* 304: 11–19.
- Grebeňová, D., Kuželová, K., Smetana, K., Pluskalová, M., Cajthamlová, H., Marinov, I., ... Hrkal, Z. (2003). Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 69(2): 71–85.
- Gudowska-Nowak, E., Psonka-Antończyk, K., Weron, K., Elsässer, T. & Taucher-Scholz, G. (2009). Distribution of DNA fragment sizes after irradiation with ions. *The European Physical Journal E* 30(3): 317–324.
- Gurunathan, S., Klinman, D.M. & Seder, R.A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Review of Immunology* 18: 927–974.
- Hansma, H.G. & Laney, D.E. (1996). DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 70(4): 1933–1939.
- Hansma, H.G., Vesenka, J., Siegerist, C., Kelderman, G., Morrett, H., Sinsheimer, R.L., ... Hansma, P.K. (1992). Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope. *Science (New York, N.Y.)* 256(5060): 1180–1184.
- Hartung, A., Lisy, M.R., Herrmann, K.-H., Hilger, I., Schüller, D., Lang, C., ... Reichenbach, J.R. (2007). Labeling of macrophages using bacterial magnetosomes and their characterization by magnetic resonance imaging. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311(1): 454–459.
- Hegner, M., Wagner, P. & Semenza, G. (1993). Immobilizing DNA on gold via thiol modification for atomic force microscopy imaging in buffer solutions. *FEBS letters* 336(3): 452–456.
- Hell, S.W. & Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* 19(11): 780.
- Hergt, R., Dutz, S., Müller, R. & Zeisberger, M. (2006). Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *Journal of Physics: Condensed Matter* 18(38): S2919.
- Horák, D., Babic, M., Macková, H. & Benes, M.J. (2007). Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science* 30(11): 1751–1772.
- Horák, D., Španová, A., Tvrđíková, J. & Rittich, B. (2011). Streptavidin-modified magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) microspheres for selective isolation of bacterial DNA. *European Polymer Journal* 47(5): 1090–1096.

- Hori, K., Takahashi, T. & Okada, T. (1998). The measurement of exonuclease activities by atomic force microscopy. *European Biophysics Journal : EBJ* 27(1): 63–68.
- Jena, GB.P., H. J.K.H. (2002). *Atomic force microscopy in cell biology*. Academic press, San Diego and London.
- Jena, N.R. (2012). DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *Journal of Biosciences* 37(3): 503–517.
- J. Hu, M.W. (1996). Imaging of Single Extended DNA Molecules on Flat (Aminopropyl)triethoxysilane–Mica by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 12(7).
- Jiang, Y., Ke, C., Mieczkowski, P.A. & Marszalek, P.E. (2007a). Detecting Ultraviolet Damage in Single DNA Molecules by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 93(5): 1758–1767.
- Jiang, Y., Ke, C., Mieczkowski, P.A. & Marszalek, P.E. (2007b). Detecting Ultraviolet Damage in Single DNA Molecules by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 93(5): 1758–1767.
- Jiang, Y., Ke, C., Mieczkowski, P.A. & Marszalek, P.E. (2007c). Detecting Ultraviolet Damage in Single DNA Molecules by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 93(5): 1758–1767.
- Jiang, Y., Rabbi, M., Kim, M., Ke, C., Lee, W., Clark, R.L., ... Marszalek, P.E. (2009). UVA Generates Pyrimidine Dimers in DNA Directly. *Biophysical Journal* 96(3): 1151–1158.
- Jiang, Y., Rabbi, M., Mieczkowski, P.A. & Marszalek, P.E. (2010). Separating DNA with Different Topologies by Atomic Force Microscopy in Comparison with Gel Electrophoresis. *The Journal of Physical Chemistry B* 114(37): 12162–12165.
- JPK Instruments. (2012). NanoWizard AFM Handbook.
- Kakar, S., Batra, D., Singh, R. & Nautiyal, U. (2013). Magnetic microspheres as magical novel drug delivery system: A review. *Journal of Acute Disease* 2(1): 1–12.
- Kang, M.A., So, E.-Y., Simons, A.L., Spitz, D.R. & Ouchi, T. (2012). DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death & Disease* 3(1): e249.
- Kanno, T., Kawanishi, M., Takamura-Enya, T., Arlt, V.M., Phillips, D.H. & Yagi, T. (2007). DNA adduct formation in human hepatoma cells treated with 3-nitrobenzanthrone: analysis by the 32P-postlabeling method. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 634(1–2): 184–191.
- Kasas, S., Thomson, N.H., Smith, B.L., Hansma, H.G., Zhu, X., Guthold, M., ... Hansma, P.K. (1997). Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy. *Biochemistry* 36(3): 461–468.
- Kassab Kawser. (2009). Evaluating the antitumour activity of combined photochemotherapy mediated by a meso-substituted tetracationic porphyrin and adriamycin. *Acta Biochim Biophys Sin* 2009: 892–899.
- Ke, C., Jiang, Y., Mieczkowski, P.A., Muramoto, G.G., Chute, J.P. & Marszalek, P.E. (2008). Nanoscale detection of ionizing radiation damage to DNA by atomic force microscopy. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 4(2): 288–294.
- Ke, C., Lokszejn, A., Jiang, Y., Kim, M., Humeniuk, M., Rabbi, M. & Marszalek, P.E. (2009). Detecting solvent-driven transitions of poly(A) to double-stranded conformations by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 96(7): 2918–2925.
- Kessel David. (1997). Subcellular Localization of Photosensitizing Agents Introduction. *Photochemistry and Photobiology* 387–388.

