

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2024

Monika Kutějová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

STUDIUM VLIVU NANOČÁSTIC OXIDU ZINEČNATÉHO NA MIGRACI BUNĚK

STUDY OF THE EFFECT OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES ON CELL MIGRATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Monika Kutějová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Larisa Chmelíková, Ph.D.

BRNO 2024

Bakalářská práce

bakalářský studijní program **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Monika Kutějová

ID: 231062

Ročník: 3

Akademický rok: 2023/24

NÁZEV TÉMATU:

Studium vlivu nanočástic oxidu zinečnatého na migraci buněk

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti potenciálu použití nanočástic oxidu zinečnatého v terapii rakoviny. 2) Nastudujte metody pro hodnocení cytotoxicity nanočástic a seznamte se s metodou „scratch assay“. 3) Nastudujte kultivace buněčných linií NIH-3T3 a SAOS-2 a prakticky ověřte v buněčné laboratoři. 4) Proveďte studium cytotoxicity nanočástic oxidu zinečnatého na buněčných liniích NIH-3T3 a SAOS-2. 5) Podle výsledků studie cytotoxicity zvolte vhodné koncentrace nanočástic a proveďte „scratch assay“ test na buněčných liniích NIH-3T3 a SAOS-2. 6) Získaná data vhodnými statistickými testy vyhodnoťte. 7) Dosažené výsledky vhodně prezentujte a proveďte diskusi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] ANJUM, Sumaira; HASHIM, Mariam; MALIK, Sara Asad; KHAN, Maha; LORENZO, José M. et al., 2021. Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. Online. Cancers. Roč. 13, č. 18. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers13184570>. [cit. 2023-09-05].

[2] HAGHIAZ, Reihaneh; RABBANI, Atiya; VAJHADIN, Fereshteh; KHAN, Taous; KOUSAR, Rozina et al., 2021. Anti-bacterial and wound healing-promoting effects of zinc ferrite nanoparticles. Online. Journal of Nanobiotechnology. Roč. 19, č. 1. ISSN 1477-3155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00776-w>. [cit. 2023-09-05].

Termín zadání: 5.2.2024

Termín odevzdání: 29.5.2024

Vedoucí práce: Larisa Chmelíková, Ph.D.

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

UPOZORNĚNÍ:

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

ABSTRAKT

Nanočástice oxidu zinečnatého (NPs ZnO) jsou díky svým vlastnostem široce využívány v různých odvětvích, s rozvojem nanomateriálů nacházejí své uplatnění také v medicíně. Bakalářská práce se zabývá studii cytotoxických účinků těchto nanočástic na kultivovaných buněčných liniích. Jednalo se o buněčnou linii lidského osteosarkomu Saos-2 a fibroblastickou buněčnou linii NIH-3T3. Během experimentů provedených *in vitro* byly buňky vystaveny různým koncentracím NPs ZnO. Cytotoxicita jednotlivých koncentrací byla hodnocena použitím MTT testu, ze kterého byly získány informace o životaschopnosti buněk. Na základě výsledků MTT testu byly vybrány vhodné koncentrace NPs ZnO, se kterými byl proveden *Scratch assay* test. Nejvyšší testovaná koncentrace odpovídala stanovené inhibiční koncentraci pro NIH-3T3. Cytotoxické účinky byly tedy hodnoceny studováním migrace buněk. Následná statistická analýza určila míru cytotoxických účinků NPs ZnO v závislosti na koncentraci a typu buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nanočástice, oxid zinečnatý, NPs ZnO, cytotoxicita, MTT, buňky, kultivace, NIH-3T3, Saos-2, *Scratch assay*, migrace buněk

ABSTRACT

Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) are widely used across various industries due to their properties, and with the development of nanomaterials, they are also finding applications in medicine. This bachelor's thesis investigates the cytotoxic effects of these nanoparticles on cultured cell lines. The study focused on the human osteosarcoma cell line Saos-2 and the fibroblast cell line NIH-3T3. During *in vitro* experiments, the cells were exposed to different concentrations of ZnO NPs. The cytotoxicity of each concentration was assessed using the MTT assay, which provided information on cell viability. Based on the MTT assay results, appropriate concentrations of ZnO NPs were selected for conducting a *Scratch assay*, with the highest concentration corresponding to the determined inhibitory concentration for NIH-3T3. The cytotoxic effects were thus evaluated by studying cell migration. Subsequent statistical analysis determined the extent of cytotoxic effects of ZnO NPs depending on the concentration and cell type.

KEYWORDS

Nanoparticles, zinc oxide, NPs ZnO, cytotoxicity, MTT, cells, cultivation, NIH-3T3, Saos-2, *Scratch assay*, cell migration

KUTĚJOVÁ, Monika. *Studium vlivu nanočástic oxidu zinečnatého na migraci buněk*.
Bakalářská práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a ko-
munikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2024. Vedoucí práce: Larisa
Chmelíková, Ph.D.

Prohlášení autora o původnosti díla

Jméno a příjmení autora: Monika Kutějová
VUT ID autora: 231062
Typ práce: Bakalářská práce
Akademický rok: 2023/24
Téma závěrečné práce: Studium vlivu nanočástic oxidu zinečnatého na migraci buněk

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

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

Brno

.....

podpis autorky*

*Autor podepisuje pouze v tištěné verzi.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce paní Larise Chmelíkové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci. Poděkování náleží také paní inženýrce Inně Zumberg za poskytnutí cenných rad. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

Úvod	11
1 Nanočástice oxidu zinečnatého	12
1.1 ZnO NPs v biomedicínských aplikacích	12
1.1.1 Mechanismus cytotoxicity	13
1.1.2 Konkrétní uplatnění v biomedicínských aplikacích	15
2 Metody pro hodnocení cytotoxicity	19
2.1 Cytotoxické metody <i>in vivo</i>	19
2.2 Cytotoxické metody <i>in vitro</i>	19
2.2.1 Metody využívající barviva	20
2.2.2 Kolorimetrické metody	21
2.2.3 Fluorometrické metody	23
2.2.4 Luminometrické metody	24
3 Scratch assay	26
4 Buněčné linie	27
4.1 Buněčná linie NIH-3T3	27
4.2 Buněčná linie Saos-2	27
5 Praktická část	28
5.1 Použité materiály a přístroje	28
5.1.1 Použité přístroje a pomůcky	28
5.1.2 Použité chemikálie a média	29
5.2 Kultivace a pasážování buněk	29
5.2.1 Počítání buněk v Bürkerově komůrce	30
5.3 MTT test	31
5.3.1 Příprava na MTT test	31
5.3.2 Postup a výsledek MTT testu	33
5.4 <i>Scratch assay</i>	34
5.4.1 Příprava na <i>Scratch assay</i>	34
5.4.2 Postup <i>Scratch assay</i>	34
6 Výsledky a jejich zpracování	35
6.1 Kultivace buněk	35
6.2 MTT test	36
6.3 <i>Scratch assay</i>	39

6.3.1	Statistické vyhodnocení <i>Scratch assay</i> testu	43
7	Diskuze	49
	Závěr	52
	Literatura	53
	Seznam symbolů a zkratk	58
A	Příloha: Tabulky s výslednými parametry <i>Scratch assay</i>	60
A.1	Buněčná linie NIH-3T3	60
A.2	Buněčná linie Saos-2	63

Seznam obrázků

1.1	Schématické znázornění cytotoxických účinnů NPs ZnO	15
2.1	Chemická struktura trypanové modři	21
2.2	Redukce MTT na formazan	22
2.3	Chemická reakce při LDH tesu	23
2.4	Mechanismus ATP testu	25
3.1	Snímky buněk po <i>scratch wound healing assay</i>	26
5.1	Bürkerova komůrka	31
5.2	Schéma 96-jamkové destičky pro MTT test	33
6.1	Mikroskopický snímek buněčné linie NIH-3T3	35
6.2	Mikroskopický snímek buněčné linie Saos-2	35
6.3	96-jamková destička po MTT testu	36
6.4	Výsledky MTT testu z 1.měření	37
6.5	Výsledky MTT testu z 2.měření	37
6.6	Výsledky MTT testu z 3.měření	37
6.7	Průměrné hodnoty viability buněk z MTT testů	38
6.8	Graf znázorňující vliv SHMP na životaschopnost buněk	39
6.9	Snímky z jednotlivých vzorků ze <i>Scratch assay</i> s buňkami NIH-3T3	41
6.10	Snímky z jednotlivých vzorků ze <i>Scratch assay</i> s buňkami Saos-2	42
6.11	Grafické výsledky aplikovaného statistického testu (NIH-3T3)	45
6.12	Grafické výsledky aplikovaného statistického testu (Saos-2) na snímky z 0 hodin	47
6.13	Grafické výsledky aplikovaného statistického testu (Saos-2) na snímky z 24 hodin	48

Seznam tabulek

6.1	Přehled hodnot IC_{50} z jednotlivých MTT testů	38
6.2	Výsledné p-hodnoty ze Shapirova-Wilkova testu - buněčná linie NIH-3T3	43
6.3	Výsledné p-hodnoty z Levenova testu, ANOVY popřípadě neparametrických testů - buněčná linie NIH-3T3	44
6.4	Mnohonásobné porovnání ploch rýh v miskách (NIH-3T3, snímky z 24 hodin)	44
6.5	Výsledné p-hodnoty ze Shapirova-Wilkova testu - buněčná linie Saos-2	46
6.6	Výsledné p-hodnoty z neparametrických testů - buněčná linie Saos-2 .	46
6.7	Mnohonásobné porovnání ploch rýh v miskách (Saos-2, snímky z 0 hodin)	46
6.8	Mnohonásobné porovnání ploch rýh v miskách (Saos-2, snímky z 24 hodin)	47
A.1	Analyzované parametry ze <i>Scratch assay</i> z prvního emperimentu, NIH-3T3	60
A.2	Analyzované parametry ze <i>Scratch assay</i> ze druhého emperimentu, NIH-3T3	61
A.3	Analyzované parametry ze <i>Scratch assay</i> ze třetího emperimentu, NIH-3T3	62
A.4	Analyzované parametry ze <i>Scratch assay</i> z prvního emperimentu, Saos-2	63
A.5	Analyzované parametry ze <i>Scratch assay</i> ze druhého emperimentu, Saos-2	64
A.6	Analyzované parametry ze <i>Scratch assay</i> ze třetího emperimentu, Saos-2	65

Úvod

V posledních letech došlo k nárůstu zájmu o nanotechnologie napříč mnoha vědními obory nevyjímaje biomedicínské aplikace. Jednou z potencionálních nanočástic z hlediska uplatnění v oblasti biomedicíny je nanočástice oxidu zinečnatého (NPs ZnO). NPs ZnO svými rozmanitými fyzikálními a chemickými vlastnostmi našly uplatnění hned v několika medicínských oblastech, např. při léčbě ran, zánětů, v zobrazovacích metodách, ale zejména v antibakteriálních a protinádorových aplikacích.

Rakovina se řadí mezi jedno z nejzávažnějších onemocnění na světě. Projevuje se mutací buněk v lidském organismu, jejich nekontrolovatelným růstem a šířením do okolních tkání. Díky pokrokům ve výzkumu existují různé možnosti léčby, ale často je celý proces zdlouhavý a nese s sebou nežádoucí vedlejší účinky. Avšak NPs ZnO prokázaly specifickou cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám prostřednictvím řetězce reakcí, které vedou až k poškození jejich DNA a k buněčné smrti. Naopak v porovnání s běžnými buňkami vykazují NPs ZnO pouze nízkou míru toxicity.

Ke zjištění míry cytotoxicity látek se využívá široká škála metod uskutečněná v *in vivo* nebo *in vitro* prostředí. Jedním z často využívaných cytotoxických *in vitro* testů je MTT test. Cílem bakalářské práce bude provést hodnocení cytotoxických účinků ZnO NPs na dvou buněčných liniích. Bude využit MTT test fungující na principu přeměny tetrazoliové soli MTT na nerozpustný fialový formazan, což je reakce, ke které dochází pouze v živých buňkách. Formazan se následně rozpustí detergentem, tím vzniká barevný produkt a jeho absorbance se měří spektrofotometrem. Výsledná absorbance je přímo úměrná počtu živých buněk. S využitím získaných informací o cytotoxických účincích konkrétních koncentrací Nps ZnO bude následně proveden *Scratch assay*. Metoda zkoumá migraci buněk směrem do vytvořené rýhy, pohyb buněk je sledován v časových intervalech. Slouží k analýze procesů jako je hojení ran nebo chování karcinogenních buněk v *in vitro* prostředí, což může vypovídat o míře jejich invazivity. Kombinace testů umožní komplexnější posouzení cytotoxických účinků a vlivů NPs ZnO na migraci buněk.

Teoretická část pojednává o NPs ZnO se zaměřením na biomedicínské aplikace. Další kapitola představuje jednotlivé metody sloužící k určení cytotoxicity, které zahrnují *in vivo* a *in vitro* testy. Poté následuje kapitola zabývající se *Scratch asssay*. Teoretickou část uzavírá kapitola popisující buněčné linie, které budou použity v praktické části. V navazujících kapitolách budou popsány postupy a výsledky jednotlivých testů, které budou diskutovány.

1 Nanočástice oxidu zinečnatého

Nanočástice (NPs, z angl. nanoparticles) jsou částice ve velikosti 1–100 nm, jejichž alespoň jedna dimenze musí být menší než 1 μm . Vyrábí se z široké škály materiálů, podle kterých se dělí na nanočástice oxidů kovů a nekovů, uhlíkové, kovové a polovodičové nanočástice. Na základě struktury a tvaru se rozlišují na kvantové tečky, nanotrubičky, nanodráty, nanotyčinky a nanopásky. Jedním z využívaných kovových nanomateriálů je zinek (Zn) a jeho oxid (ZnO). [1]

Zinek je esenciálním stopovým prvkem ve všech tělesných tkáních, druhým nejhojnějším po železe. Celkové množství zinku v těle se odhaduje na 30 mM (2 g) a denní příjem je přibližně 15 mg. Je klíčový pro funkci imunitního systému, ovlivňuje humánní i buněčnou imunitu a pomáhá udržovat integritu buněk a orgánů stabilizací molekulárních složek membrán a buněčných komponent. Tvoří část enzymových systémů, podílí se na metabolismu, hraje významnou roli v syntéze proteinů a nukleových kyselin, hematopoéze a neurogenезi. Celkově je důležitý pro udržení homeostázy. Jeho nedostatek může vést až ke vzniku rakoviny nebo k její progresi, případně k narušení důležitých buněčných procesů. Snížené hladiny Zn způsobují oxidační poškození DNA a narušují funkci nádorového supresoru p53, který ovlivňuje aktivitu kaspáz. V důsledku toho u poškozené buňky nedochází k apoptóze a buňka se může dále dělit, což směřuje ke vzniku nádoru. Naopak nadbytek zinku může vést k poruše transportního systému Zn v plazmatické membráně, takže se zvýší jeho intracelulární koncentrace, která vede k apoptóze. [2, 3]

Nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO NPs) se vyskytují v různých velikostech, tvarech a morfologiích, tím pádem vykazují různorodé fyzikální a chemické vlastnosti a mají široké využití. Jejich odolnost se uplatní v gumárenském průmyslu, schopnost absorbovat UV záření v kosmetickém průmyslu, dále se využívají v textilním a potravinářském průmyslu, pro výrobu betonu, fotokatalyzátorů, elektroniky a dalších. Díky své biokompatibilitě, nízké nákladnosti syntézy a nízké toxicitě se v posledních dvou desetiletích staly také jednou z nejpobulárnějších nanočástic oxidů kovů používaných v biologických aplikacích. [2]

1.1 ZnO NPs v biomedicínských aplikacích

Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv označil ZnO jako GRAS (z angl. generally recognized as safe), tudíž jsou považovány za bezpečné a můžou se využívat ve zdravotnických a farmaceutických produktech. Avšak u nanočástic ZnO ještě nedošlo k úplnému porozumění jejich chování v *in vivo* prostředí. [4]

Podle *in vitro* studií mohou NPs ZnO v závislosti na svých vlastnostech vykazovat cytotoxické účinky a vyšší selektivitu vůči nádorovým buňkám. Díky tomu mají

potenciál v protinádorové léčbě. K jejich výhodám se řadí široké spektrum metod syntézy, které jsou nenáročné a během nichž lze upravit výslednou velikost, která je jednou z vlastností ovlivňující míru jejich cytotoxicity. Je klíčová pro efekt zvýšené permeability a retence (EPR efekt), díky němuž dochází k jejich hromadění v nádorech. Menší rozměry NPs umožňují snadný průchod přes plazmatickou membránu přímo do buňky nebo se dokáží déle udržet v krevním oběhu, než je organismus vyloučí. K další přednosti přísluší velký poměr povrchu k objemu umožňující zvýšený povrchový kontakt, reaktivitu a rozpustnost. Také lze na povrch NPs navázat ligandy nebo molekuly hrající významnou roli v cíleném transportu léčiv. [2, 3]

Dalším důležitým aspektem je povrchový náboj určující reakci s vnějším prostředím. Vysoké povrchové náboje způsobují vyšší aktivitu makrofágů, které odstraňují NPs z cév krevního oběhu. Povrchový náboj by měl být udržován tak, aby minimalizoval interakci s ostatními složkami (s okolním prostředím, mezi nanočásticemi), ale projevoval selektivitu vůči buňkám nádoru. Pro vznik povrchového náboje jsou důležité amfoterní vlastnosti ZnO NPs. Ve vodném prostředí při vysokém pH ($\text{pH} > 9$) jsou molekuly vody na povrchu nanočástic deprotonovány, čímž vzniká negativně nabitý povrch s navázanou hydroxidovou skupinou ($\text{Zn} - (\text{OH})^-$). Při nižším pH (neutrální, kyselé podmínky) se z ZnO stává $\text{Zn}(\text{OH}_2)^{x+}$ v důsledku přenosu protonů z prostředí směrem k jeho povrchu. Na povrchu se prostřednictvím skupin $\text{Zn}(\text{OH}_2)^{x+}$ nebo míst s Zn^{2+} , které vznikají po uvolnění molekul H_2O , vytváří kladný náboj. ZnO NPs jsou tedy za fyziologických podmínek ($\text{pH} \cong 7$) kladně nabity. Naopak rakovinné buňky obvykle mají negativně nabitý povrch kvůli jejich specifickému metabolismu nazývanému Warburgův efekt, tím pádem mezi nimi a NPs dochází k elektrostatickému přitahování. K vlastnostem NPs ZnO ovlivňujícím cytotoxické účinky patří také míra dávky, morfologie. Tyto účinky jsou také ovlivněny vnějšími faktory. [2, 3, 4, 5]

ZnO NPs se používají zejména v protinádorových a antibakteriálních odvětvích, jako nosiče pro cílený transport léčiv, při léčbě diabetu, ran, zánětů a ve tkáňovém inženýrství. Navíc prokazují luminiscenční vlastnosti, čímž se stávají jedním z hlavních kandidátů pro zobrazovací metody. [2, 3]

1.1.1 Mechanismus cytotoxicity

NPs ZnO nacházející se extracelulárně vykazují relativně vysokou biokompatibilitu. Cytotoxicita je totiž přímo úměrná množství volných iontů zinku nacházejícího se uvnitř buněk, které spouští řetězec reakcí vedoucí k poškození buňky. Nps ZnO do buňky vstupují buď endocytózou nebo v případě odpovídající velikosti pasivním příjmem přímo přes buněčnou membránu. Během endocytózy (pinocytózy, fagocytózy) jsou částice pohlceny a uvnitř se hromadí v endozomech a následně lysozomech. V

závislosti na vnitřním kyselém pH lysozomů zahajují NPs cytotoxické účinky. V případě druhého způsobu vniknutí do buňky NPs reagují v cytoplazmě s proteiny a organelami. [3]

Nerovnováha aktivity proteinů

V normálních podmínkách se uvnitř buněk vyskytuje relativně vysoká koncentrace zinku vázaného na proteiny, přičemž hladina volných iontů Zn^{2+} zůstává velmi nízká a je přísně regulována homeostatickými mechanismy. Při přítomnosti NPs ZnO se ionty Zn^{2+} intracelulárně uvolňují, stoupá jejich koncentrace, dochází k nastolení nerovnováhy v aktivitě proteinů a současně nárůstá hladina reaktivních forem kyslíku (ROS). [3, 6]

Uvolňování Zn^{2+} probíhá snadněji v kyselém prostředí charakteristickém pro nádor. Odolnost NPs ZnO vůči rozpouštění lze ovlivnit překrytím povlaky, např. lipidy, křemíkem nebo polymery. Tato odolnost byla prokázána v adherentních buněčných liniích přidáním proteinů a povlaků na jejich povrch a tím došlo ke snížení jejich škodlivosti. [4]

Produkce ROS a oxidační stres

ROS jsou produkovány uvnitř buněk během buněčných procesů zahrnujících mitochondriální respiraci, zánětlivou reakci, mikrozomální aktivitu, aktivitu peroxisomů a dalších. Působením ZnO NPs vznikají ROS dvěma způsoby, buď v důsledku prozánětlivé reakce buňky vůči nanočásticím nebo kvůli charakteristické povrchové vlastnosti ZnO NPs, která je činí redoxním systémem produkujícím ROS.

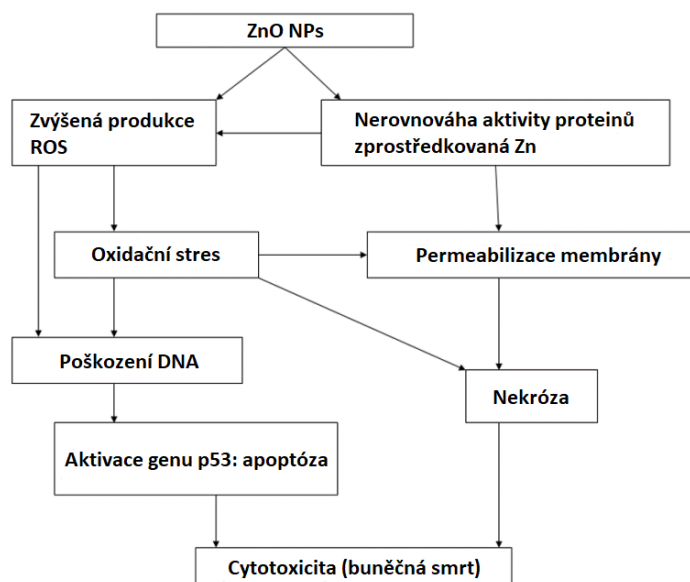
NPs ZnO je polovodič s širokým zakázaným pásem (3,37 eV) a velkou vazebnou energií. Narozdíl od kovů u polovodičů elektrony lokalizované ve valenčním pásu mohou přecházet do pásu vodivostního pouze pokud překonají energetickou bariéru. S ohledem na velikost NPs ZnO však elektrony nepotřebují k přeskočení z valenčního pásu do pásu vodivostního energii. Elektrony po sobě zanechávají volné kladně nabitě díry. Normálně se elektrony a díry rychle rekombinují, ale v nanočásticích se přesunou na povrch, kde reagují s adsorbovanými částicemi. Díry působí jako silný oxidant, rozkládají molekuly vody na vodíkové (H^+) a hydroxylové ionty (OH^-). Mezitím elektrony působí jako silný reduktor, reagují s adsorbovanými a rozpustitelnými molekulami kyslíku a generují superoxidové radikálové anionty (O_2^-). O_2^- poté reagují s H^+ a tím se vytváří radikály hydroperoxyly (HO_2^-), které dále mohou reagovat za vzniku peroxidu vodíku H_2O_2 . Všechny tyto radikály jsou ROS a působí jako silné oxidační činidlo. Při akumulaci velkého množství ROS dochází k narušení oxidačně-redukční homeostázy buňky, což vede k oxidačnímu stresu. [3]

Poškození DNA a apoptóza

Oxidační stres spouští v buňce procesy, které mají v škodlivý účinek na lipidy, proteiny a nukleové kyseliny a mohou vést až k zániku buňky (viz Obr 1.1), dochází k:

- peroxidaci lipidů a denaturaci proteinů → poškození buněčné membrány → nekróza
- poškození DNA: denaturací proteinů/přímou reakcí s ROS → změny ve složení DNA, mutace → apoptóza
- poškození tumor supresorového proteinu p53 (v případě poškození buňky zajišťuje její reparaci, pokud je reparace neúspěšná, potom navodí apoptózu) → apoptóza

Apoptóza, programovaná buněčná smrt, je považována za hlavní mechanismus buněčné smrti cytotoxické odpovědi na nanočástice ZnO. [3]



Obr. 1.1: Schématické znázornění cytotoxických účinků NPs ZnO vedoucích k buněčné smrti. (Přeloženo z: [3])

1.1.2 Konkrétní uplatnění v biomedicínských aplikacích

Antibakteriální účinek

K léčbě infekčních onemocnění se často využívají antibiotika, avšak jejich nadměrné užívání může vést k postupnému vývoji rezistence u mikroorganismů, což představuje závažnou hrozbu pro budoucí léčbu těchto onemocnění. Nanočástice ZnO vykazují antibakteriální účinky vůči širokému spektru mikroorganismů, působí jak na gram-negativní, tak i na gram-positivní bakterie. Bakteriální buněčné stěny jsou

obvykle negativně nabitě kvůli karboxylovým skupinám, což způsobuje, že pozitivně nabitě ZnO-NPs v suspenzi jsou k nim přitahovány a elektrostatickými silami přichyceny na jejich povrch. Existují dva hlavní faktory způsobující antibakteriální aktivitu NPs ZnO, jedná se o tvorbu ROS a uvolňování iontů Zn^{2+} při akumulaci NPs na povrchu nebo v cytoplazmě bakterie (viz kapitola 1.1.1). [2, 5, 7]

Bakterie se skládají z buněčné membrány, buněčné stěny a cytoplazmy. Buněčná stěna se nachází vně buněčné membrány a je složena převážně z homogenní vrstvy peptidoglykanu, udržuje osmotický tlak cytoplazmy a charakteristický tvar buňky. Gram-pozitivní bakterie mají tenkou buněčnou membránu, silnou a tlustou buněčnou stěnu složenou z několika vrstev peptidoglykanu o tloušťce 20-30 nm. Naopak buněčná stěna gram-negativních bakterií se skládá ze dvou buněčných membrán, vnější membrány a plazmatické membrány s tenkou vrstvou peptidoglykanu o tloušťce 7-8 nm. [5]

Protizánětlivé aplikace a hojení ran

Uplatnění nanočástic ZnO v léčbě ran a aplikacích s protizánětlivým efektem úzce souvisí s jejich antibakteriálním účinkem. Zánět je součástí komplexní biologické odpovědi tkání na škodlivé podněty jako jsou patogeny, poškozené buňky nebo podráždění. Ve studiích jsou ZnO NPs využívány k léčbě zánětlivých onemocnění, např. atopické dermatitidy. Dokáží se dostat do hlubších vrstev poškozené nebo alergické kůže a ulevují od svědění. V experimentu na modelu atopické dermatitidy, který byl provedený na myších, se jejich protizánětlivé vlastnosti potvrdily snížením hladin protizánětlivých cytokinů. [2]

ZnO NPs byly rovněž testovány jako podpora pro proces hojení ran, který se uplatňuje při léčbě popálenin. U popálenin dochází k poškození povrchové bariéry kůže, tím pádem se organismus stává náchylný na infekce. Některé patogeny jsou velmi odolné, a proto je nezbytné nasadit antimikrobiální látky, které budou účinné i proti bakteriím odolným vůči antibiotikům a zároveň nebudou toxické pro normální buňky. [7]

Existuje mnoho studií zabývajících se účinkem různě upravených nanočástic ZnO na bakterie, záněty a rány. Např. autoři Haghniaz Reihaneh a kolektiv [7] zkoumali nanočástice $ZnFe_2O_4$ kvůli jeho potenciálu v antimikrobiálních účincích a podpoře hojení ran. Ve studii byly použity NPs $ZnFe_2O_4$ o velikosti $47,9 \pm 2,5$ nm, jejich cytotoxicita byla testována na lidských dermálních fibroblastech, přičemž vykazovaly dávkově závislé účinky a biokompatibilita se potvrdila při koncentracích do 125 $\mu\text{g/ml}$. Antimikrobiální aktivita NPs byla potvrzena využitím více testů s gram-pozitivními i gram-negativními bakteriemi, byla testována permeabilita buněčné membrány, únik bílkovin z bakterie a produkce ROS. Byla prokázána vyšší

účinnost na gram-pozitivní bakterie. Studie se zaměřila také na pozitivní vliv NPs ZnFe_2O_4 na hojení ran, který byl dokázán využitím *Scratch assay*. Výsledky ukázaly rychlejší migraci buněk a uzavření rýhy ve vzorcích ošetřených NPs ZnFe_2O_4 . Test byl proveden na buněčné linii NIH-3T3 a byla použita koncentrace NPs nevykazující cytotoxické účinky. [7]

Léčba rakoviny

Navzdory pokroku v lékařských technikách a technologii zůstává rakovina nadále jednou z hlavních příčin úmrtí. Jedná se o onemocnění charakterizované nekontrolovaným růstem buněk. Rakovinné buňky dokáží vybudovat vlastní síť cév (angiogeneze) pro zásobování kyslíkem a živinami, odtrhnout se od původního místa výskytu a šířit se do jiných orgánů (tvorba metastáz). Narozdíl od zdravých buněk se rakovinné buňky dělí neustále a to bez ohledu na signály podněcující replikaci. Kromě toho neodpovídají ani na podněty, které by normálně vyvolaly apoptózu. Rakovinu způsobují vnější (expozice radiací, podvýživa, užívání tabákových výrobků a další) nebo vnitřní (mutace genů, genetické poruchy, hormonální nerovnováha) faktory. [8]

Tradičně se pro léčbu rakoviny používá chirurgie, chemoterapie, radioterapie, imunoterapie, fototerapie a hormonální terapie. Ne všechny typy rakoviny lze vyléčit chirurgicky. Nejčastěji se využívá chemoterapie, ale společně s ostatními způsoby léčby má negativní vedlejší účinky, které způsobují poškození zdravých buněk. Mezi další omezení patří neschopnost proniknout přímo do nádoru, nespecifické zaměření a vznik rezistence po expozici určitých dávek. Nicméně v některých případech, například v případě včasné diagnózy, může dojít k uzdravení. V posledních letech vykazují potenciál techniky využívající nanotechnologie, které se snaží zachovat zdravé buňky nedotčené a cílit pouze na buňky rakoviny. [8]

Nádor rychle roste a při angiogenezi nedochází ke správnému vyvinutí krevních a lymfatických cév. Spojení mezi buňkami není těsné a krevní cévy mají póry o velikosti od 100 nm až 1 μm , takže se nanočástice lehce dostanou přes cévy k buňkám nádoru, tzv. extravazace. U zdravých buněk dochází k odstranění těchto extravazátů (tekutin nebo částic) pomocí intersticiální tekutiny (lymfy), která obklopuje buňky. Protože nádorové buňky nemají ani dobře vyvinutý lymfatický systém, odvod extravazátů jim trvá delší dobu a nanočástice tak mají víc času na difundování se dovnitř nádorové buňky. Celý mechanismus se označuje jako EPR efekt. [3]

Cílený transport v léčbě rakoviny

ZnO nanočástice jsou považovány za vhodného kandidáta pro cílený transport léčiv (DDS, angl. drug delivery system) díky své snadné syntéze z levných prekurzorů,

biokompatibilní povaze vůči zdravým buňkám a schopnosti vniknout přímo do buněk. Mezi další výhody se řadí schopnost inhibovat předčasné uvolňování léčiva v krevním oběhu, zlepšovat farmakokinetiku hydrofóbních léčiv, zajišťovat aktivní cílený transport léčiva a minimalizovat toxické účinky na zdravou tkáň. Vyskytují se v různých typech jako jsou nanosféry, nanopláty, nanotyčinky, nanopásy a kvantové tečky. Cílený transport se dělí na pasivní (původní vlastnosti NP, EPR efekt) a aktivní (periferně navázané specializované skupiny, které vykazují afinitu k nádorovým buňkám). [9, 10]

Aktivní i pasivní cílený transport zajišťuje hromadění NPs ZnO na nádorových buňkách, popřípadě uvnitř nádorových buněk. Akumulace nastává díky specifickým molekulárním interakcím (např. receptor - ligand, hydrofóbní a coulombovské interakce). Po přijetí specifického stimulu dochází k uvolnění léčiva z nanočástice a zničení cílové buňky. Stimuly se klasifikují na vnější (teplota, světlo, ultrazvuk) a vnitřní (pH, enzymová aktivita, oxidačně redukční reakce). Souběžně dochází k uvolňování Zn^{2+} iontů z nanočástic, což také vede k apoptóze. S využitím NPs ZnO se používají převážně 4 typy DDS: [8, 9]

- mezoporézní křemíkové nanočástice s NPs ZnO: NPs ZnO jsou použity jako zátky pórů, ve kterých je umístěné léčivo, ZnO NPs citlivé na kyselé prostředí se uvnitř buňky rozpouští a tím dochází k uvolnění léčiva
- porézní NPs ZnO: léčivo uvnitř pórů ZnO NPs
- ZnO NPs jako jádro s polymerním obalem: léčivo uloženo v hydrofobním obalu
- ZnO NPS/léčivo-komplex: vzniká vytvořením stabilních vazeb mezi Zn^{2+} ionty ze ZnO NPs a kyslíkovými funkčními skupinami léčiva

Kromě využití ZnO nanočástic jako samostatného terapeutického činidla existují také v kombinaci se zavedenými standardními terapiemi, chemoterapií a radioterapií. Studie prokazují slibné výsledky týkající se kombinací ZnO nanočástic s doxorubicinem, daunorubicinem, paclitaxelem nebo cisplatinou. Vzhledem k fotokatalytické aktivitě představují potenciál také jako léčivo v kombinaci s ozářením. [4]

2 Metody pro hodnocení cytotoxicity

Cytotoxicita je obvykle spojována s negativním vlivem na buňky. Indikátory zdravé buňky jsou její životaschopnost a míra proliferace. Buněčný metabolismus a stav ovlivňují chemičtí a fyzikální činitelé, jejichž toxicita se projevuje poškozením buněčné membrány, tvorby proteinů, nevratnými vazbami na receptory a enzymatickými reakcemi. K určení poškozené buňky nebo její smrti slouží řada specifických metod dělicích se podle prostředí na *in vitro* a *in vivo*. [11, 12]

Míra toxicity nanočástic oxidu zinečnatého převážně závisí na jejich velikosti, tvaru, povrchovém náboji a rychlosti rozpouštění. Do buňky vstupují několika způsoby: částice malých rozměrů snadno proniknou přes buněčnou membránu, dále pomocí iontových kanálů a transportérů nebo prostřednictvím endocytózy. [9]

2.1 Cytotoxické metody *in vivo*

Testy *in vivo* se obvykle provádí na živých zvířatech, převážně na myších a krysách. Zaměřují se na histopatologickou analýzu, biologickou distribuci, hematologii, sérologii a clearanci. Pomocí biologické distribuce se zkoumá pohyb NPs do tkání nebo orgánů. NPs jsou detekovány v mrtvých i živých zvířatech prostřednictvím radioaktivních značek. Clearance nanočástic se provádí analýzou vylučování a metabolismu nanočástic po expozici v různých časových intervalech. Další metoda hodnocení toxicity *in vivo* se zaměřuje na pozorování změn v chemickém složení séra a typu buněk po expozici NPs. Pokrok v hodnocení toxicity se uskutečňuje použitím mikroelektrochemie a mikrofluidiky. [13]