- Kessel, D. & Oleinick, N.L. (2009). Initiation of autophagy by photodynamic therapy. *Methods in Enzymology* 453: 1–16.
- Kienberger, F., Pastushenko, V.P., Kada, G., Puntheeranurak, T., Chtcheglova, L., Riethmueller, C., ... Hinterdorfer, P. (2006). Improving the contrast of topographical AFM images by a simple averaging filter. *Ultramicroscopy* 106(8–9): 822–828.
- Kim, J.-S., Choi, J.S., Lee, M.J., Park, B.H., Bukhvalov, D., Son, Y.-W., ... Salmeron, M. (2013). Between Scylla and Charybdis: Hydrophobic Graphene-Guided Water Diffusion on Hydrophilic Substrates. *Scientific Reports* 3.
- Klaene, J.J., Sharma, V.K., Glick, J. & Vouros, P. (2013). The analysis of DNA adducts: The transition from 32P-postlabeling to mass spectrometry. *Cancer Letters* 334(1): 10–19.
- Klar, T.A., Engel, E. & Hell, S.W. (2001). Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes. *Physical Review E* 64(6): 066613.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. & Hocevar, B.A. (2010). Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 38(1): 96–109.
- Klinov, D., Dwir, B., Kapon, E., Borovok, N., Molotsky, T. & Kotlyar, A. (2007). High-resolution atomic force microscopy of duplex and triplex DNA molecules. *Nanotechnology* 18(22): 225102.
- Kojima, M., Morita, T., Shirai, T., Degawa, M. & Tada, M. (1992). Immunological Detection and Quantitation of DNA Adducts Formed by 4-Aminoazobenzene Species in vivo. *Japanese Journal of Cancer Research* 83(1): 78–85.
- Kowalczyk, D., Slomkowski, S., Chehimi, M.M. & Delamar, M. (1996). Adsorption of aminopropyltriethoxy silane on quartz: an XPS and contact angle measurements study. *International Journal of Adhesion and Adhesives* 16(4): 227–232.
- Kramer, A., Liashkovich, I., Oberleithner, H. & Shahin, V. (2010). Caspase-9-dependent decrease of nuclear pore channel hydrophobicity is accompanied by nuclear envelope leakiness. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6(5): 605–611.
- Kransnoslobodtsev, A.V., Shlyakhtenko, L.S., Ukraintsev, E., Zaikova, T.O., Keana, J.F.W. & Lyubchenko, Y.L. (2005). Nanomedicine and protein misfolding diseases. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 1(4): 300–305.
- Kransnoslobodtsev, A.V., Shlyakhtenko, L.S. & Lyubchenko, Y.L. (2007). Probing Interactions within the synaptic DNA-SfiI complex by AFM force spectroscopy. *Journal of Molecular Biology* 365(5): 1407–1416.
- Kubínek, R., V., M. & Mašláň M. (2003). *Mikroskopie skenující sondou*. Univerzita Palackého v Olomouci. Retrieved from [http://www.knihy-dvd.cz/univerzita\\_palackeho\\_olomouc/mikroskopie\\_skenujici\\_sondou.html](http://www.knihy-dvd.cz/univerzita_palackeho_olomouc/mikroskopie_skenujici_sondou.html)
- Kudinova, N.V. & Berezov, T.T. (2010). Photodynamic therapy of cancer: Search for ideal photosensitizer. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 4(1): 95–103.
- Kumari, Rastogi, Kanchan, Singh L. & Sinha R. P. (2008). DNA Damage: Detection Strategies. *EXCLI Journal* 2005(7): 44–62.
- Kurk, T., Adams, D.G., Connell, S.D. & Thomson, N.H. (2010). Three-channel false colour AFM images for improved interpretation of complex surfaces: A study of filamentous cyanobacteria. *Ultramicroscopy* 110(6): 718–722.
- Kuwahara, Y. (2001). Comparison of the surface structure of the tetrahedral sheets of muscovite and phlogopite by AFM. *Physics and Chemistry of Minerals* 28(1): 1–8.