2.2 Cytotoxické metody *in vitro*

Cytotoxické testy *in vitro* jsou založené na hodnocení různých buněčných funkcí. Posuzuje se enzymatická aktivita, adheze, produkce adenosintrifosfátu (ATP), produkce koenzymů, ale hlavně propusnost buněčné membrány. Neživotaschopné buňky totiž ztrácí její integritu. Detekce mrtvých buněk se provádí měřením pohybu molekul, tzv. speciálních markerů, přes membrány, jenž jsou netěsné a nemohou být opraveny. Markery se podle směru pohybu rozdělují na dvě skupiny. Do první skupiny patří molekuly, které se normálně vyskytují v cytoplazmě, ale kvůli porušení membrány se dostávají do okolí (kultivačního média). Druhou třídou molekul sloužících jako indikátory mrtvých buněk jsou ty, které naopak prostupují přes porušenou membránu dovnitř buněk a tam se hromadí. Markery se tedy vyskytují přirozeně v buňce nebo jsou uměle zavedené (např. fluorescenční marker). [11, 14]

Pro získání přesných a spolehlivých výsledků musí být vybrán správný test zohledňující i parametry jako jsou možnosti laboratoře, sloučeniny potřebné k testu, senzitivita a specificita. Mezi výhody *in vitro* cytotoxických testů patří rychlost, menší náklady a realizace přímo na lidských buňkách, čímž se liší od testů *in vivo*, které jsou aplikovány na zvířatech. Mají rovněž mnoho nedostatků, jelikož dosud nedosáhly technické dokonalosti. Existuje více typů jejich rozdělení. Podle účinku na buňky lze metody členit na testy zkoumající proliferaci, apoptózu, nekrózu, oxidační stres a poškození DNA. Také se klasifikují podle způsobu měření, kterým se na konci určí cytotoxicita, podle tohoto parametru metody dělíme na: [11, 13]

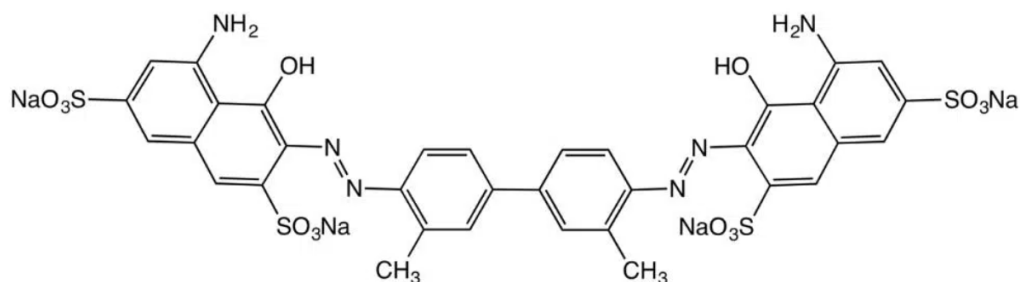
- **testy s barvivem:** trypanová modř, eosin, kongo červeň, erythrosin B
- **kolorimetrické testy:** MTT, MST, XTT a LDH test
- **fluorometrické testy:** alamar blue, FDA assay, GF-AFC assay
- **luminometrické testy:** testy využívající ATP

2.2.1 Metody využívající barviva

Testy s barvivem jsou často používány díky své jednoduchosti. Zaměřují se na integritu plazmatické membrány. Zdravé buňky mají schopnost vylučovat pomocí plazmatické membrány barvivo, zatímco mrtvé tuto schopnost ztrácejí, takže dochází k jejich obarvení. Metoda není vhodná pro velký počet vzorků z důvodu časové náročnosti. Je třeba zohlednit i jiné faktory, které mohou ovlivnit výsledek testu: 1. buňky poškozené cytotoxickými látkami někdy potřebují více dní než ztratí integritu membrán, 2. zdravé buňky se mohou dělit, tudíž ovlivňují výsledný počet nepoškozených buněk a 3. některé těžce poškozené buňky mohou podstoupit brzký rozklad, tím pádem nejsou na konci testu obarveny. Jestliže se určuje procento životaschopnosti buněk, tak faktory 2. a 3. případu výsledky podhodnocují. [11]

Test s trypanovou modří je jedna z nejvyužívanějších metod pro stanovení počtu buněk a jejich procentuální životaschopnosti. Zbarvené (mrtvé, poškozené) či nezbarvené (živé) buňky se počítají pod mikroskopem v Bürkerově komůrce. Test se obvykle provádí na jednom vzorku nebo malém počtu vzorků. Mezi hlavní nevýhody patří chyba spojená s měřením jediného vzorku, riziko obarevných živých buněk při dlouhé době interakci s barvivem, subjektivní posouzení týkající se identifikace mrtvé buňky nebo zbarvené nečistoty a časová náročnost v případě měření většího počtu vzorků. Chemická struktura trypanové modří znázorněna na Obr. 2.1. [14]

Na stejném principu obarvení trypanovou modří fungují také barviva eosin nebo kongo červeň. Eosin je červené fluorescenční barvivo sloužící také k obarvení cytoplazmy, kolagenu a svalových vláken, což usnadňuje jejich vizualizaci pod mikroskopem. K obarvení cytoplazmy pro mikroskopické účely se používá rovněž kongo červeň. [15]



Obr. 2.1: Chemická struktura trypanové modři. (Převzato z: [16])

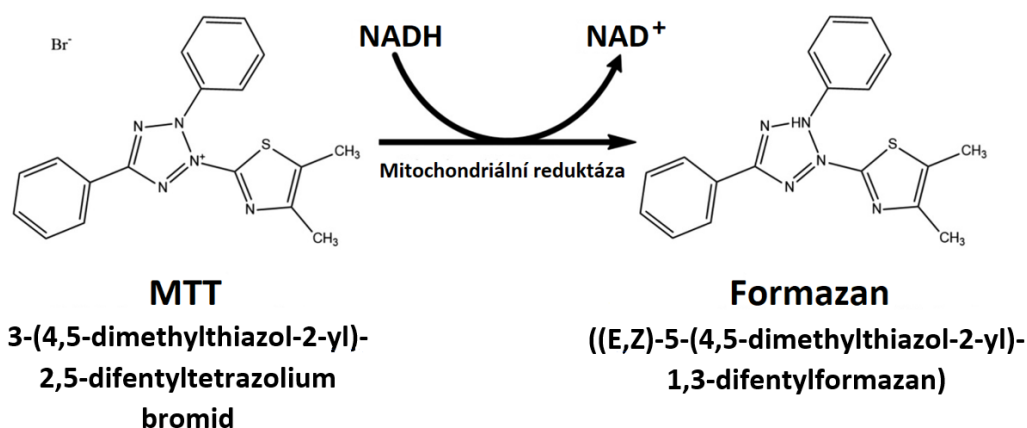
Test příjmu neutrální červeně (NRU) využívá kationtové barvivo, které vstupuje přes plazmatickou membránu a akumuluje se v lysozomech. Úměrně s narůstajícím počtem poškozených nebo mrtvých buněk se snižuje množství navázaného barviva. Čím je výsledná intenzita zbarvení vzorku vyšší, tím je přítomno větší množství životaschopných buněk. Test je vyhodnocen spektrofotometricky, proto jej někteří autoři řadí do kolorimetrických testů. [17]

2.2.2 Kolorimetrické metody

Princip kolorimetrických metod spočívá v měření biochemického markeru, kterým se hodnotí metabolická aktivita buňky. Používají se činidla, která se barevně projeví v závislosti na viabilitě buňky. Kolorimetrické měření se provádí pomocí spektrofotometru. [11]

MTT test je založený na redukci žluté tetrazoliové soli MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difentyltetrazolium bromidu na fialový krystalický produkt formazan (Obr. 2.2). Přeměna probíhá pomocí mitochondriálních enzymů živých buněk. Formazan neprochází přes buněčné membrány, a proto se hromadí ve zdravých buňkách. Poté se do vzorku přidá solubilizační roztok, který formazan rozpustí. Tím vzniká barevný roztok, který je vyhodnocen absorpční spektrofotometrií. Platí, že čím vyšší je absorbance (čím vyšší je koncentrace formazanu-tmavší barva), tím se ve vzorku nachází více životaschopných buněk. Díky své jednoduchosti, bezpečnosti a vysoké reprodukovatelnosti je jedním z nejpoužívanějších testů v měření viability buněk. Nevýhodou je nutnost rozpustit krystalky formazanu. [11, 18, 19]

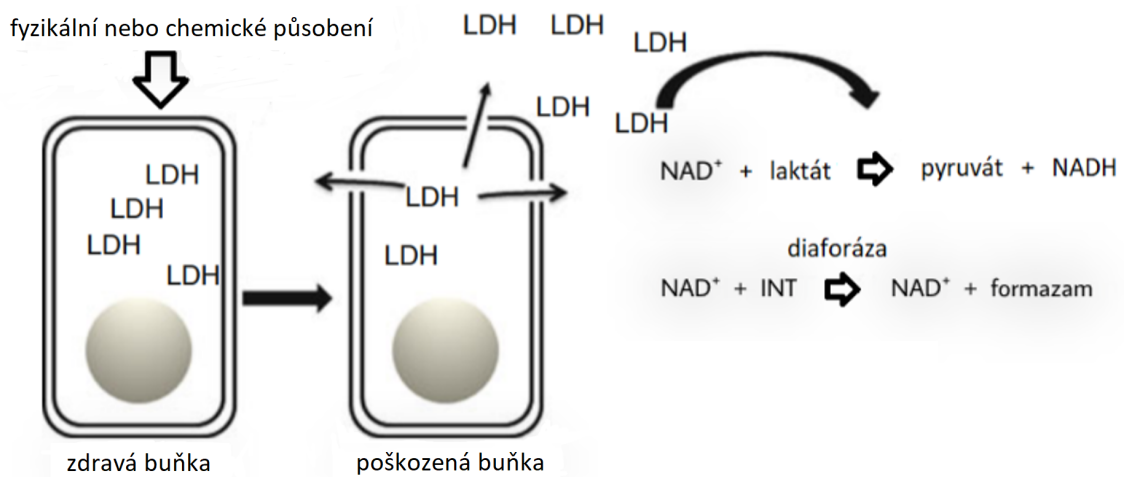
Ve studii autoři Stockert a kol. podrobně zkoumali mechanismy a lokalizaci průběhu MTT testu v buňkách HeLa. Tetrazoliová sůl MTT se usazovala hlavně v endoplazmatickém retikulu a mitochondriích. Přeměna na formazan probíhala v cytoplazmě a endoplazmatickém retikulu za účasti dehydrogenáz a NADH jako koenzymu. Redukovaný formazan se pak hromadil v lipidových kapkách, což bylo experimentálně potvrzeno zvýšenou akumulací v buňkách ošetřených emulzemi slunečnicového oleje, tedy v buňkách s vysokým obsahem lipidových kapek. [20]



Obr. 2.2: Redukce MTT na formazan. (Přeloženo z: [15])

Alternativou k MTT testu je MTS, XTT, WST-1 a WST-8 test, ve kterých dochází v důsledku mitochondriální aktivity živých buněk k přeměně tetrazoliové soli na ve vodě rozpustný barevný formazan, jehož množství je přímo úměrné počtu živých buněk a lze ho ihned spektrofotometricky stanovit. Jedná se o rychlé, jednoduché a senzitivní metody vykazující menší toxicitu vůči buňkám ve srovnání s MTT testem. Tetrazoliová sůl XTT je redukována na oranžový formazan, používá se k měření proliferace buněk a k určení cytotoxicity. Testy MTS, WST-1 a WST-8 mají kratší inkubační dobu a nejcitlivějším testem je WTS-8, který je citlivý zejména při neutrálním pH. [11, 19]

Dále se ke kolorimetrickým testům řadí LDH test, jehož principem je měření volné laktátdehydrogenázy (LDH), která se uvolňuje z poškozených buněk. LDH je enzym přítomný v cytoplazmě buňky. Pokud klesá životaschopnost buňky, zvyšuje se permeabilita plazmatické membrány a LDH se přemísťuje do extracelulárního kultivačního média. V médiu LDH katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát a současně dochází k redukcí NAD^+ na NADH . Poté, v přítomnosti diaforázy, NADH transformuje tetrazoliovou sůl INT na červený formazan. Množství červeného formazanu lze stanovit pomocí spektrofotometru. Sytost barvy odpovídá množství uvolněného enzymu LDH a tím také rozsahu buněčné smrti a poškození plazmatické membrány. [15, 21]



Obr. 2.3: Chemická reakce při LDH testu. Vzniklé množství formazanu je přímo úměrné rozsahu buněčné smrti. (Upraveno z: [21])

2.2.3 Fluorometrické metody

Fluorimetrické metody byly vyvinuty v 90. letech jako alternativa ke kolorimetrickým metodám a metodám využívající barviva. Zakládají se na štěpení nefluoreskující sloučeniny (např. fluorescein diacetát) pomocí enzymů, která po štěpení začne fluoreskovat. Metody jsou jednoduché a poměrně levné, ale studovaná látka může vykazovat vlastní fluorescenci a tím interferuje s výsledkem určující cytotoxicitu. [15]

Alamr Blue test, známý též jako resazurin redukční test, je přímý indikátor zdravých buněk prostřednictvím detekce úrovně oxidace během respirace. Netoxičnost vůči buňkám, prostředí i uživatelům představuje významnou výhodu tohoto testu. Modrý, netoxický, slabě fluoreskující redoxní indikátor resazurin prostupuje buněčnou membránou. Živé buňky ho redukovávají na růžový a silně fluoreskující resorufin, který extrahují do okolního média, čímž mění jeho barvu. Intenzita fluorescence odpovídá počtu metabolicky aktivních buněk. [11]

Mezi fluorimetrické metody se řadí test s fluorescein diacetátem (FDA) hodnotící životaschopnost buněk v závislosti na aktivitě esteráz. Pro zachování aktivity esteráz je nezbytné cytoplazmatické prostředí, které může zajistit pouze neporušená a zdravá buňka. Netoxická sloučenina FDA prochází do buňky přes buněčnou membránu, tam se mění za enzymatického účinku esteráz na fluorescein, který zeleně fluoreskuje a je detekován měřením fluorescence nebo absorbance vzorku. Výsledek je určen detekovaným rozdílem mezi fluoresceinem produkovaným živými buňkami a fluoresceinem produkovaným statickými nebo mrtvými buňkami. K výhodám patří rychlost metody, nicméně při testu mohou nastat dva potenciální problémy spojené s obsahem kultivačního média. Kvůli nesprávnému složení dochází k hydrolyze

FDA na fluorescein, což způsobuje, že mrtvé buňky jsou považovány za živé, nebo naopak složky média tlumí fluorescenci, což vede k tomu, že živé buňky jsou považovány za mrtvé. Aby se tyto problémy minimalizovaly, doporučuje se zředit médium a vyvarovat se použití složek, které podporují hydrolýzu FDA. [11, 22]

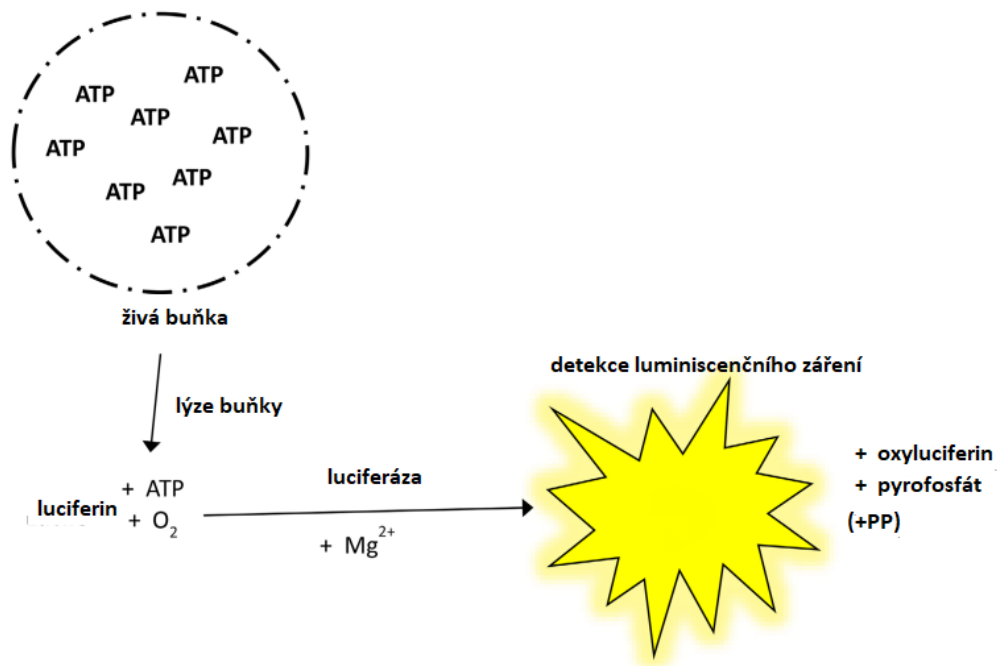
K dalším indikátorům viability buněk patří měření aktivity proteáz, protože pokud dojde k zániku buňky, aktivita proteáz rychle zmizí. Nedávno byl vyvinut fluorogenní substrát pro proteázy glycylyfenylalanyl-aminofluorokumarin (GF-AFC), který selektivně detekuje jejich aktivitu. Proniká do živých buněk, kde se v cytoplazmě mění působením aminopeptidáz na aminofluorokumarin (AFC) za vzniku fluorescenčního záření, které je tím pádem úměrné počtu živých buněk. Metoda dobře funguje v kombinaci s jinými metodami, např. ATP testem. [14]

2.2.4 Luminometrické metody

Luminometrické testy poskytují rychlé a jednoduché určení proliferace buněk a cytotoxicity. Obvykle se provádí na destičkách (96-well/384-well microtiter plate) a vzniklý konečný signál, typu záření, se detekuje pomocí luminometrické čtečky mikrodestiček. Pozoruhodnou vlastností luminometrických metod je perzistentní a stabilní konečný signál vznikající po přidání činidla. Díky tomu lze ze stejné jamky určit jak životaschopnost, tak hodnoty cytotoxicity.

V biologických systémech hraje ATP důležitou roli při výměnách energie. Je přítomen ve všech metabolicky aktivních buňkách, které ho potřebují k přežití. Většina ATP se nachází uvnitř buněk a účastní se katabolických a anabolických procesů. Jakmile poškozená buňka ztrácí integritu buněčné membrány, ztrácí i schopnost syntetizovat ATP a tím hladina cytoplazmatického ATP výrazně klesá. Proto je jeho množství významným markerem viability buněk a tento marker je klíčový pro mnoho metod. [23]

Nejvíce se využívá ATP test (průběh testu znázorněn na Obr. 2.4), při kterém dochází k lýze buněk působením vhodného detergentu a tím k uvolnění cytoplazmatického ATP. Uvolněné ATP reaguje s luciferinem, kyslíkem a za přítomnosti enzymu luciferázy a iontů Mg^{2+} vzniká oxyluciferyn a luminiscenční záření. Existuje lineární vztah mezi intenzitou luminiscenčního záření a koncentrací ATP, tedy počtem živých buněk. Tato metoda je nejrychlejší, nejvíce senzitivní a méně náchylná k artefaktům v porovnání s ostatními metodami určujícími životaschopnost buněk. Luminiscenční záření dosáhne stabilního stavu a ustálí se do 10 minut po přidání činidla. [11, 23]



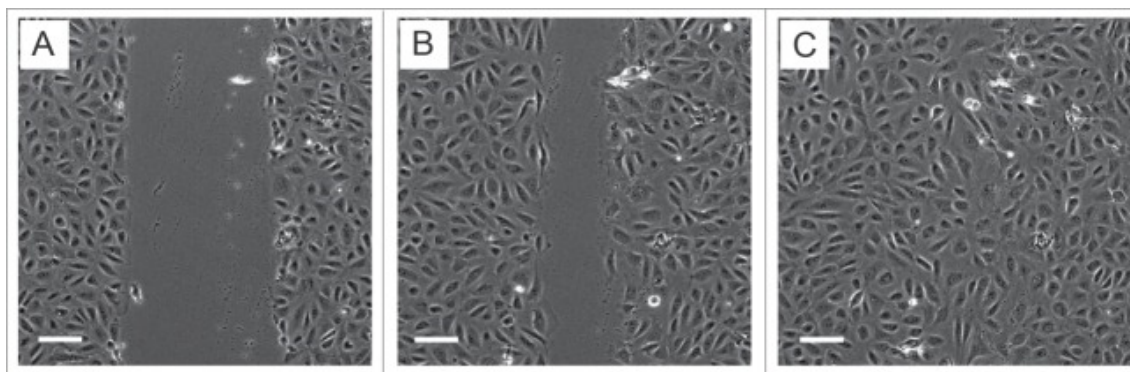
Obr. 2.4: Schématické znázornění ATP testu. Počet živých buněk je přímo úměrný intenzitě vzniklého luminiscenčního záření. (Upraveno z: [15])

Nedávno byla vyvinuta nová metoda k měření počtu životaschopných buněk v reálném čase. Metoda využívá luciferázu a malou molekulu pro-substrátu (nejedná se však o substrát luciferázy). Pro-substrát i luciferáza se přidávají přímo do kulti-vačního média, kde mají funkci činidla. Živé buňky, které jsou metabolicky aktivní, redukují pro-substrát na substrát, s kterým reaguje luciferáza a vytvoří se tak lumi-niscenční záření. Měření probíhá dvěma způsoby: buď až na konci experimentu nebo v kontinuálním režimu, kdy je luminiscenční záření ze vzorku opakovaně detekováno, tudíž dochází ke sledování počtu buněk v čase. [11]

3 Scratch assay

Scratch assay je jednoduchá, nízkonákladová a propracovaná metoda pro měření migrace buněk *in vitro*. Pomocí pipety se v monovrstvě buněk vytvoří rýha a následně se v pravidelných časových intervalech mikroskopicky sledují buňky, které se snaží rýhu zacelit. Mikroskopické pozorování probíhá až do chvíle, než se buněčná spojení zcela obnoví. Vyhodnocuje se míra migrace buněk směrem do rýhy. Pro hodnocení vlivu exprese exogenních genů na migraci jednotlivých buněk existuje metoda *in vitro scratch assay* v kombinaci s mikroinjekcí nebo genovou trasnfekcí. Migrace jednotlivých buněk je sledována pomocí časosběrné mikroskopie a softwaru pro analýzu obrazu.

Metoda do jisté míry napodobuje migraci buněk *in vivo*. Například pokud v krevních cévách dojde k odstranění části endotelu, tak endotelové buňky migrují do poškozené oblasti, aby ránu uzavřely. Narozdíl od jiných metod před testem nedochází k porušení mezibuněčné komunikace a komunikace mezi buňkami a extracelulární matrix (ECM). Mezi nevýhody se řadí časová náročnost (buňky vytvoří monovrstvu za 1–2 dny, rýhu uzavřou za 8–18 hodin), nutnost precizního zhotovení rýhy v monovrstvě buněk a spotřeba velkého množství buněk a chemikálií. [24]



Obr. 3.1: Snímky lidských endotelových buněk z pupečnickové žíly (HUVEC) pořízené v různých časových intervalech po *wound healing scratch assay*. S narůstajícím časovým intervalem dochází k zacelení vytvořené rýhy. Měřítko je 120 μm . (Převzato z: [25])

4 Buněčné linie

Pro srovnání bylo studium vlivu nanočástic oxidu zinečnatého na migraci buněk provedeno na dvou buněčných liniích, na nenádorové buněčné linii NIH-3T3 a nádorové Saos-2.

4.1 Buněčná linie NIH-3T3

Buněčná linie NIH-3T3 je získávána izolací fibroblastů myšího embrya. Fibroblasty jsou nejdůležitějším typem buněk v pojivové tkáni, protože produkují složky ECM, především kolagen typu I. a III. a tím určují architekturu tkání. Jedná se o heterogenní buňky vyvíjející se do různých buněčných typů v závislosti na okolním prostředí. Dále se podílejí na procesu hojení ran, který se skládá ze tří částí: zánětu, proliferace a remodelace, během které se fibroblasty aktivují a transformují na myofibroblasty. [26]

Poprvé tuto linii izolovali roku 1962 na Lékařské fakultě newyorské univerzity dva vědci, George Torado a Howard Green, z fibroblastů NIH švýcarských myších embryí.[27] Název NIH-3T3 byl odvozen z „protokolu 3T3“ (angl. „3-day transfer, inoculum $3 \cdot 10^5$ cells“), podle kterého byly primární buňky myších fibroblastů kultivovány. Po 3 denní kultivaci (první „3“) bylo $3 \cdot 10^5$ buněk (druhá „3“) přeneseno („transfer“) do nové kultivační lahve. [28]

Jedná se o adherentní buňky tvořící monovrstvu. Jsou snadno udržovatelné v *in vitro* podmínkách, proto se hojně využívají v buněčném a molekulárním výzkumu. [26, 27, 28]

4.2 Buněčná linie Saos-2

Buněčná linie Saos-2 je jednou z buněčných linií lidského osteosarkomu. Osteosarkomy jsou zhoubné kostní nádory skládající se z buněk s abnormálními molekulovými a buněčnými funkcemi. Dochází u nich k narušení exprese extracelulárních matrixových proteinů, což způsobuje změny v osteoidu a vede k histologickým a imunohistochemickým odlišnostem ve srovnání s normálním osteoidem. [29]

Buňky osteosarkomu se od kostních buněk (osteoblastů) liší morfologií, pozměněnou komunikací mezi buňkami a absencí inhibice kontaktu, tím pádem nedochází k regulaci růstu a netvoří pouze monovrstvy. Sdílejí i vlastnosti osteoblastů jako je aktivita alkalické fosfatázy (u buněk osteosarkomu vyšší), přítomnost PTH receptorů, syntéza a sekrece kolagenu typu I. a produkce mineralizované ECM. [29, 30]

Saos-2 byly poprvé popsány v roce 1975. Kromě celosvětové dostupnosti je jejich velkou výhodou, že jsou dobře zdokumentovány a umožňují získat poměrně velké množství buněk v krátkém čase. Běžně se využívají ke studiu chování kostních nádorů. [29, 31]

5 Praktická část

Cílem praktické části bakalářské práce bylo provést kultivaci dvou buněčných linií, NIH-3T3 z myších embryí a Saos-2 z osteosarkomu. Následně stanovit cytotoxicitu nanočástic oxidu zinečnatého s ohledem na jejich koncentraci a typ buněk. Obě buněčné linie byly podrobeny expozici NPs ZnO a následně byl proveden MTT test, který posoudil míru cytotoxicity. Podle dosažených výsledků byly vybrány vhodné koncentrace NPs, které byly použity na *Scratch assay* test. Výsledné snímky ze *Scratch assay* testu byly vyhodnoceny pomocí aplikace pro zpracovávání obrazů.

5.1 Použité materiály a přístroje

5.1.1 Použité přístroje a pomůcky

- laminární box - BIOAIR Euroclone Aura Mini
- inkubátor - Memmert ICOver
- inverzní mikroskop - Nikon Eclipse TS100
- centrifuga - Hettich EBA 20
- vodní lázeň - JUBALO ED 5
- lednička - Liebherr
- mrazák - Liebherr
- vortex - IKA
- minitřepačka - MS 3 digital
- spektrofotometr - COULTER
- mikroskop s fázovým kontrastem - Leica DMi8
- ultrazvukový homogenizátor - Bandelin Sonopuls HD 3200
- automatické pipety v různém rozsahu objemu - HTL Discovery Comfort
- pipetovací špičky
- pipetový dávkovač - Eppendorf Easypet
- sérologické pipety (5 ml)
- kultivační lahvičky (25 cm²) - Biofil, Sigma
- centrifugační zkumavky (15 ml)
- 96-jamkové destičky - Thermo Scientific
- mikrozukavky (1,5 ml)
- Pausterovy pipety (3 ml)
- Petriho misky (o průměru 32,8 mm) - Deltalab
- kádinka na odpad, láhev na tekutý odpad

5.1.2 Použité chemikálie a média

- kultivační médium pro NIH-3T3 (Dulbeccovo modifikované Eagleho médium (DMEM) high glucose, 5% fetální bovinní sérum (FBS), 1% penicilin-streptomycin)
- kultivační médium pro Saos-2 (DMEM high glucose : Ham's F-12 (1:1), 10% FBS, 1% penicilin-streptomycin)
- ethanol 70%
- fosfátový pufr (PBS)
- trypsin + kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)
- thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)
- NPs ZnO: potažené polyvinylpyrrolidonem, ve formě prášku, velikost v rozmezí 60-120 nm, měření bylo provedeno pomocí dynamického rozptylu světla (DLS)
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- hexametafosfát sodný (SHMP)
- fibronektin

Všechny chemikálie pochází od společnosti Sigma-Aldrich.

5.2 Ktivace a pasážování buněk

Při práci s buňkami je důležité sterilní prostředí, proto jsou před manipulací s nimi všechny pomůcky a povrchy vydezinfikovány ethanolem. Po ukončení práce je pracovní plocha dekontaminována UV světlem.

Před zahájením kultivace je potřeba rozmrazit buňky. Nejprve se kryozkumavka se zamraženými buňkami zahřeje na pokojovou teplotu. Popíše se kultivační lahvička (typ buněk, číslo pasáže, číslo předchozí pasáže, datum). Poté se do ní přidá zahřáté médium a určitý objem buněk z kryozkumavky. Její obsah je resuspendován a buňky jsou zkontrolovány pod inverzním mikroskopem (tvar, koncentrace, nečistoty). Po sterilizaci lahvičky ethanolem je vložena do inkubátoru.

Kultivace buněk musí probíhat za speciálních podmínek, které zajišťuje inkubátor. Inkubátor udržuje teplotu na 37 °C, vysokou vlhkost (85-95%) a koncentraci CO₂ (5%). Kromě toho je pro růst buněk důležité kultivační médium obsahující živiny a vytvářející vhodné prostředí pro růst. Buňky rostou v kultivačních nádobách až do dosažení vysokého procenta konfluency, tj. stavu, kdy buňky zaplní povrch dna nádoby a dostanou se do vzájemného kontaktu. V této fázi je nezbytné buňky přenést (pasážovat) do nové kultivační nádoby.

Kultivované buňky se 2x týdně kontrolovaly pod inverzním mikroskopem. V případě nižšího procenta konfluency se pouze vyměnilo staré médium za médium nové, v opačném případě se provedla pasáž. Potřebné roztoky byly před použitím zahřáty ve vodní lázni na 37°C.

Postup pasáže:

1. Z kultivační lahvičky odsát staré médium.
2. Přidat 3 ml PBS pufru, který opláchne buňky od média a pufr odsát.
3. Pro oddělení buňek ode dna přidat a rozprostřít po dně 1 ml trypsinu. Kultivační lahvičku umístit na 2 minuty do inkubátoru.
4. Po inkubaci provést mikroskopickou kontrolu buňek (zakulacení buněk, plavání v médiu). Pokud je nutné, tak buňky ze dna jemně mechanicky sklepat.
5. Přidat 3 ml kultivačního média (inaktivace trypsinu), buňky šetrně resuspendovat (5-7x).
6. Buněčnou suspenzi (4 ml) přepipetovat do centrifugační zkumavky (15 ml).
7. Centrifugace při 1000 otáčkách/min po dobu 5 minut.
8. Odstranit z centrifugační zkumavky supernatant, nutné dávat pozor na pelet buněk, aby nedošlo k jeho odsátí.
9. Do centrifugační zkumavky přidat 1 ml média a buňky resuspendovat.
10. Pomocí Bürkerovy komůrky určit množství buněk v buněčné suspenzi.
11. Do nové kultivační lahvičky přidat médium a množství buněk odpovídající vhodné koncentraci (nasazovalo se NIH-3T3: 150 μ l, Saos-2: 280-300 μ l). Lahvičku popsat (typ buněk, číslo pasáže, datum, koncentrace buněk). Buňky zkontrolovat pod mikroskopem a vložit do inkubátoru.

5.2.1 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Bürkerova komůrka je speciálně upravená skleněná destička, která má dvě počítací plochy s vyrytou mřížkou o přesně definovaných rozměrech (viz Obr. 5.1). Mřížku tvoří 9 větších čtverců oddělených 3 drážkami (každý o ploše 1 mm²), které jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců oddělených 2 drážkami. Pro rozlišení živých buněk od mrtvých se před počítáním přidá do buněčné suspenze barvivo (např. trypanová modř).

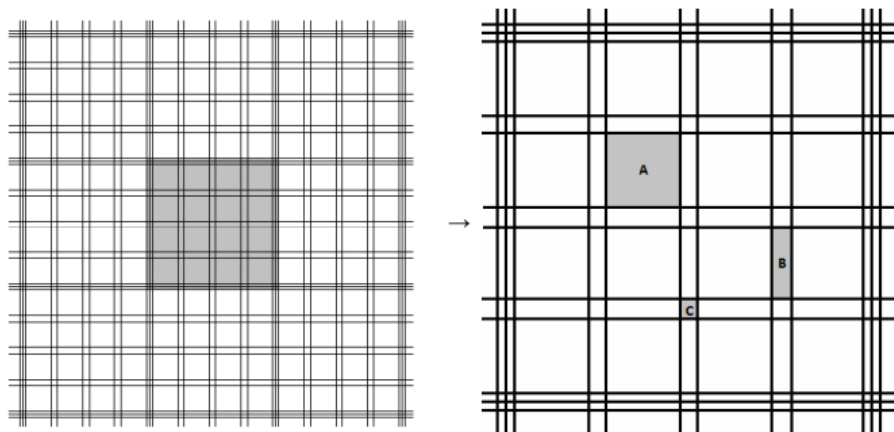
Postup počítání buněk v Bürkerově komůrce:

1. Do mikrozukavky napipetovat 20 μ l buněčné suspenze a přidat 20 μ l trypanové modři.
2. Objem mikrozukavky nanést na horní i dolní počítací plochu Bürkerovy komůrky a přikrýt krycím sklíčkem.
3. Preparát vložit pod mikroskop a spočítat buňky (počítají se buňky uvnitř čtverce a ty, které leží nebo se dotýkají pouze dvou vybraných sousedních stran čtverce).
4. Pomocí vzorce (5.1) určit počet buněk v 1 ml buněčné suspenze.

Vzorec pro určení počtu buněk v 1 ml suspenze:

$$X = \frac{a \cdot 1000 \cdot d}{n \cdot V} \quad (5.1)$$

kde X je koncentrace buněk v 1 ml suspenze, a je celkový počet napočítaných buněk, d je ředění suspenze (2), n je počet spočítaných čtverců a V je objem počítaného útvaru. V experimentu byly buňky počítány v 16 čtvercích, tudíž $n = 16$ a $V = 0,004 \text{ mm}^3$.