- Kwok, D.Y., Gietzelt, T., Grundke, K., Jacobasch, H.-J. & Neumann, A.W. (1997). Contact Angle Measurements and Contact Angle Interpretation. 1. Contact Angle Measurements by Axisymmetric Drop Shape Analysis and a Goniometer Sessile Drop Technique. *Langmuir* 13(10): 2880–2894.
- Kwon, E.-Y., Kim, Y.-T. & Kim, D.-E. (2009). Investigation of penetration force of living cell using an atomic force microscope. *Journal of Mechanical Science and Technology* 23(7): 1932–1938.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L. & Muller, R.N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews* 108(6): 2064–2110.
- Lee, G., Rabbi, M., Clark, R.L. & Marszalek, P.E. (2007). Nanomechanical fingerprints of UV damage to DNA. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 3(5): 809–813.
- Lee, G.U., Chrisey, L.A. & Colton, R.J. (1994). Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science* 266(5186): 771–773.
- Leforestier, A., Šiber, A., Livolant, F. & Podgornik, R. (2011). Protein-DNA Interactions Determine the Shapes of DNA Toroids Condensed in Virus Capsids. *Biophysical Journal* 100(9): 2209–2216.
- Leung, C., Bestembayeva, A., Thorogate, R., Stinson, J., Pyne, A., Marcovich, C., ... Hoogenboom, B.W. (2012). Atomic Force Microscopy with Nanoscale Cantilevers Resolves Different Structural Conformations of the DNA Double Helix. *Nano Letters* 12(7): 3846–3850.
- Liang, Y., Yan Ch. & Schor F. (2001). Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene* (20); 6570-9578./
- Liao, W., McNutt, M.A. & Zhu, W.-G. (2009). The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods (San Diego)* 48(1): 46–53.
- Liberelle, B., Banquy, X. & Giasson, S. (2008). Stability of Silanols and Grafted Alkylsilane Monolayers on Plasma-Activated Mica Surfaces. *Langmuir* 24(7): 3280–3288.
- Li, S., Kui, Z., Mei-Nan, N., Ji-Yu, G., Fu-Quan, K., Ming-Hui, C., ... Ping, Z. (2005). Atomic Force Microscopy Measurement of DNA Fragment Induced by Heavy Ions. *Chinese Physics Letters* 22(4): 1010.
- Liu, J., Jiang, X., Huang, X. & Wu, S. (2010). Morphological characterization of super fine pulverized coal particle. Part 2. AFM investigation of single coal particle. *Fuel* 89(12): 3884–3891.
- Liu, M.A. (2011). DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological Reviews* 239(1): 62–84.
- Liu, Z., Li, Z., Zhou, H., Wei, G., Song, Y. & Wang, L. (2005). Immobilization and condensation of DNA with 3-aminopropyltriethoxysilane studied by atomic force microscopy. *Journal of Microscopy* 218: 233–239.
- Liu, Z., Li, Z., Zhou, H., Wei, G., Song, Y. & Wang, L. (2005). Imaging DNA molecules on mica surface by atomic force microscopy in air and in liquid. *Microscopy Research and Technique* 66(4): 179–185.
- Lohr, D., Bash, R., Wang, H., Yodh, J. & Lindsay, S. (2007). Using atomic force microscopy to study chromatin structure and nucleosome remodeling. *Methods (San Diego, Calif.)* 41(3): 333–341.
- Lyubchenko, Sherman, S., Shlyakhtenko, L.S. & Uversky, V.N. (2006). Nanoimaging for protein misfolding and related diseases. *Journal of Cellular Biochemistry* 99(1): 52–70.

- Lyubchenko, Y.L. (2011). Preparation of DNA and nucleoprotein samples for AFM imaging. *Micron (Oxford, England: 1993)* 42(2): 196–206.
- Lyubchenko, Y.L., Oden, P.I., Lampner, D., Lindsay, S.M. & Dunker, K.A. (1993). Atomic force microscopy of DNA and bacteriophage in air, water and propanol: the role of adhesion forces. *Nucleic Acids Research* 21(5): 1117–1123.
- Lyubchenko, Y.L., Shlyakhtenko, L.S., Aki, T. & Adhya, S. (1997). Atomic force microscopic demonstration of DNA looping by GalR and HU. *GalR and HU*, *Nucl. Acids Res.*
- Lyubchenko, Y.L. & Shlyakhtenko, L.S. (1997). Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(2): 496–501.
- Lyubchenko, Y.L., Shlyakhtenko, L.S. & Ando, T. (2011). Imaging of nucleic acids with atomic force microscopy. *Methods (San Diego, Calif.)* 54(2): 274–283.
- Maaloum, M., Beker, A.-F. & Muller, P. (2011). Secondary structure of double-stranded DNA under stretching: Elucidation of the stretched form. *Physical Review E* 83(3): 031903.
- Maeda, Y., Matsumoto, T. & Kawai, T. (1999). Observation of single- and double-stranded DNA using non-contact atomic force microscopy. *Applied Surface Science* 140(3–4): 400–405.
- Mahut, M., Leitner, M., Ebner, A., Lämmerhofer, M., Hinterdorfer, P. & Lindner, W. (2011). Time-resolved chloroquine-induced relaxation of supercoiled plasmid DNA. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402(1): 373–380.
- Mak, N.-K., Li, K.-M., Leung, W.-N., Wong, R.N.-S., Huang, D.P., Lung, M.L., ... Chang, C.K. (2004). Involvement of both endoplasmic reticulum and mitochondria in photokilling of nasopharyngeal carcinoma cells by the photosensitizer Zn-BC-AM. *Biochemical Pharmacology* 68(12): 2387–2396.
- Martin, A.L., Davies, M.C., Rackstraw, B.J., Roberts, C.J., Stolnik, S., Tendler, S.J.B. & Williams, P.M. (2000). Observation of DNA–polymer condensate formation in real time at a molecular level. *FEBS Letters* 480(2–3): 106–112.
- McAllister, C., Karymov, M.A., Kawano, Y., Lushnikov, A.Y., Mikheikin, A., Uversky, V.N. & Lyubchenko, Y.L. (2005). Protein interactions and misfolding analyzed by AFM force spectroscopy. *Journal of Molecular Biology* 354(5): 1028–1042.
- Mc Gee, M.M., Hyland, E., Campiani, G., Ramunno, A., Nacci, V. & Zisterer, D.M. (2002). Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-6. *FEBS Letters* 515(1–3): 66–70.
- Meiron, T.S., Marmur, A. & Saguy, I.S. (2004). Contact angle measurement on rough surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 274(2): 637–644.
- Menke, M., Angelis, K.J. & Schubert, I. (2000). Detection of specific DNA lesions by a combination of comet assay and FISH in plants. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35(2): 132–138.
- Mercer, J., M.M. (2007). DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease. *Mutation research* 621(1-2): 75–86.
- Mettath, S., Munson, B.R. & Pandey, R.K. (1999). DNA interaction and photocleavage properties of porphyrins containing cationic substituents at the peripheral position. *Bioconjugate Chemistry* 10(1): 94–102.
- Metwalli, E., Haines, D., Becker, O., Conzone, S. & Pantano, C.G. (2006). Surface characterizations of mono-, di-, and tri-aminosilane treated glass substrates. *Journal of Colloid and Interface Science* 298(2): 825–831.
- Meyer, E., Hug, H.J. & Bennewitz, R. (2013). *Scanning Probe Microscopy: The Lab on a Tip*. Springer Science & Business Media.