Obr. 5.1: Bürkerova komůrka s detailem počítací mřížky. Plocha čtverce A je $0,04 \text{ mm}^2$, obdélníku B $0,01 \text{ mm}^2$ a nejmenšího čtverce C $0,0025 \text{ mm}^2$. (Převzato z: [32])

5.3 MTT test

Pro MTT test byla použita 96-jamková destička. Destička je tvořena dvanácti sloupci (1-12) a osmi řádky (A-H). První čtyři řádky destičky byly použity pro buněčnou linii NIH-3T3, druhá polovina destičky pro Saos-2. Na destičce byly vyhrazeny 2 sloupce pro kontrolu. První sloupec byl použit jako negativní kontrola (Obr. 5.2), proto do něj nebyly nasazeny nanočástice, ale byly v něm pouze buňky a médium, viabilita buněk v něm byla nejvyšší. V posledním sloupci zůstaly čtyři jamky úplně prázdné (3., 4., 7. a 8. řádek), tudíž sloužily jako blank. Zbýlé čtyři jamky byly využity k ověření účinku SHMP na buňky. U druhého a třetího MTT testu byl do celého 12. sloupce napipetován SHMP, jako blank byly využity hodnoty z předcházejícího experimentu.

5.3.1 Příprava na MTT test

První den

V závislosti na zjištěném množství buněk v buněčné suspenzi byl spočítán její objem a objem zahřátého kultivačního média potřebný pro nasazení do jamek destičky. U NIH-3T3 se počítalo s $5 \cdot 10^4$ buňkami na 1 cm^2 , u Saos-2 kvůli jejich pomalejšímu růstu s dvojnásobkem, tedy s $10 \cdot 10^4$ buňkami na 1 cm^2 . Vypočítané množství bylo

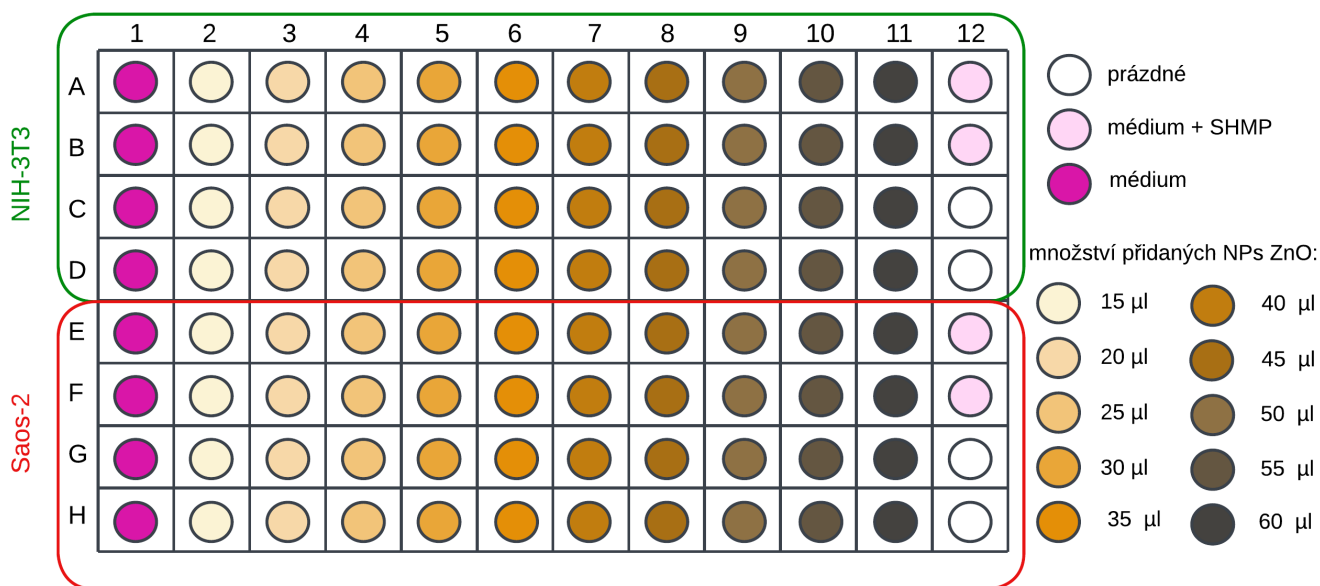
napipetováno do centrifugační zkumavky a její objem byl Pausterovou pipetou resuspendován. Dále byla nově zhotovená buněčná suspenze rozpipetována po 200 μ l do každé jamky. Po napipetování jednoho sloupce (4 jamky) byl vždy objem centrifugační zkumavky opět resuspendován a poté se pokračovalo nadcházejícím sloupcem. V posledním sloupci se poslední dvě jamky nechaly prázdné (NIH-3T3: v 3. a 4. řádku, Saos-2: v 7. a 8. řádku). Pro zajištění rovnoměrného rozprostření buněk byla buněčná suspenze v jamkách resuspendována. Nakonec byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem a destička vložena do inkubátoru.

Druhý den

Po dvou dnech byly do destičky aplikované nanočástice oxidu zinečnatého. NPs ZnO rozpuštěné v demineralizované vodě byly v centrifugačních zkumavkách společně se SHMP (1:5). Kvůli jejich spontánní agregaci je bylo nutné před použitím rozmíchat za působení ultrazvuku.

96-jamková destička byla mikroskopicky zkontrolována. Potom bylo odsáto staré médium a přidáno médium nové: 1. sloupec 200 μ l, 2.-11. sloupec 100 μ l, 12. sloupec 180 μ l + 20 μ l SHMP (koncentrace 0,2 mg/ml). Buňky byly zkontrolovány pod mikroskopem a destička vložena do inkubátoru.

Do stojánku bylo připraveno 20 mikrozkuvek (10 pro každou buněčnou linii). Do každé bylo napipetováno odlišné množství roztoku obsahujícího rozpuštěné NPs ZnO (podle Obr. 5.2). Množství NPs v jednotlivých sloupcích odpovídalo koncentracím v rozmezí 15-60 μ g/ml, přičemž mezi jednotlivými hodnotami byl rozdíl 5 μ g/ml. Škála koncentrací byla určena z výsledků předchozího MTT testu, při kterém byla vyzkoušena reakce buněk NIH-3T3 na NPs ZnO ve 22 různých koncentracích v rozsahu 0-60 μ g/ml. Nakonec bylo do mikrozkuvky napipetováno odpovídající množství média, aby byl objem dorovnán na 500 μ l. Každá mikrozkuvka byla zamíchána na vortexu a poté rozpipetována po 100 μ l do 4 jamek ve sloupci, začalo se od 2. sloupce a desátá mikrozkuvka vyšla na sloupec 11. Buňky byly zkontrolovány pod mikroskopem a vloženy do inkubátoru.



Obr. 5.2: Schéma 96-jamkové destičky pro aplikaci roztoků a buněčných linií.

5.3.2 Postup a výsledek MTT testu

MTT test byl proveden 3. den (po dvou dnech přípravy).

1. Do centrifugační zkumavky přidat 4,8 ml média a 480 µl MTT. (*Do jedné jamky 100 µl média + 10 µl MTT, pro každou buněčnou linii počítat pro 48 jamek.*)
2. Zamíchat pomocí vortexu.
3. Vytáhnout 96-jamkovou destičku z inkubátoru a mikroskopicky zkontrolovat buňky.
4. Odsát staré médium z jamek a přidat do jamky 110 µl namíchaného média s MTT.
5. Zkontrolovat buňky pod mikroskopem a vložit do inkubátoru.
6. Po 4 hodinách inkubace buňky mikroskopicky zkontrolovat (vytvořené fialové krystalky), odsát z jamek médium a přidat do nich 100 µl DMSO.
7. Položit 96-jamkovou destičku na mikrotřepačku a poté vložit do spektrofotometru.

96-jamková destička byla spektrofotometricky analyzována při vlnové délce 570 nm. Výsledkem MTT testu je absorbance, která je přímo úměrná viabilitě buněk.

5.4 *Scratch assay*

Pro *Scratch assay* test byly podle výsledků MTT testu vybrány 3 koncentrace NPs ZnO, nejvyšší koncentrace odpovídala hodnotě IC_{50} pro NIH-3T3. Pracovalo se tedy se čtyřmi vzorky, z nichž jeden byl kontrolní. Kvůli problému s odlepováním větších shluků buněk NIH-3T3 ze dna Petriho misky při vytváření rýhy bylo potřeba před experimentem dno misky pokrýt fibronectinem.

5.4.1 Příprava na *Scratch assay*

Do misky byl přidán PBS a fibronectin (v celkovém objemu 830 μ l, 1 μ g/cm²). Roztok byl rozprostřen po celé ploše misky a miska byla vložena do inkubátoru na 30–60 min. Mezitím byla provedena pasáž. Po uplynutí času byly misky vytáhnuty z inkubátoru a byl z nich odsán roztok. Poté byly misky propláchnuty PBS, který byl následně odstraněn. U misek pro Saos-2 se pokrývání fibronectinem neprovádělo, udělala se pouze pasáž buněk.

Do prázdné misky byly napipetovány 2 ml média a množství buněčné suspenze odpovídající koncentraci $6 \cdot 10^4$ buněk/cm² (NIH-3T3) a $6,5 \cdot 10^4$ buněk/cm² (Saos-2). Objem misky byl resuspendován. Misky byly popsány - typ buněk, datum, pořadí (1–4). Nakonec byly buňky mikroskopicky zkontrolovány a vloženy do inkubátoru.

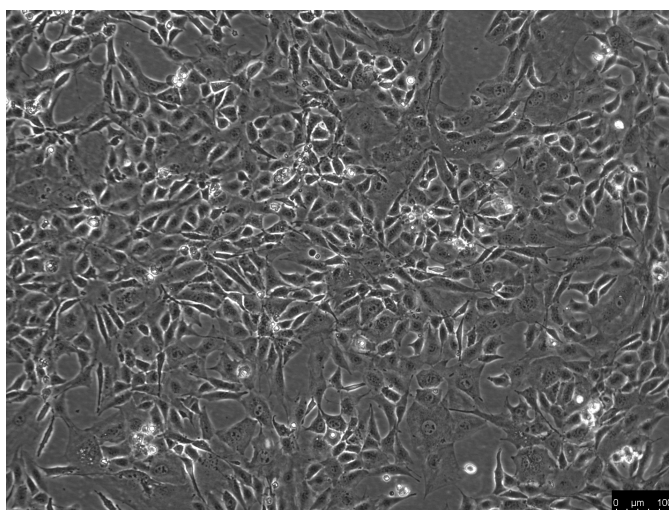
5.4.2 Postup *Scratch assay*

1. V misce do adherovaných buněk udělat špičkou pipety rýhu.
2. Odsát médium s uvolněnými buňkami.
3. Propláchnout PBS a následně ho odsát.
4. Přidat 2 ml média a pořídit snímky z rýhy na mikroskopu s fázovým kontrastem (snímky z 0 hodin).
5. Do kontrolního vzorku přidat 500 μ l média. Do ostatních misek přidat médium s NPs ZnO v určité koncentraci - 2. 15 μ g/ml, 3. 25 μ g/ml a 4. 50 μ g/ml.
6. Buňky zkontrolovat pod mikroskopem a vložit do inkubátoru.
7. Po 24 hodinách pořídit snímky z rýhy na mikroskopu s fázovým kontrastem (snímky z 24 hodin).

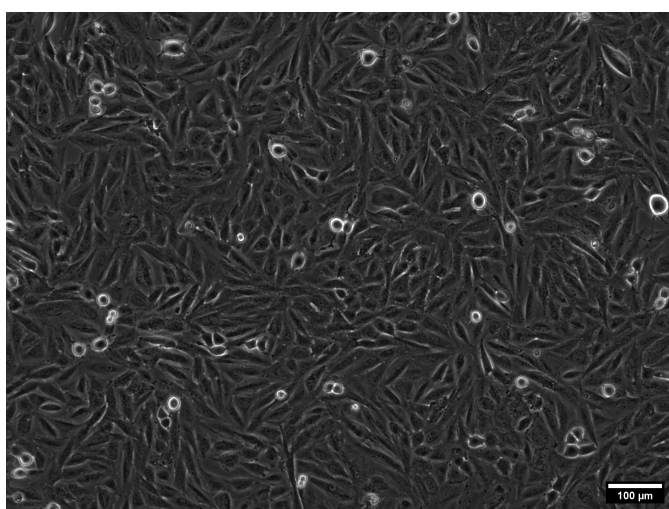
6 Výsledky a jejich zpracování

6.1 Kultivace buněk

Praktická část byla zaměřena na kultivaci fibroblastických NIH-3T3 a nádorových Saos-2. Buňky byly kultivovány podle postupu v kapitole 5.2. Během kultivace byly zhotoveny snímky, které jsou zobrazeny níže (viz Obr. 6.1 a Obr. 6.2). Buňky obou buněčných linií mají vřetenovitý tvar s výběžky a oválné jádro. Během kultivace však NIH-3T3 v porovnání se Saos-2 dosahovaly rychleji konfluence vhodné pro pasáž.



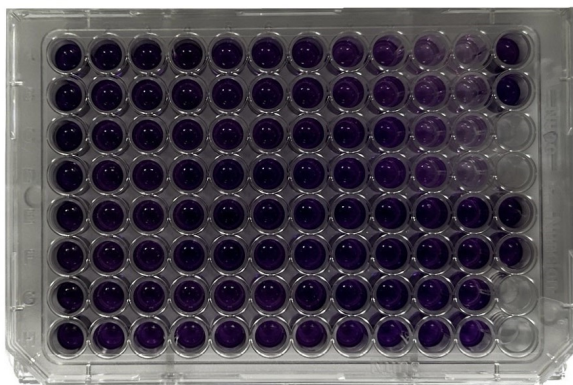
Obr. 6.1: Mikroskopický snímek buněčné linie NIH-3T3 v měřítku 100 μm.



Obr. 6.2: Mikroskopický snímek buněčné linie Saos-2 v měřítku 100 μm.

6.2 MTT test

Dalším bodem praktické části bylo provedení MTT testu. Spektrofotometrickou analýzou byly při vlnové délce 570 nm získány hodnoty absorbance jednotlivých jamek z 96-jamkové destičky. Destička po analýze je zobrazena na Obr. 6.3.



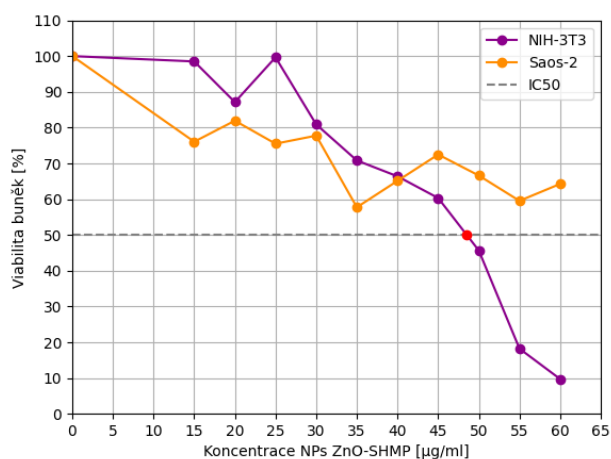
Obr. 6.3: 96-jamková destička po spektrofotometrickém vyhodnocení MTT testu. Intenzita barvy v jednotlivých jamkách destičky je přímo úměrná viabilitě buněk. Čím je viabilita nižší, tím je barva světlejší.

Jednotlivé hodnoty absorbance byly dále zpracovány. Prvně se ze čtyř hodnot odpovídajících jedné koncentraci NPs ZnO a jedné buněčné linii odstranila hodnota, která se nejvíce lišila od ostatních. Ze zbývajících tří byl vypočítán aritmetický průměr a od něj byl odečten aritmetický průměr blanku (ze dvou hodnot, eventuálně z hodnot blanku z předchozích měření). Následně byla vyhodnocena viabilita buněk vztahující se k negativní kontrole, dle vzorce:

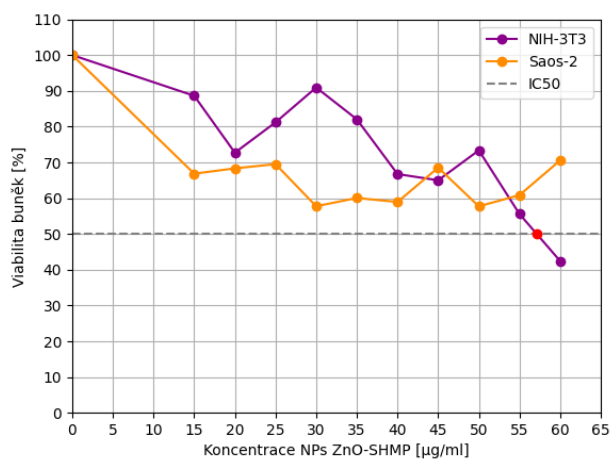
$$viabilita = 100 * \frac{A_{vzorku}}{A_{neg}} \quad (6.1)$$

kde A_{vzorku} odpovídá absorbanci daného vzorku a A_{neg} absorbanci negativní kontroly, tedy abrobanci, která představuje 100% viabilitu.

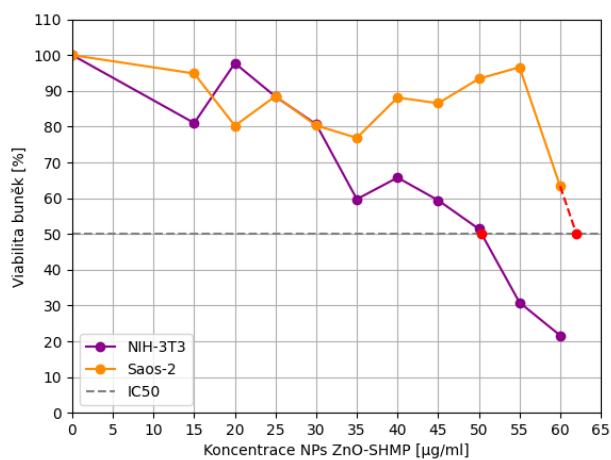
Poté byl zhotoven graf závislosti viability buněk [%] na rostoucí koncentraci nanočástic [$\mu\text{g}/\text{ml}$]. Grafy z jednotlivých měření jsou znázorněny na Obr. 6.4, 6.5, 6.6. Pro NIH-3T3 byly z grafů určeny a vyznačeny hodnoty IC_{50} neboli inhibiční koncentrace. IC_{50} představuje koncentraci [$\mu\text{g}/\text{ml}$] NPs ZnO při které dochází k usmrcení 50 % buněk. Pro Saos-2 byla tato hodnota zjištěna pouze z posledního grafu, průsečík dvou přímek byl získán pomocí lineární regrese aplikované na poslední dvě hodnoty koncentrace NPs ZnO. V následující tabulce (viz Tab. 6.1) jsou vyobrazeny hodnoty IC_{50} z provedených MTT testů.



Obr. 6.4: Graf závislosti viability buněk na koncentraci NPs ZnO. (1.MTT test)



Obr. 6.5: Graf závislosti viability buněk na koncentraci NPs ZnO. (2.MTT test)

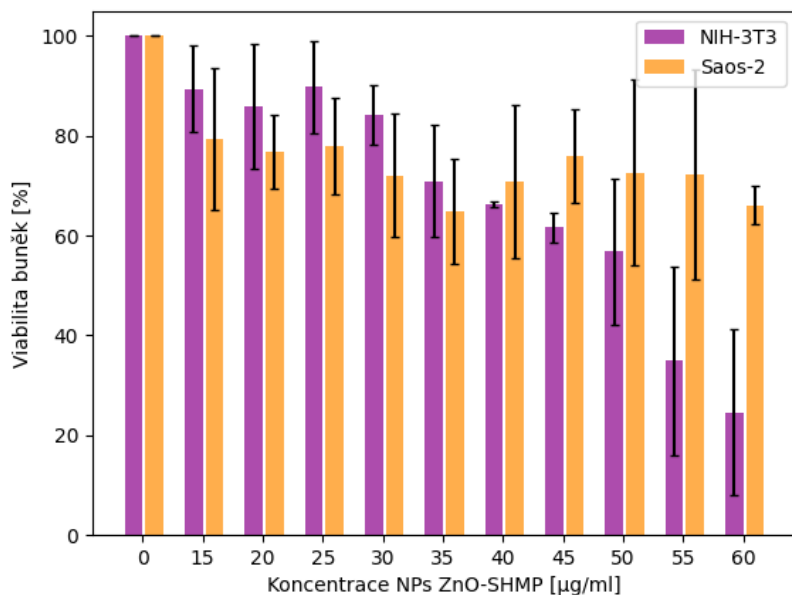


Obr. 6.6: Graf závislosti viability buněk na koncentraci NPs ZnO. (3.MTT test)

IC ₅₀		
číslo měření	NIH-3T3	Saos-2
1	48,515 ± 4,534	-
2	57,128 ± 4,534	-
3	50,341 ± 4,534	±62,005

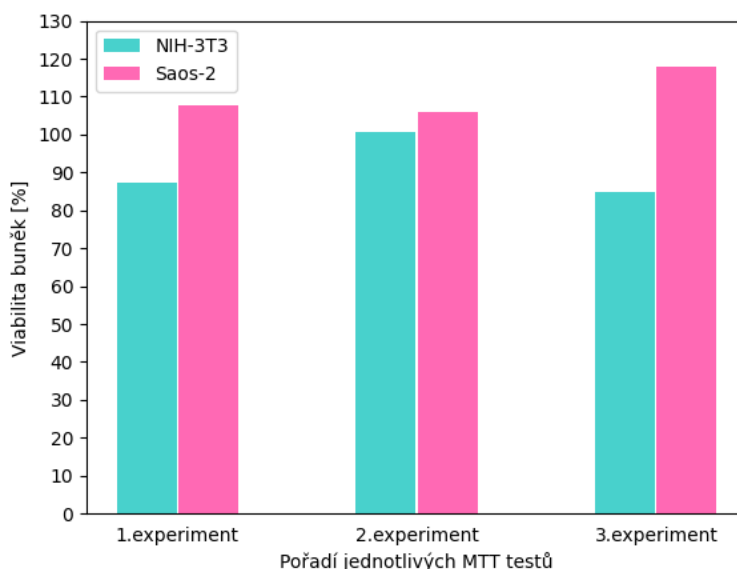
Tab. 6.1: Přehled hodnot IC₅₀ [μg/ml] z jednotlivých MTT testů. U NIH-3T3 se inhibiční koncentrace ve druhém experimentu liší od hodnot získaných v experimentu prvním a třetím. U Saos-2 je koncentrace NPs ZnO potřebná k usmrcení poloviny buněk vyšší než testovaná škála, nejvyšší testovaná koncentrace byla 60 μg/ml.

Lze očekávat, že čím vyšší je koncentrace NPs ZnO, tím více prokazují cytotoxický efekt vůči buňkám, tedy s rostoucí koncentrací NPs ZnO životaschopnost buněk klesá. Zatímco u NIH-3T3 tato skutečnost s občasnými výkyvy platí, u Saos-2 lze pozorovat prvotní větší spád, který se ovšem poté drží na stejné úrovni a k dalšímu poklesu už dochází minimálně. Tento jev lze pozorovat na Obr. 6.7. Při poslední testované koncentraci NPs ZnO je životaschopnost NIH-3T3 vždy menší než 50 %.



Obr. 6.7: Srovnání cytotoxických účinků NPs ZnO ze všech MTT testů.

S využitím MTT testu byl také vyhodnocen vliv SHMP (koncentrace 0,2 mg/ml) na životaschopnost buněk. SHMP neprokázal cytotoxické účinky vůči žádné z buněčných linií. Životaschopnost buněk Saos-2 po přidání SHMP byla $110,536 \pm 6,372$ %, u buněk NIH-3T3 byla trochu nižší, odpovídala $90,871 \pm 8,451$ %. (6.8).



Obr. 6.8: Výsledná viabilita buněk po přidání SHMP.

6.3 *Scratch assay*

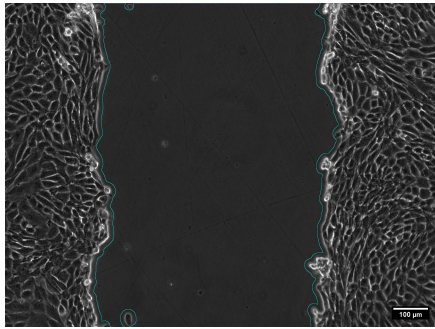
Posledním bodem praktické části bylo provedení *Scratch assay*. Pro test byly vybrány koncentrace NPs ZnO vycházející z předchozích MTT testů. Byla zvolena koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$, která odpovídala IC_{50} pro NIH-3T3, dále polovina zmíněné inhibiční koncentrace, předposlední vzorek obsahoval 15 $\mu\text{g/ml}$ a poslední vzorek nanočástice neobsahoval. Získané snímky byly vyhodnoceny softwarem ImagineJ Fiji [33] za pomoci nástrojů `Wound_healing_size_tool.ijm`, který je dostupný na: <https://github.com/AlejandraArnedo/Wound-healing-size-tool/wiki#wound-healing-size-tool>. a nástroje `MRI_Wound_Healing_Tool.ijm`, který je dostupný na: https://github.com/MontpellierRessourcesImagerie/imagej_macros_and_scripts/wiki/Wound-Healing-Tool. Nástroje lze přispůsobit pro analýzu jednotlivých snímků i obrazových sekvencí. První nástroj umožňuje analýzu fluorescenčních, fázově kontrastních snímků i snímků ze světelného pole. Byl použit na snímky z 0 hodin, u kterých byla změřena šířka rýhy [μm] a plocha rýhy [%], [μm^2]. Druhý nástroj byl více vhodný na snímky z 24 hodin, sice neměřil šířku rýhy, ale narozdíl od prvního nástroje měřil plochy jednotlivých míst bez buněk zvlášť. V případě, že nástroje nenadetekovaly plochu rýhy správně,

byla změřena ručně vyznačením jednotlivých oblastí. Rozměry snímku byly nastaveny podle nastavení kofokálního mikroskopu (1,543 px/ μm ; 1244,35x933,1). Získané výsledky byly srhnuty do tabulek, které se nachází v přílohách (tabulka A.1, A.2, A.3, A.4, A.5, A.6).

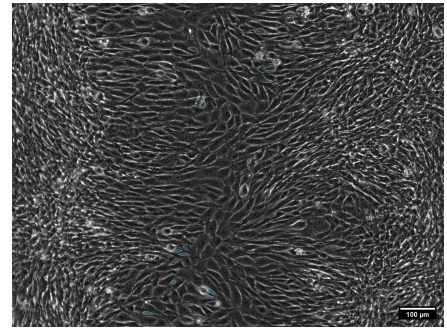
Na následujících stránkách jsou vyobrazeny fázově kontrastní snímky pořízené během *Scratch assay* experimentu. Na Obr. 6.9 jsou snímky ze vzorků s buňkami NIH-3T3, na Obr. 6.10 jsou snímky ze vzorků s buňkami Saos-2. Způsob organizace snímků je u obou buněčných linií stejný. V prvním sloupci jsou snímky z 0 hodin po vytvoření rýhy, ve druhém z 24 hodin po vytvoření rýhy. Každý řádek odpovídá snímkům ze stejné misky:

- a), b) snímky z kontrolního vzorku
- c), d) snímky z misky obsahující 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnO NPs
- e), f) třetí vzorek s 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnO NPs
- g), h) miska obsahující 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnO NPs

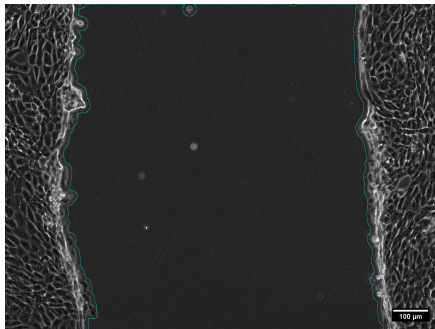
Modrou barvou je vyznačena detekce hranice mezi buňkami a rýhou vytvořená v softwaru ImageJ-Fiji. U NIH-3T3 je na snímku po 24 hodinách v první misce plocha rýhy nejmenší, zatímco ve čtvrté je největší. Plocha rýhy se zvětšuje společně se zvyšující se koncentrací ZnO NPs. U Saos-2 je na snímcích z 24 hodin po vytvoření rýhy nadetekovaná plocha rýhy nejvíce odlišná ve čtvrtém vzorku, ve zbylých vzorcích vypadá, že mají plochy rýhy podobné rozměry.



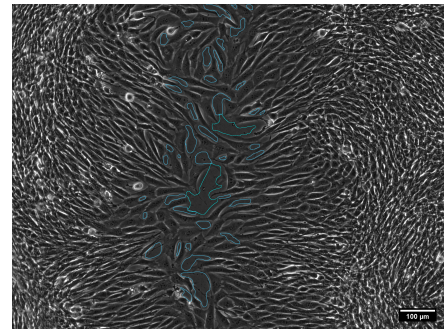
(a)



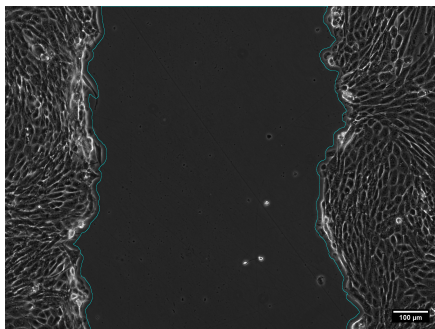
(b)



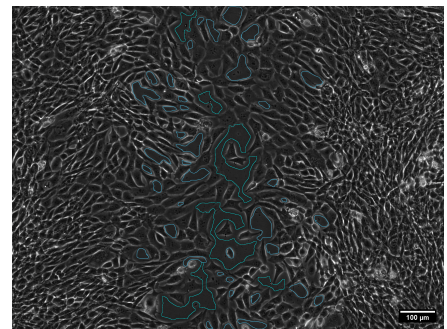
(c)



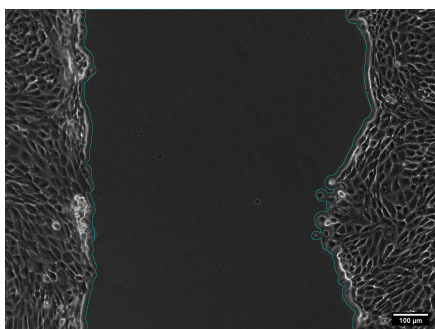
(d)



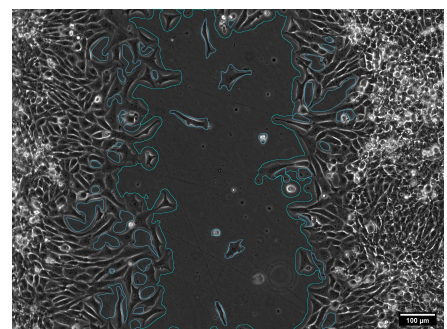
(e)



(f)

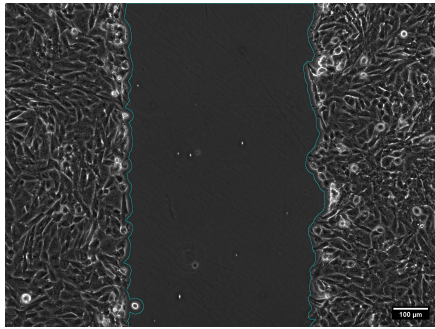


(g)

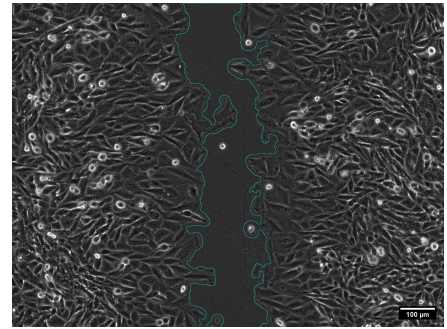


(h)

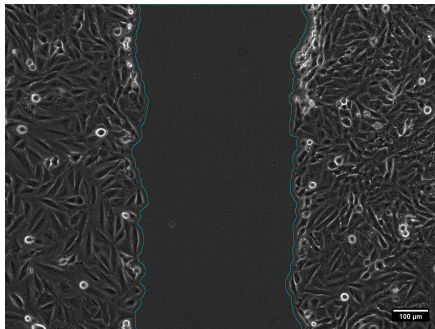
Obr. 6.9: Fázově kontrastní snímky ze *Scratch assay* po detekci hranic mezi buňkami NIH-3T3 a rýhou.



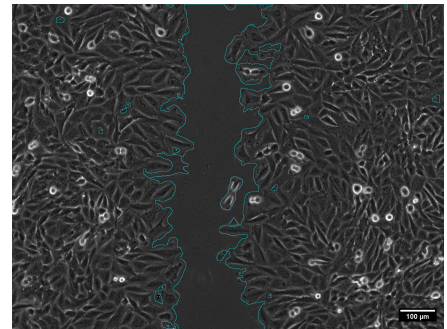
(a)



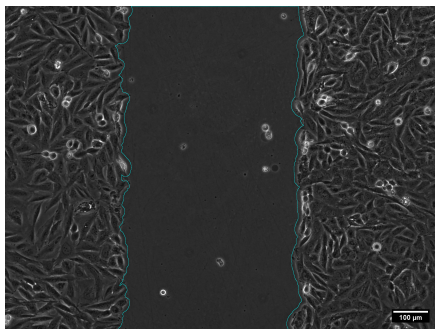
(b)



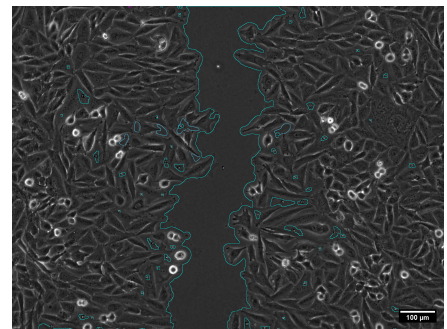
(c)



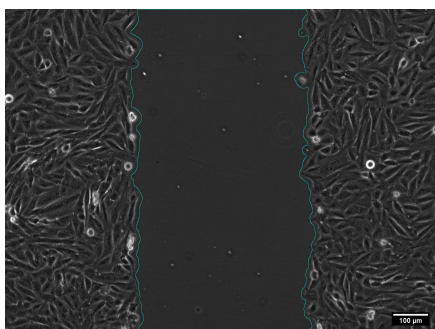
(d)



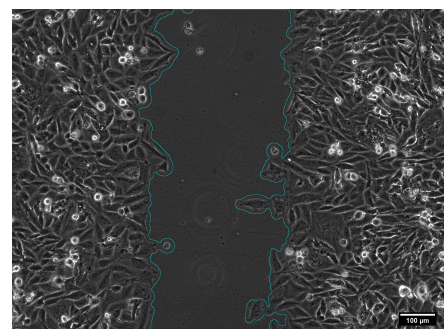
(e)



(f)



(g)



(h)

Obr. 6.10: Fázově kontrastní snímky ze *Scratch assay* po detekci hranic mezi buňkami Saos-2 a rýhou.

6.3.1 Statistické vyhodnocení *Scratch assay* testu

Výsledné parametry ze *Scratch assay* byly vyhodnoceny statistickými testy. Jelikož byla plocha rýhy měřena v obou časových intervalech, byl tento parametr porovnán v rámci jednotlivých misek. Cílem bylo zjistit, jestli rozdílná koncentrace NPs ZnO aplikovaná k buňkám měla nebo neměla vliv na jejich migraci. Pro statistickou analýzu a vizualizaci dat byl použit program Statistica.