- Mirkin Sergei M. (2001). DNA Topology: FUndamentals. *Encyclopedia of life sciences 2001*.
- Mladenov, E. & Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 711*(1–2): 61–72.
- Mooney, L.M., Al-Sakkaf, K.A., Brown, B.L. & Dobson, P.R.M. (2002). Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *British Journal of Cancer 87*(8): 909–917.
- Morley, N., Rapp, A., Dittmar, H., Salter, L., Gould, D., Greulich, K.O. & Curnow, A. (2006). UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells. *Mutagenesis 21*(2): 105–114.
- Morris, V.J., K.A.R. (1999). *Atomic Force Microscopy for Biologists*. Imperial College Press, London.
- Mou, J., Czajkowsky, D.M., Zhang, Y. & Shao, Z. (1995). High-resolution atomic-force microscopy of DNA: the pitch of the double helix. *FEBS letters 371*(3): 279–282.
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G.B. & Hamblin, M.R. (2011). Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers 3*(2): 2516–2539.
- Murakami, M., Hirokawa, H. & Hayata, I. (2000). Analysis of radiation damage of DNA by atomic force microscopy in comparison with agarose gel electrophoresis studies. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods 44*(1–2): 31–40.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA Fragmentation. *Experimental Cell Research 256*(1): 12–18.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N. & Fukuyama, H. (2003). Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death & Differentiation 10*(1): 108–116.
- Nečas, D. & Klapeček, P. (2012). Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Open Physics 10*(1): 181–188.
- Newbury, D.E. & Williams, D.B. (2000). The electron microscope: the materials characterization tool of the millennium. *Acta Materialia 48*(1): 323–346.
- Noll, F., Geisler, B. & Hampp, N. (2001). Improvement of DNA-visualization in dynamic mode atomic force microscopy in air. *Scanning 23*(3): 175–181.
- Nonaka, T., Nanashima, A., Nonaka, M., Uehara, M., Isomoto, H., Asahina, I. & Nagayasu, T. (2010). Analysis of apoptotic effects induced by photodynamic therapy in a human biliary cancer cell line. *Anticancer Research 30*(6): 2113–2118.
- O'Connor, A.E., Gallagher, W.M. & Byrne, A.T. (2009). Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology 85*(5): 1053–1074.
- Oleinick, N.L., Morris, R.L. & Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology 1*(1): 1–21.
- Oliveira, C.S., Turchiello, R., Kowaltowski, A.J., Indig, G.L. & Baptista, M.S. (2011). Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radical Biology and Medicine 51*(4): 824–833.
- Olive P.L. & Banáth J.P. (1993). Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125 IdUrd. *Int. J. Radiat. Biol 64*(4): 349–358.
- Osaka, T., Matsunaga, T., Nakanishi, T., Arakaki, A., Niwa, D. & Iida, H. (2006). Synthesis of magnetic nanoparticles and their application to bioassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry 384*(3): 593–600.

- Paddock, S.W. (2000). Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Molecular Biotechnology* 16(2): 127–149.
- Pamme, N. (2012). On-chip bioanalysis with magnetic particles. *Current Opinion in Chemical Biology* 16(3–4): 436–443.
- Pang, D., Berman, B.L., Chasovskikh, S., Rodgers, J.E. & Dritschilo, A. (1998). Investigation of Neutron-Induced Damage in DNA by Atomic Force Microscopy: Experimental Evidence of Clustered DNA Lesions. *Radiation Research* 150(6): 612–618.
- Pang, D., Rodgers, J.E., Berman, B.L., Chasovskikh, S. & Dritschilo, A. (2005). Spatial Distribution of Radiation-Induced Double-Strand Breaks in Plasmid DNA as Resolved by Atomic Force Microscopy. *Radiation Research* 164(6): 755–765.
- Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K. & Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* 36(13): R167.
- Pasternack, R.M., Rivillon Amy, S. & Chabal, Y.J. (2008). Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. *Langmuir* 24(22): 12963–12971.
- Pastré, D., Piétrement, O., Fusil, S., Landousy, F., Jeusset, J., David, M.-O., ... Zozime, A. (2003). Adsorption of DNA to mica mediated by divalent counterions: a theoretical and experimental study. *Biophysical Journal* 85(4): 2507–2518.
- Patito, I.A., Rothmann, C. & Malik, Z. (2001). Nuclear transport of photosensitizers during photosensitization and oxidative stress. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 93(5): 285–291.
- Peng, Q., Farrants, G.W., Madslie, K., Bommer, J.C., Moan, J., Danielsen, H.E. & Nesland, J.M. (1991). Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminum phthalocyanines in a human melanoma cell line. *International Journal of Cancer* 49(2): 290–295.
- Pfannschmidt, C., Schaper, A., Heim, G., Jovin, T.M. & Langowski, J. (1996). Sequence-specific labeling of superhelical DNA by triple helix formation and psoralen crosslinking. *Nucleic Acids Research* 24(9): 1702–1709.
- Pížová Klára. (2015). Studium účinku elektromagnetického záření a ultrazvuku na buněčných liniích, *Lékař a technika*.
- Plaetzer, K., Kiesslich, T., Krammer, B. & Hammerl, P. (2002). Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS4-PDT. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 1(3): 172–177.
- Plank & Zepathi, (druhý). (2011). Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects. *Advanced drug delivery reviews* 63(14-15): 1300–31.
- Plueddemann, E.P., P.P.G. (1984). Silanols and Siloxanes as Coupling Agents and Primers. *39th Annual Conference, The society of Plastics Industry*.
- Potaman, V.N., Oussatcheva, E.A., Lyubchenko, Y.L., Shlyakhtenko, L.S., Bidichandani, S.I., Ashizawa, T. & Sinden, R.R. (2004). Length-dependent structure formation in Friedreich ataxia (GAA)<sub>n</sub>·(TTC)<sub>n</sub> repeats at neutral pH. *Nucleic Acids Research* 32(3): 1224–1231.
- Psonka, K., Brons, S., Heiss, M., Gudowska-Nowak, E. & Taucher-Scholz, G. (2005). Induction of DNA damage by heavy ions measured by atomic force microscopy. *Journal of Physics: Condensed Matter* 17(18): S1443.
- Puri, J.K., Singh, R. & Chahal, V.K. (2011). Silatranes: a review on their synthesis, structure, reactivity and applications. *Chemical Society Reviews* 40(3): 1791–1840.

- Pushpan, S.K., Venkatraman, S., Anand, V.G., Sankar, J., Parmeswaran, D., Ganesan, S. & Chandrashekar, T.K. (2002). Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents* 2(2): 187–207.
- Rajendran, M. (2015). Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (13): 175–187.
- Rittich, B. & Spanová, A. (2013). SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* 36(15): 2472–2485.
- Rivetti, C. & Codeluppi, S. (2001). Accurate length determination of DNA molecules visualized by atomic force microscopy: evidence for a partial B- to A-form transition on mica. *Ultramicroscopy* 87(1–2): 55–66.
- Robertson, C.A., Evans, D.H. & Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96(1): 1–8.
- Roos, W.P. & Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine* 12(9): 440–450.
- Roos, W.P. & Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters* 332(2): 237–248.
- Rosenthal, I. (1991). Phthalocyanines as Photodynamic Sensitizers\*. *Photochemistry and Photobiology* 53(6): 859–870.
- Rüdenberg, R. (2010). Origin and Background of the Invention of the Electron Microscope. In B.-A. in I. and E. Physics (ed.), (160): 171–205.
- Rybenkov, V.V., Vologodskii, A.V. & Cozzarelli, N.R. (1997a). The effect of ionic conditions on the conformations of supercoiled DNA. I. sedimentation analysis. *Journal of Molecular Biology* 267(2): 299–311.
- Rybenkov, V.V., Vologodskii, A.V. & Cozzarelli, N.R. (1997b). The effect of ionic conditions on the conformations of supercoiled DNA. II. equilibrium catenation1. *Journal of Molecular Biology* 267(2): 312–323.
- Saczko, J., Choromańska, A., Rembiałkowska, N., Dubińska-Magiera, M., Bednarz-Misa, I., Bar, J., ... Kulbacka, J. (2015). Oxidative modification induced by photodynamic therapy with Photofrin®II and 2-methoxyestradiol in human ovarian clear carcinoma (OvBH-1) and human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 71: 30–36.
- Saczko, J., Kulbacka, J., Chwiłkowska, A., Drag-Zalesińska, M., Wysocka, T., Lugowski, M. & Banaś, T. (2005). The influence of photodynamic therapy on apoptosis in human melanoma cell line. *Folia Histochemica Et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 43(3): 129–132.
- Saeko Tada-Oikawa, S.O. (2009). DNA Damage and Apoptosis Induced by Photosensitization of 5,10,15,20-Tetrakis ( N -methyl-4-pyridyl)-21 H ,23 H -porphyrin via Singlet Oxygen Generation. *Photochemistry and photobiology* 85(6): 1391–9.
- Šafařík, I. & Šafaříková, M. (2004). Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagnetic Research and Technology* 2: 7.
- Šafařík, I. & Šafaříková, M. (1999). Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722(1–2): 33–53.
- Salmio, H. & Brühwiler, D. (2007). Distribution of Amino Groups on a Mesoporous Silica Surface after Submonolayer Deposition of Aminopropylsilanes from an Anhydrous Liquid Phase. *The Journal of Physical Chemistry C* 111(2): 923–929.