Při výběru statistického testu pro srovnání více nezávislých výběrů jsou testovanými předpoklady nezávislost srovnávaných skupin, normální rozdělení proměnné ve všech skupinách a shodný rozptyl ve všech skupinách (homogenita rozptylů). Pokud jsou předpoklady splněny, byl vybrán parametrický test ANOVA. V opačném případě byly vybrány neparametrické testy, jednalo se o Kruskalův-Wallisův test a mediánový test. Kruskalův-Wallisův test nespĺňuje předpoklady o normalitě dat nebo předpoklady o homogenitě rozptylů, test porovnává mediány testovaných skupin. Mediánový test má stejné předpoklady jako Kruskalův-Wallisův test, je doporučován při větším porušení homogenity rozptylů. Hlavní rozdíl mezi Kruskal-Wallisovým testem a mediánovým testem spočívá v tom, že Kruskal-Wallisův test při výpočtu porovnává pořadí všech hodnot mezi nezávislými skupinami, zatímco mediánový test porovnává pouze hodnoty, které se nachází na jedné straně společného mediánu, není tedy vůči odlehlým hodnotám citlivý.

Pro ověření normality byl použit Shapirův-Wilkův test a pro ověření homogenity rozptylů Levenův test. Výsledkem statistických testů byla p-hodnota, která určila, zda se nulová hypotéza zamítne nebo potvrdí. Nulová hypotéza byla zamítnuta, pokud byla p-hodnota rovná nebo menší než zvolená hladina významnosti, tzv. α ($\alpha = 5 \% = 0,05$).

Zaprvé byly statistickými testy vyhodnoceny hodnoty plochy rýhy pro buňky NIH-3T3 získané ze snímků vytvořených v 0 a 24 hodinách. Z výsledků Shapirova-Wilkova testu (viz Tab. 6.2) nezamítáme ani v jednom z případů nulovou hypotézu, tudíž jsou data normálně rozložena.

Tab. 6.2: Výsledné p-hodnoty ze Shapirova-Wilkova testu (buněčná linie NIH-3T3).

statistický test	1. miska	2. miska	3. miska	4. miska
Shapirův-Wilkův test_0h	0,0949	0,2266	0,1547	0,9637
Shapirův-Wilkův test_24h	0,0697	0,2664	0,2921	0,4000

U testovaných dat z 0 hodin se potvrdila homogenita rozptylů, a proto data mohla být vyhodnocena parametrickým testem ANOVA. Byla stanovena nulová H_0 a alternativní H_A hypotéza:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4, H_A : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \quad (6.2)$$

kde je μ_1 střední hodnota plochy rýhy z 1. misky, μ_2 střední hodnota plochy rýhy z 2. misky, μ_3 střední hodnota plochy rýhy ze 3. misky a μ_4 střední hodnota plochy rýhy ze 4. misky.

U testovaných dat z 24 hodin se ale homogenita rozptylů nepotvrdila, takže byl použit neparametrický Kruskalův-Wallisův test. Bylo opět nutné stanovit nulovou H_0 a alternativní H_A hypotézu:

$$H_0 : \tilde{\mu}_1 = \tilde{\mu}_2 = \tilde{\mu}_3 = \tilde{\mu}_4, H_A : \tilde{\mu}_1 \neq \tilde{\mu}_2 \neq \tilde{\mu}_3 \neq \tilde{\mu}_4 \quad (6.3)$$

kde je $\tilde{\mu}_1$ medián z hodnot plochy rýhy z 1. misky, $\tilde{\mu}_2$ medián z hodnot plochy rýhy z 2. misky, $\tilde{\mu}_3$ medián z hodnot plochy rýhy z 3. misky a $\tilde{\mu}_4$ medián z hodnot plochy rýhy z 4. misky.

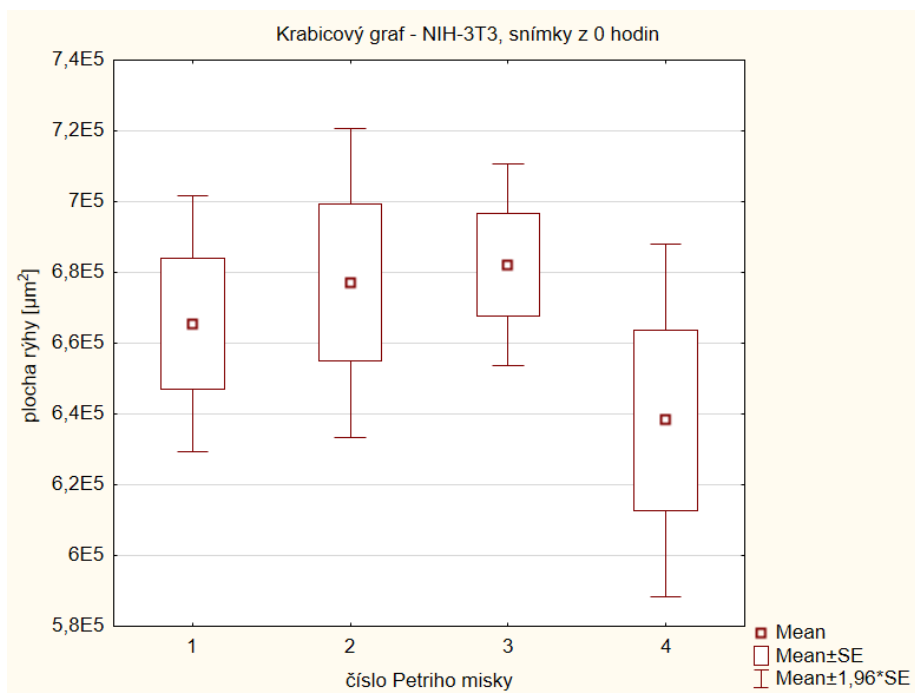
Výsledky jsou zaznamenány a graficky znázorněny (viz Tab. 6.3, Obr. 6.11). U dat z 0 hodin vyšla p-hodnota parametrického testu větší než hladina významnosti, tím pádem byla potvrzena nulová hypotéza, tedy po zhotovení drážek mezi hodnotami jejich ploch v jednotlivých miskách nebyly statisticky významné rozdíly. U dat z 24 hodin byla výsledná p-hodnota menší než hladina významnosti, tudíž plocha rýhy po 24 hodinách byla v jednotlivých miskách odlišná. Mnohonásobným porovnáním (viz Tab.6.4) lze prokázat statisticky významné nebo nevýznamné rozdíly v datech.

Tab. 6.3: Výsledné p-hodnoty z Levenova testu, ANOVY a neparametrických testů (Kruskalova-Wallisova a mediánova testu) (buněčná linie NIH-3T3).

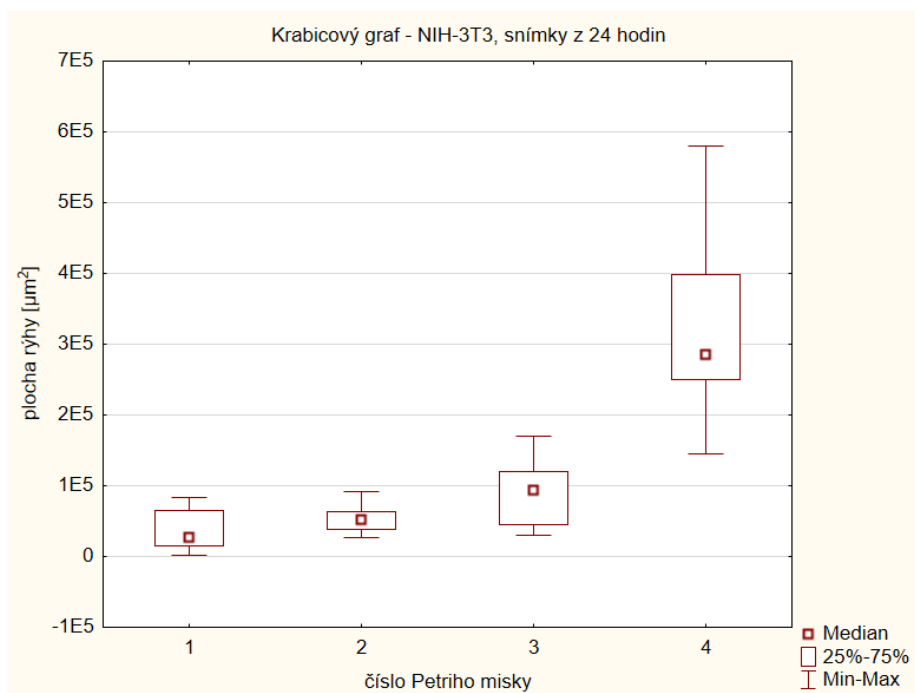
statistický test	p-hodnota
Levenův test_0h	0,1077
ANOVA_0h	0,4420
Levenův test_24h	0,0000
Kruskalův-Wallisův test_24h	0,0000
Mediánový test_24h	0,0000

Tab. 6.4: Mnohonásobné porovnání ploch rýh v miskách (NIH-3T3, snímky z 24 hodin).

	1. miska	2. miska	3. miska	4. miska
1. miska		0,8771	0,0370	0,0000
2. miska	0,8771		1,0000	0,0000
3. miska	0,0370	1,0000		0,0051
4. miska	0,0000	0,0000	0,0051	



(a)



(b)

Obr. 6.11: Krabicové grafy ze statistických testů hodnotících plochu rýhy v jednotlivých miskách s buněčnou linií NIH-3T3: a) z 0 hodin, b) z 24 hodin.

Poté byly analyzovány statistickými testy hodnoty plochy rýhy vzorků, které obsahovaly buňky Saos-2. Data byla opět sbírána ve dvou časových intervalech. Při testování normality je zamítnuta nulová hypotéza obou sad vzorků těchto intervalů, p-hodnota je téměř u všech nižší než 0,05. Protože data nejsou normálně rozložena (Tab. 6.5), neprovádíme kontrolu homogenity rozptylu, ale rovnou pokračujeme neparametrickými testy (Tab. 6.6).

Tab. 6.5: Výsledné p-hodnoty ze Shapirova-Wilkova testu (buněčná linie Saos-2).

statistický test	1. miska	2. miska	3. miska	4. miska
Shapirův-Wilkův test_0h	0,0196	0,0958	0,0208	0,0321
Shapirův-Wilkův test_24h	0,0038	0,0133	0,0042	0,4938

Podle výsledné p-hodnoty neparametrických testů hodnotících plochu vytvořené rýhy v miskách na počátku experimentu je nutné nulovou hypotézu zamítnout, medián z hodnot plochy rýhy se alespoň v jednom vzorku odlišuje. S ohledem na mnohonásobné porovnání 6.7 jsou odchylky hodnot testovaného parametru mezi většinou misek statisticky významné. Nulová hypotéza byla rovněž zamítnuta u hodnocení plochy rýhy ze snímků po 24 hodinách. Nicméně, první tři misky vykazují mezi sebou statisticky nevýznamné rozdíly v ploše rýhy, výrazně se od nich liší pouze plocha rýhy v poslední misce. Grafické výsledky statistických testů jsou vyobrazeny na Obr. 6.12 a 6.13.

Tab. 6.6: Výsledné p-hodnoty z neparametrických testů: Kruskalova-Wallisova a mediánova testu (buněčná linie Saos-2).

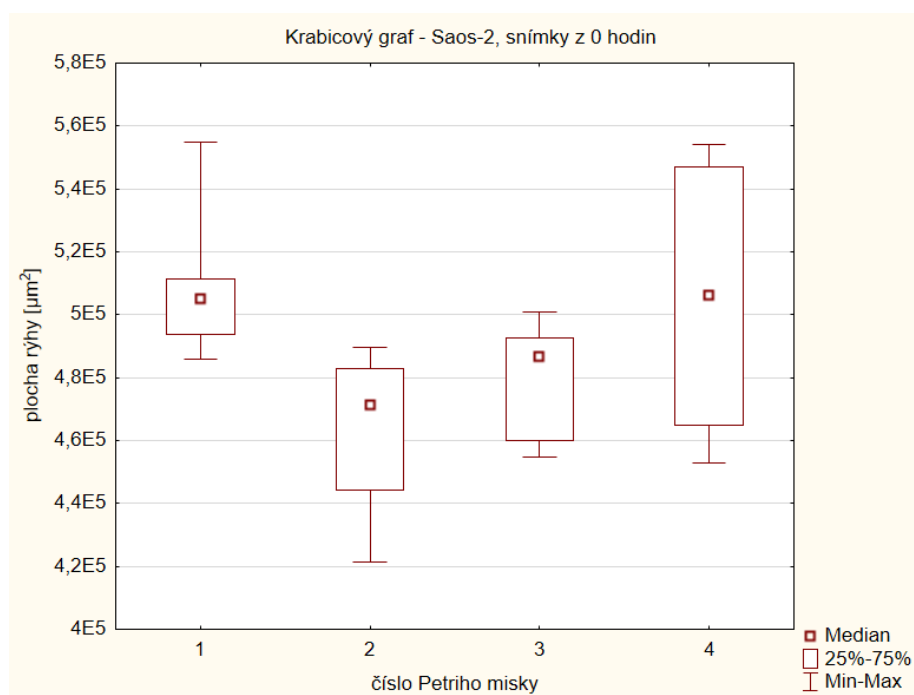
statistický test	p-hodnota
Kruskalův-Wallisův test_0h	0,0000
Mediánový test_0h	0,0000
Kruskalův-Wallisův test_24h	0,0008
Mediánový test_24h	0,0017

Tab. 6.7: Mnohonásobné porovnání ploch rýh v miskách (Saos-2, snímky z 0 hodin).

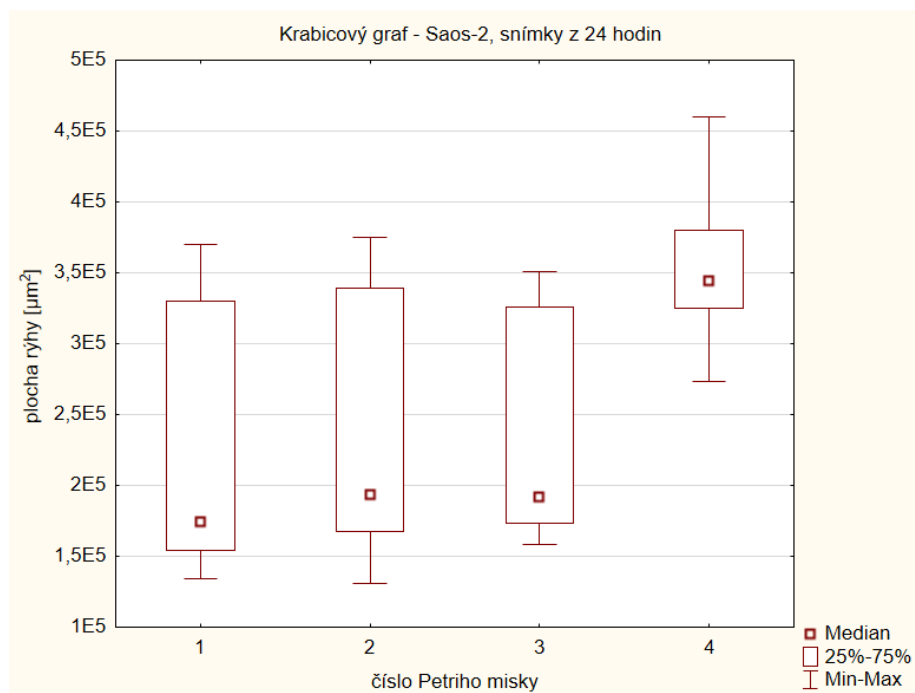
	1. miska	2. miska	3. miska	4. miska
1. miska		0,0001	0,0179	1,0000
2. miska	0,0001		0,8598	0,0062
3. miska	0,0179	0,8598		0,4134
4. miska	1,0000	0,0062	0,4134	

Tab. 6.8: Mnohonásobné porovnání ploch rýh v miskách (Saos-2, snímky z 24 hodin).

	1. miska	2. miska	3. miska	4. miska
1. miska		1,0000	1,0000	0,0010
2. miska	1,0000		1,0000	0,0235
3. miska	1,0000	1,0000		0,0096
4. miska	0,0010	0,0235	0,0096	



Obr. 6.12: Krabicový graf ze statistických testů hodnotících plochu rýhy v jednotlivých miskách s buněčnou linií Saos-2, ze snímků z 0 hodin.



Obr. 6.13: Krabicový graf ze statistických testů hodnotících plochu rýhy v jednotlivých miskách s buněčnou linií Saos-2, ze snímků z 24 hodin.

7 Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo posoudit vliv nanočástic oxidu zinečnatého na migraci buněk. Byly k tomu využity 2 testy. První MTT test zkoumal měnící se viabilitu buněk v závislosti na množství nanočástic, jímž byly buňky vystavovány. Druhý test *Scratch assay* určoval vliv NPs ZnO na míru migrace buněk. Schopnost buněk se pohybovat představuje klíčový faktor pro procesy jako je růst tkání, hojení ran nebo metastázování nádorů. Testy byly prováděny na dvou buněčných liniích, na nádorové Saos-2 a nenádorové NIH-3T3.

Cytotoxicita NPs ZnO byla prokázána vůči oběma buněčným liniím. Podle studií měly vykazovat vyšší cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám, tudíž vůči Saos-2. Tento předpoklad ovšem potvrzen nebyl. Z výsledků MTT testu je patrné, že zatímco u NIH-3T3 životaschopnost buněk po expozici NPs ZnO klesala v závislosti na její koncentraci, životaschopnost u Saos-2 sice také klesla, ale s rostoucí koncentrací nanočástic se po prvním spádu neměnila tak výrazně. Míra cytotoxicity byla posuzována na základě parametru IC_{50} , pro 3T3 byla stanovena na 51,992 $\mu\text{g/ml}$, u Saos-2 vycházela tato hodnota nad rámec testované škály (maximální testovaná koncentrace byla 60 $\mu\text{g/ml}$). Zjištění, že NPs ZnO jsou cytotoxictější vůči nenádorovým NIH-3T3 naznačuje, že jejich cytotoxicita závisí na specifických vlastnostech buněčného typu v kombinaci s vlastními charakteristikami jako je např. jejich velikost, tvar a povrchový náboj.