- Sanchez-Sevilla, A., Thimonier, J., Marilley, M., Rocca-Serra, J. & Barbet, J. (2002). Accuracy of AFM measurements of the contour length of DNA fragments adsorbed on mica in air and in aqueous buffer. *Ultramicroscopy* 92(3–4): 151–158.
- Santella, R.M. (1999). Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 8(9): 733–739.
- Savvateev M.N. (2012). Preparation of samples of DNA molecules for AFM measurements.
- Schillinger, U., Brill, T., Rudolph, C., Huth, S., Gersting, S., Krötz, F., ... Plank, C. (2005). Advances in magnetofection—magnetically guided nucleic acid delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1): 501–508.
- Semenov, D.V., Aronov, P.A., Kuligina, E.V., Potapenko, M.O. & Richter, V.A. (2004). Oligonucleosome DNA fragmentation of caspase 3 deficient MCF-7 cells in palmitate-induced apoptosis. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 23(6-7): 831–836.
- Shao, L., Tao, N.J. & Leblanc, R.M. (1997). Probing the microelastic properties of nanobiological particles with tapping mode atomic force microscopy. *Chemical Physics Letters* 273(1–2): 37–41.
- Shaposhnikov, S., Brunborg, G., Azqueta, A., Gaivão, I., Smart, A. & Collins, A.R. (2013). Novel formats for the comet assay. *Toxicology Letters* 221, Supplement: S189.
- Shlyakhtenko, L.S., Gall, A.A., Filonov, A., Cerovac, Z., Lushnikov, A. & Lyubchenko, Y.L. (2003). Silatrane-based surface chemistry for immobilization of DNA, protein-DNA complexes and other biological materials. *Ultramicroscopy* 97(1–4): 279–287.
- Shlyakhtenko, L.S., Gall, A.A. & Lyubchenko, Y.L. (2013). Mica functionalization for imaging of DNA and protein-DNA complexes with atomic force microscopy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 931: 295–312.
- Shlyakhtenko, L.S., Milosenska, L., Potaman, V.N., Sinden, R.R. & Lyubchenko, Y.L. (2003). Intersegmental interactions in supercoiled DNA: atomic force microscope study. *Ultramicroscopy* 97(1–4): 263–270.
- Shlyakhtenko, L.S., Potaman, V.N., Sinden, R.R., Gall, A.A. & Lyubchenko, Y.L. (2000). Structure and dynamics of three-way DNA junctions: atomic force microscopy studies. *Nucleic Acids Research* 28(18): 3472–3477.
- Shlyakhtenko, L.S., Potaman, V.N., Sinden, R.R. & Lyubchenko, Y.L. (1998). Structure and dynamics of supercoil-stabilized DNA cruciforms. *Journal of Molecular Biology* 280(1): 61–72.
- Shlyakhtenko, L.S., Yuan, B., Emadi, S., Lyubchenko, Y.L. & Sierks, M.R. (2007). Single-molecule selection and recovery of structure-specific antibodies using atomic force microscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3(3): 192–197.
- Shlyakhtenko, L.S., A.A.G. (2003). Silatrane-based surface chemistry for immobilization of DNA, protein-DNA complexes and other biological materials. *Ultramicroscopy* 97(1-4): 279–87.
- Shuck, S.C., Rose, K.L. & Marnett, L.J. (2014). Mass spectrometric methods for the analysis of nucleoside-protein cross-links: application to oxopropenyl-deoxyadenosine. *Chemical Research in Toxicology* 27(1): 136–146.
- Sibata, C.H., Colussi, V.C., Oleinick, N.L. & Kinsella, T.J. (2001). Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2(6): 917–927.

- Silva, J. da, Freitas, T.R.O. de, Marinho, J.R., Speit, G. & Erdtmann, B. (2000). An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology* 23(1): 241–245.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175(1): 184–191.
- Singh, R. & Farmer, P.B. (2006). Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis* 27(2): 178–196.
- Sjorstrand, F. S. (1988). Ernst Ruska (1906–1988), a genius and a fine person. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* 101(1): vi–3.
- S. Kasas, N.H.T. (1997). Biological applications of the AFM: From single molecules to organs. *International Journal of Imaging Systems and Technology* 8(2): 151–161.
- Spyratou, E., Makropoulou, M., Mourelatou, E.A. & Demetzos, C. (2012). Biophotonic techniques for manipulation and characterization of drug delivery nanosystems in cancer therapy. *Cancer Letters* 327(1–2): 111–122.
- Stephens, D.J. & Allan, V.J. (2003). Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science* 300(5616): 82–86.
- Stiborová, M., Schmeiser, H.H., Wiessler, M. & Frei, E. (1999). Direct evidence for the formation of deoxyribonucleotide adducts from carcinogenic N-nitroso-N-methylaniline revealed by the 32P-postlabeling technique. *Cancer Letters* 138(1–2): 61–66.
- Tang, D., Lahti, J.M. & Kidd, V.J. (2000). Caspase-8 Activation and Bid Cleavage Contribute to MCF7 Cellular Execution in a Caspase-3-dependent Manner during Staurosporine-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 275(13): 9303–9307.
- Thormann, E., Pettersson, T., Kettle, J. & Claesson, P.M. (2010). Probing material properties of polymeric surface layers with tapping mode AFM: Which cantilever spring constant, tapping amplitude and amplitude set point gives good image contrast and minimal surface damage? *Ultramicroscopy* 110(4): 313–319.
- Thundat, T., Allison, D.P., Warmack, R.J., Brown, G.M., Jacobson, K.B., Schrick, J.J. & Ferrell, T.L. (1992). Atomic force microscopy of DNA on mica and chemically modified mica. *Scanning Microscopy* 6(4): 911–918.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., ... Sasaki Y.F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000(35): 206–221.
- Tiner Sr, W.J., Potaman, V.N., Sinden, R.R. & Lyubchenko, Y.L. (2001). The structure of intramolecular triplex DNA: atomic force microscopy study. *Journal of Molecular Biology* 314(3): 353–357.
- Tomczak, N. & Goh, K.E.J. (2010). *Scanning Probe Microscopy*. WORLD SCIENTIFIC. Retrieved from <http://www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/7943>
- Tong, Z., Mikheikin, A., Krasnoslobodtsev, A., Lv, Z. & Lyubchenko, Y.L. (2013). Novel polymer linkers for single molecule AFM force spectroscopy. *Methods (San Diego, Calif.)* 60(2): 161–168.
- Trachtová, Š., Zapletalová, H., Španová, A., Horák, D., Kolářová, H. & Rittich, B. (2015). The Evaluation of Magnetic Polymethacrylate-based Microspheres Used for Solid Phase DNA Micro-Extraction. *Chromatography* 2(2): 156–166.
- Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J.H.M. & Stewart, F.A. (2006). Photodynamic therapy in oncology. *The Oncologist* 11(9): 1034–1044.

- Tsien, R.Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry* 67(1): 509–544.
- Utsuno, K., Tsuboi, M., Katsumata, S. & Iwamoto, T. (2002). Visualization of complexes of Hoechst 33258 and DNA duplexes in solution by atomic force microscopy. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 50(2): 216–219.
- Vandenberg, E.T., Bertilsson, L., Liedberg, B., Uvdal, K., Erlandsson, R., Elwing, H. & Lundström, I. (1991). Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon oxide. *Journal of Colloid and Interface Science* 147(1): 103–118.
- van Loo, G., Saelens, X., van Gorp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J. & Vandenabeele, P. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation* 9(10): 1031–1042.
- Veiseh, O., Gunn, J.W. & Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(3): 284–304.
- Venza, M., Visalli, M., Beninati, C., De Gaetano, G.V., Teti, D. & Venza, I. (2015). Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Action in Melanoma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015: e481782.
- Verplanck, N., Coffinier, Y., Thomy, V. & Boukherroub, R. (2007). Wettability Switching Techniques on Superhydrophobic Surfaces. *Nanoscale Research Letters* 2(12): 577.
- Vittar, N.B.R., Awruch, J., Azizuddin, K. & Rivarola, V. (2010). Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42(7): 1123–1131.
- Vologodskii, A.V., Levene, S.D., Klenin, K.V., Frank-Kamenetskii, M. & Cozzarelli, N.R. (1992). Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *Journal of Molecular Biology* 227(4): 1224–1243.
- Vrouenraets, M.B., Visser, G.W., Loup, C., Meunier, B., Stigter, M., Oppelaar, H., ... van Dongen, G.A. (2000). Targeting of a hydrophilic photosensitizer by use of internalizing monoclonal antibodies: A new possibility for use in photodynamic therapy. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 88(1): 108–114.
- Wacker, R., Ceyhan, B., Alhorn, P., Schueler, D., Lang, C. & Niemeyer, C.M. (2007). Magneto Immuno-PCR: A novel immunoassay based on biogenic magnetosome nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357(2): 391–396.
- Wang, H., Yang, Y., Schofield, M.J., Du, C., Fridman, Y., Lee, S.D., ... Erie, D.A. (2003). DNA bending and unbending by MutS govern mismatch recognition and specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(25): 14822–14827.
- Wang, W. & Vaughn, M.W. (2008). Morphology and amine accessibility of (3-aminopropyl) triethoxysilane films on glass surfaces. *Scanning* 30(2): 65–77.
- Watson, J.D. & Crick, F.H.C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356): 737–738.
- Wayne, R. (2014). Chapter 11 - Fluorescence Microscopy. In R. Wayne (ed.), *Light and Video Microscopy (Second Edition)*. San Diego: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124114845000111>
- Wei, K.-C., Yang, H.-W., Hua, Liu & Huang. (2012). Potential of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanotechnology, Science and Applications* 73.
- Westphal, V., Blanca, C.M., Dyba, M., Kastrop, L. & Hell, S.W. (2003). Laser-diode-stimulated emission depletion microscopy. *Applied Physics Letters* 82(18): 3125–3127.

- Whitacre, C.M., Satoh, T.H., Xue, L., Gordon, N.H. & Oleinick, N.L. (2002). Photodynamic therapy of human breast cancer xenografts lacking caspase-3. *Cancer Letters* 179(1): 43–49.
- William N. Sharpe, Jr. (n.d.). *Handbook of Experimental Solid Mechanics*,. Retrieved from <http://www.springer.com/us/book/9780387268835>
- Winzer, A.T., Kraft, C., Bhushan, S., Stepanenko, V. & Tessmer, I. (2012). Correcting for AFM tip induced topography convolutions in protein-DNA samples. *Ultramicroscopy* 121: 8–15.
- Witucky, G.L. (1992). A Silane Primer: Chemistry and Applications of Alkoxy Silanes. *A journal of Coatings Technology Reprint*.
- Wojewódzka, Maria, Grądzka, Iwona & Buraczewska, Iwona. (2002). Modified neutral comet assay for human lymphocytes. *Nukleonika* 47(1): 1–5.
- Wood, J. & Sharma, R. (1994). Preparation of a Robust Hydrophobic Monolayer on Mica. *Langmuir* 10(7): 2307–2310.
- Xu, Y. & Wang, E. (2012). Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles. *Electrochimica Acta* 84: 62–73.
- Yamamoto, D., Uchihashi, T., Kodera, N., Yamashita, H., Nishikori, S., Ogura, T., ... Ando, T. (2010). High-speed atomic force microscopy techniques for observing dynamic biomolecular processes. *Methods in Enzymology* 475: 541–564.
- Yang, G., Vesenka, J.P. & Bustamante, C.J. (1996). Effects of tip-sample forces and humidity on the imaging of DNA with a scanning force microscope. *Scanning* 18(5): 344–350.
- Yang, J., Mou, J. & Shao, Z. (1994). Molecular resolution atomic force microscopy of soluble proteins in solution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1199(2): 105–114.
- Yang, J., Takeyasu, K. & Shao, Z. (1992). Atomic force microscopy of DNA molecules. *FEBS letters* 301(2): 173–176.
- Yang, J., Tamm, L.K., Tillack, T.W. & Shao, Z. (1993). New approach for atomic force microscopy of membrane proteins. The imaging of cholera toxin. *Journal of Molecular Biology* 229(2): 286–290.
- Yang L., C.D.M., Sun J., H.J. & Shao Z. (2014). Anomalous Surface Fatigue in a Nano-Layered Material *Volume 26*(Issue 37): 6478–6482.
- Zapletalová H., Tománková B.K., Malohlava J., Kolářová H. (2016). Combination of Atomic Force Microscopy and Comet Assay for Analysis of DNA damage induced by PDT. *Clinician and Technology Journal-in press*.
- Zapletalová H., Tománková B.K., Malohlava J., Vůjtek M., & Kolářová H. (2014). Analysis of magnetic micro particles surface using the atomic force microscopy, *Lékař a technika*. 2014, 44(2), 34-41. ISSN 0301-5491.
- Zapletalová H., Příbyl J., Vůjtek M., Skládal P. & Kolářová H. (2016). Improved Method for Surface Immobilization of DNA Molecules Used in AFM. *Mediterranean Journal of Chemistry* 2016-in press.
- Zeng, X., Xu, G., Gao, Y. & An, Y. (2011). Surface wettability of (3-aminopropyl)triethoxysilane self-assembled monolayers. *The Journal of Physical Chemistry. B* 115(3): 450–454.
- Zhang, F., Sautter, K., Larsen, A.M., Findley, D.A., Davis, R.C., Samha, H. & Linford, M.R. (2010). Chemical vapor deposition of three aminosilanes on silicon dioxide: surface characterization, stability, effects of silane concentration, and cyanine dye adsorption. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* 26(18): 14648–14654.

- Zhang, F. & Srinivasan, M.P. (2004). Self-Assembled Molecular Films of Aminosilanes and Their Immobilization Capacities. *Langmuir* 20(6): 2309–2314.
- Zhang, P. & Tan, W. (2001). Atomic force microscopy for the characterization of immobilized enzyme molecules on biosensor surfaces. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 369(3-4): 302–307.
- Zhao, B., Yin, J.-J., Bilski, P.J., Chignell, C.F., Roberts, J.E. & He, Y.-Y. (2009). Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 241(2): 163–172.
- Zhu, M., Lerum, M.Z. & Chen, W. (2012). How to prepare reproducible, homogeneous, and hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* 28(1): 416–423.
- Zybill, C.E., How, G.A., Luo, L., Wen, Y.C. & Meng, E.F.K. (1997). Monomolecular silane films on glass surfaces--contact angle measurements. *Journal of Organometallic Chemistry* 1(547): 167–172.





## 11. Publikační činnost autora

### *Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF*

Zapletalová H., Příbyl J., Vůjtek M., Skládal P., Kolářová H., *Improved Method for Mica Functionalization Used in Single Molecule Imaging of DNA with Atomic Force Microscopy*, Journal of Mediterranean chemistry, 2016. IF (2015) – 1,4, in press.

Trachtová Š., Zapletalová H., Španová A., Horák D., Kolářová H., Rittich B., *The Evaluation of Magnetic Polymethacrylate-based Microspheres Used for Solid Phase DNA Micro-Extraction*, Chromatography, vol. 2, 156-166, 2015. IF (2015) – 2,7

### *Původní vědecké publikace uveřejněné v recenzovaném časopise*

Zapletalová H., Tománková B. K., Malohlava J., Vůjtek M., Kolářová H., *Combination of Atomic force microscopy and comet assay analysis of DNA damage induced by PDT*, Clinician and Technology Journal, 2016, in press.

Zapletalová H., Pížová K., Malohlava J., Kolářová H., *Analýza povrchu magnetických mikročástic prostřednictvím mikroskopie atomárních sil*. Lékař a technika. 2014, 44(2), 34-41. ISSN 0301-5491.

Pížová K., Tománková K., Langová A., Hanáková Al., Lenobelová H., Zapletalová H., Malohlava J., Binder J., Bajgar R., Kolářová H. *Vliv ultrazvuku na účinnost fotodynamické terapie - in vitro studie*. Lékař a technika. 2012, 42(4), 18-22. ISSN 0301-5491.

Tománková K., Kolářová H., Bajgar R., Vůjtek M., Dušková (Zapletalová) H.: *Studium fotodynamického efektu na nádorových buněčných liniích pomocí mikroskopie atomárních sil*. Jemná mechanika a optika 10 (2007), 285-289.

### *Kapitoly v zahraniční monografii*

Malohlava J., Zapletalová H., Tománková K., Kolářová H. *Atomic force microscopy: Studying mechanical properties of a cell*. In: Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. 5.vyd. Badajoz, Spain: Formatex, 2012. Kapitola 64, s. 528–532. ISBN: 978-84-939843-5-9.

Tomankova K., Kolarova H., Vujtek M., Zapletalová H. *Study of Cancer Cells Used Atomic Force Microscopy*. Formatex - Microscopy book series, Modern research and educational topics in microscopy 3 (1), 23 - 28, 2007. ISBN-13: 978-84-611-9419-3

*Publikace abstrakt ve sbornících z konferencí - přednesené prezentace*

XXXVI. Dny lékařské biofyziky, Lázně Bělohrad, 2013, Direct visualization of DNA damage at single - molecule level by atomic force microscopy after photodynamic therapy.

XXXV. Dny lékařské biofyziky, Rožnov pod Radhoštěm, 2012, Analysis of functionalized mica substrates for AFM imaging of DNA

XXXVI. Dny lékařské biofyziky, Lázně Bělohrad, 2013, Atomic Force Microscopy Characterization of Magnetic Microspheres for Selective DNA Isolation.

XXXI. Dny lékařské biofyziky, Malá Morávka, 2008, Imaging of Magnetotactic Bacteria by Atomic Force Microscopy