Pro určení míry migrace byl použit *Scratch assay* test. Míra pohybu buněk byla měřena prostřednictvím plochy rýhy ve dvou časových intervalech, po vytvoření rýhy a po 24 hodinách. U buněk NIH-3T3 bylo statistickými testy prokázáno, že při prvotním pořizování snímků nebyly rozdíly v ploše rýhy v jednotlivých vzorcích statisticky významné. Po 24 hodinách už ovšem byly tyto rozdíly mezi vzorky patrné. Nejmenší plocha, tedy největší migrace buněk, byla zaznamenána v prvním vzorku, který neobsahoval žádné nanočástice. V rámci 1.-3. vzorku došlo k mírnému nárůstu hodnoty plochy rýhy, ovšem mezi sousedními vzorky nedocházelo ke statisticky významnému rozdílu v hodnotách. První vzorek se však mírně, statisticky významně, lišil od třetího vzorku. Největší rozdíl prokazoval poslední vzorek, který byl výrazně odlišný od všech ostatních a plocha rýhy v něm byla největší. Jednalo se o vzorek obsahující koncentraci ZnO NPs, při které došlo v MTT testu k úmrtí poloviny buněk. Výsledky ze *Scratch assay* testu odpovídají výsledkům z MTT testu, tedy s rostoucí koncentrací NPs ZnO viabilita buněčné linie NIH-3T3 a míra její migrace klesá.

Ačkoliv při počátečním snímkování byla variabilita hodnot ploch vytvořené rýhy u buněk Saos-2 menší než u 3T3, vzorky s buňkami Saos-2 prokazovaly statisticky významné rozdíly v ploše rýhy již při počátečním snímkování. V jednom ze tří prove-

dených experimentů byly hodnoty ve čtvrtém vzorku vyšší, což zvýšilo celkový rozdíl oproti ostatním vzorkům. S ohledem na mnohonásobné porovnání bylo zjištěno, že testované parametry byly ve vzorcích 1 a 4 odlišné od vzorků 2 a 3 se statistickou významností, ve vzorku 1 a 4 byla plocha rýhy o něco větší. Ve snímcích zhotovených 24 poté se hodnoty plochy rýhy v prvním až třetím vzorku statisticky neodlišují. Výrazně se od nich liší čtvrtý vzorek, který obsahuje ZnO NPs v koncentraci 50 µg/ml. Je ovšem nutné brát ohled na fakt, že při vytvoření rýhy nebyly hodnoty plochy rýhy stejné. Přestože se ve 24 hodinách zdají být první tři vzorky shodné, první vzorek měl při počátečním měření plochy rýhy větší rozměry, což naznačuje vyšší migraci buněk. Druhý a třetí vzorek vykazoval stejnou migraci buněk. Míru migrace ve čtvrtém vzorku nelze přesně určit, kvůli počátečnímu měření, zda je migrace buněk stejná nebo nižší než ve druhém či třetím vzorku. Míra migrace Soas-2 z 1-3. vzorku odpovídá viabilitám buněk z MTT testu, při působení NPs ZnO na buňky dochází k poklesu životaschopnosti, která se ovšem s narůstající koncentrací NPs ZnO výrazně nemění.

Scratch assay test může být náchylný k řadě chyb, které mohou ovlivnit přesnost a spolehlivost výsledků. Jednou z nich může být nekonzistentní šířka rýh, při vytvoření rýhy může dojít k poškození okolních buněk, špatná hustota buněk, špatná resuspendace buněk i nanočástic, nevhodné kultivační podmínky, nepřesné vyhodnocení snímků a další. . . Buňky Saos-2 v porovnání s NIH-3T3 byly na snímcích z 24 hodin v prvním vzorku, který neobsahoval nanočástice, méně konfluentní. Kdyby se pořídily snímky Saos-2 ještě po 48 hodinách, možná by byly rozdíly mezi jednotlivými vzorky více patrné. Pro přesnější určení plochy a šířky rýhy by bylo potřeba udělat snímky v časových intervalech ze stejného místa ve vzorku.

Pro přesnější porovnání chování NPs ZnO na nádorové (Saos-2) a nenádorové buněčné linii, by bylo vhodné zvolit nenádorovou buněčnou linii z lidských buněk, která by se dala lehce kultivovat v *in vitro* prostředí, např. HEK293, HUVEC, A549.

Výsledky práce jsou se studii obtížně porovnatelné z důvodu rozmanitosti zkoumané problematiky. Z hlediska využívaných nanočástic výzkumy pracují s jejich konkrétními typy, které mají různou velikost, odlišný způsob syntézy a mohou být modifikované. Navíc existuje celá škála používaných nádorových a nenádorových buněčných linií. Všechny tyto faktory ovlivňují konečný cytotoxický účinek konkrétních nanočástic na konkrétní buněčné linie, proto byly vybrány studie, které se s provedeným experimentem v těchto parametrech nejvíce shodovaly.

Ve studiích Chinnathambihlo a kol. [34] byly zkoumány účinky NPs ZnO, které byly syntetizovány prostřednictvím zelené syntézy využitím extraktu z listů byliny *Alhagi maurorum*. S využitím skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) byla zjištěna velikost nanočástic, 27,92 nm a jejich sférická morfologie. Výsledky studie prokazují, že ZnO NPs jsou antikarcinogenní vůči buněčným liniím osteosarkomu

(HOS, MG-63, G-292, klon A141B1, Saos-2, Hs 707 (A).T). Jejich protinádorový účinek je proporcionální k velikosti dávky, přičemž současně projevují minimální cytotoxicitou vůči lidským endotelovým buňkám z pupečnickové žíly (HUVEC). Za využití cytotoxického MTT testu byly testovány koncentrace NPs ZnO v rozsahu 0–1000 $\mu\text{g/ml}$. Výsledné IC_{50} se u buněčných linií osteosarkomu pohybovaly v rozmezí 419–550 $\mu\text{g/ml}$, u HUVEC byla IC_{50} na testované škále rovná 0 $\mu\text{g/ml}$. [34]

Bisht a kol. [35] zjišťovali cytotoxický efekt magneticky konjugovaných nanočástic ZnOFe_3O_4 a nanočástic ZnO. Oba typy nanočástic prokázaly selektivní cytotoxicitu vůči buněčné linii rakoviny prsu MDA-MB-231 bez výrazného vlivu na buňky NIH-3T3. Průměrná velikost částic byla $18,67 \pm 2,2$ nm pro ZnO NPs a $14,56 \pm 1,53$ nm pro Fe_3O_4 . Byl využit MTT test s koncentracemi NPs od 200 $\mu\text{g/ml}$ do 1,56 $\mu\text{g/ml}$, koncentrace byla vždy zředěna na polovinu, tento postup byl opakován 8x. Při stejných koncentracích NPs ZnOFe_3O_4 vykazovaly v porovnání s NPs ZnO vyšší cytotoxický efekt na MDA-MB-213 NPs ZnO a nižší cytotoxický efekt na NIH-3T3. Díky magnetickému Fe_3O_4 lze nanočástice zaměřit na nádorovou tkáň pomocí vnějšího magnetického pole. NPs ZnOFe_3O_4 mohou sloužit jako vysoce selektivní nanočástice pro cílenou léčbu rakoviny, ale je nutné provést další výzkum, aby došlo k plnému porozumění jejich chování v *in vivo* podmínkách. [35]

Závěr

Bakalářská práce se zabývala problematikou vlivu nanočástic oxidu zinečnatého na životaschopnost a migraci buněk. Konkrétně byla zkoumána jejich účinnost na dvou buněčných liniích: na buňkách NIH-3T3 z myších fibroblastů a na buněčné linii z lidského osteosarkomu Saos-2.

Práce byla rozdělena do dvou hlavních částí - teoretické a praktické. První bod teoretické části se zabýval popisem a aplikací NP ZnO, následně se zaměřil na jejich využití v medicíně, ve které představují obrovský potenciál zejména v terapii nádorových onemocnění. Dále jsou v teoretické části představeny jednotlivé metody pro hodnocení cytotoxicity klasifikující se podle prostředí, ve kterém probíhají na *in vivo* a *in vitro*. Dále byla popsána metoda *Scratch assay*, pomocí které lze určit míru migrace buněk. Posledním bodem byla charakterizace dvou buněčných linií, fibroblastických NIH-3T3 a nádorových Saos-2, které jsou využity v praktické části.

V praktické části byly podrobně popsány postupy kultivace a pasážování buněk, stejně jako dva hlavní experimentální testy: cytotoxický MTT test a *Scratch assay*. MTT test byl použit k určení míry cytotoxicity NPs ZnO. Výsledkem je hodnota absorbance, která se používá k určení míry životaschopnosti buněk v závislosti na použitých koncentracích nanočástic. Z těchto hodnot byla vypočítána hodnota IC_{50} , což je koncentrace potřebná k usmrcení 50 % buněk. Životaschopnost buněk NIH-3T3 klesala s přibývajícím koncentrací NPs ZnO, zatímco u Saos-2 viabilita buněk v prvním vzorku obsahujícím NPs ZnO mírně poklesla, ale následně se zvyšující se koncentrací se už výrazně neměnila. Takže NPs ZnO vykazují vyšší míru cytotoxicity vůči NIH-3T3, což se neshodovalo s teoretickou znalostí, která poukazuje na vyšší cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám. Cytotoxický efekt NPs ZnO tedy závisí na specifických vlastnostech buněčných typů v kombinaci s charakteristickými vlastnostmi nanočástic.

Míra migrace buněk po expozici NPs ZnO byla sledována pomocí *Scratch assay*. Zvolené koncentrace NPs vycházely z MTT testu, nejvyšší testovaná koncentrace odpovídala hodnotě IC_{50} pro NIH-3T3 buňky, ostatní koncentrace byly menší a jeden vzorek byl kontrolní. Vzorky byly snímány ve 2 časových intervalech (0 a 24h) a snímky byly následně zpracovány pomocí softwaru ImagineJ, který umožnil určit plochu, popřípadě šířku vytvořené rýhy. Nakonec byly hodnoty plochy rýhy vyhodnoceny statistickými testy. U buněk NIH-3T3 byla rychlost zacelení rýhy u vzorků s NPs ZnO v daných koncentracích v souladu se životaschopností buněk zjištěnou pomocí MTT testu, tedy roustoucí koncentrace NPs ZnO má negativní vliv na migraci buněk. Vzorky 1-3 s buňkami Saos-2 také odpovídaly výsledkům MTT testu, u 4. vzorku s nejvyšší koncentrací NPs nelze míra migrace s jistotou určit kvůli větší ploše rýhy na počátečním vzorcích.

Literatura

- [1] KRÓL, A.; POMASTOWSKI, P.; RAFIŃSKA, K.; RAILEAN-PLUGARU, V. a BUSZEWSKI, B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. Online. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017, no. 249, s. 37-52. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.033>. [cit. 2023-11-12].
- [2] JIANG, Jinhuan; PI, Jiang a CAI, Jiye. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. Online. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2018, vol. 2018, s. 1-18. ISSN 1565-3633. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2018/1062562>. [cit. 2023-11-20].
- [3] BISHT, Gunjan a RAYAMAJHI, Sagar. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent: A Promising Anticancer Agent. Online. *Nanobiomedicine*. 2016, vol. 3, s. 1-11. ISSN 1849-5435. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/63437>. [cit. 2023-11-12].
- [4] WIESMANN, Nadine; TREMEL, Wolfgang a BRIEGER, Juergen. Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine. Online. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020, vol. 8, no. 23, s. 4973-4989. ISSN 2050-750X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0TB00739K>. [cit. 2023-11-18].
- [5] SIRELKHATIM, Amna; MAHMUD, Shahrom; SEENI, Azman; KAUS, Noor Haida Mohamad; ANN, Ling Chuo et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. Online. *Nano-Micro Letters*. 2015, vol. 7, no. 3, s. 219-242. ISSN 2311-6706. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>. [cit. 2023-11-18].
- [6] RASMUSSEN, John W; MARTINEZ, Ezequiel; LOUKA, Panagiota a WINGETT, Denise G. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. Online. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2010, vol. 7, no. 9, s. 1063-1077. ISSN 1742-5247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.502560>. [cit. 2023-11-20].
- [7] HAGHNIJAZ, Reihaneh; RABBANI, Atiya; VAJHADIN, Fereshteh; KHAN, Taous; KOUSAR, Rozina et al. Anti-bacterial and wound healing-promoting effects of zinc ferrite nanoparticles. Online. *Journal of Nanobiotechnology*. 2021, vol. 19, no. 1, s. 1-15. ISSN 1477-3155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00776-w>. [cit. 2023-10-15].

- [8] ANJUM, Sumaira; HASHIM, Mariam; MALIK, Sara Asad; KHAN, Maha; LORENZO, José M. et al. Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. Online. *Cancers*. 2021, vol. 13, no. 18, s. 1-31. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers13184570>. [cit. 2023-10-20].
- [9] SINGH, Th. Abhishek; DAS, Joydeep a SIL, Parames C. Zinc oxide nanoparticles: : A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks: A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks. Online. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020, vol. 286, s. 1-20. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102317>. [cit. 2023-11-12].
- [10] BYRNE, James D.; BETANCOURT, Tania a BRANNON-PEPPAS, Lisa. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, vol. 60, no. 15, s. 1615-1626. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.005>. [cit. 2023-11-25].
- [11] ASLANTÜRK, Özlem Sultan. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. Online. In: *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. IntechOpen, 2017, s. 1-17. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/326376663_In_Vitro_Cytotoxicity_and_Cell_Viability_Assays_Principles_Advantages_and_Disadvantages. [cit. 2023-10-28].
- [12] KUS-LIŚKIEWICZ, Małgorzata; FICKERS, Patrick a BEN TAHAR, Imen. Biocompatibility and Cytotoxicity of Gold Nanoparticles: Recent Advances in Methodologies and Regulations: Recent Advances in Methodologies and Regulations. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, vol. 22, no. 20, s. 1-21. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms222010952>. [cit. 2023-11-28].
- [13] KUMAR, Vinay; SHARMA, Neha a MAITRA, S. S. In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles. Online. *International Nano Letters*. 2017, vol. 7, no. 4, s. 243-256. ISSN 2008-9295. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40089-017-0221-3>. [cit. 2023-11-26].
- [14] RISS, Terry; NILES, Andrew a MORAVEC, Rich et al. *Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells*. Online. Eli Lilly Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2019. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/>. [cit. 2023-12-01].

- [15] KAMILOGLU, Senem; SARI, Gulce; OZDAL, Tugba a CAPANOGLU, Esra. Guidelines for cell viability assays. Online. *Food Frontiers*. 2020, vol. 1, no. 3, s. 332-349. ISSN 2643-8429. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/fft2.44>. [cit. 2023-11-28].
- [16] *Trypan Blue / Properties, Uses and Side effects*. Online. MACSENLABS. Dostupné z: <https://www.macsenlab.com/blog/trypan-blue-properties-uses-side-effects/>. [cit. 2024-01-03].
- [17] *Cell Viability Assay: Neutral Red Uptake Assay Protocol*. Online. ResearchTweet. 2023. Dostupné z: <https://researchtweet.com/cell-viability-assay-neutral-red-uptake-assay/>. [cit. 2024-05-24].
- [18] FOTAKIS, George a TIMBRELL, John A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Online. *Toxicology Letters*. 2006, vol. 160, no. 2, s. 171-177. ISSN 03784274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>. [cit. 2023-11-27].
- [19] KALANTZI, Olga-Ioanna a BISKOS, George. Methods for Assessing Basic Particle Properties and Cytotoxicity of Engineered Nanoparticles. Online. *Toxics*. 2014, vol. 2, no. 1, s. 79-91. ISSN 2305-6304. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/toxics2010079>. [cit. 2023-11-28].
- [20] STOCKERT, Juan C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, Alfonso; CAÑETE, Magdalena; HOROBIN, Richard W. a VILLANUEVA, Ángeles. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Online. *Acta Histochemica*. 2012, vol. 114, no. 8, s. 785-796. ISSN 00651281. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>. [cit. 2024-05-22].
- [21] PARHAMIFAR, Ladan; ANDERSEN, Helene a MOGHIMI, S. Moein. Lactate Dehydrogenase Assay for Assessment of Polycation Cytotoxicity. Online. *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery*. Methods in Molecular Biology. 2013, vol. 948, s. 13-22. ISBN 978-1-62703-139-4. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/232256455_Lactate_Dehydrogenase_Assay_for_Assessment_of_Polycation_Cytotoxicity/. [cit. 2023-10-29].

- [22] CLARKE, Joanne M.; GILLINGS, Michael R.; ALTAVILLA, Nanda a BEATTIE, Andrew J. Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. Online. *Journal of Microbiological Methods*. 2001, vol. 46, no. 3, s. 261-267. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00285-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00285-8). [cit. 2024-05-25].
- [23] CROUCH, S.P.M.; KOZLOWSKI, R.; SLATER, K.J. a FLETCHER, J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. Online. *Journal of Immunological Methods*. 1993, vol. 160, no. 1, s. 81-88. ISSN 00221759. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90011-U](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90011-U). [cit. 2023-12-03].
- [24] LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y a GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Online. *Nature Protocols*. 2007, vol. 2, no. 2, s. 329-333. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>. [cit. 2023-10-27].
- [25] JONKMAN, James E. N.; CATHCART, Judith A.; XU, Feng; BARTOLINI, Miria E.; AMON, Jennifer E. et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. Online. *Cell Adhesion Migration*. 2014, vol. 8, no. 5, s. 440-451. ISSN 1933-6918. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/cam.36224>. [cit. 2024-01-03].
- [26] RAHIMI, Amir Mohammad; CAI, Mingfang a HOYER-FENDER, Sigrid. Heterogeneity of the NIH3T3 Fibroblast Cell Line. Online. *Cells*. 2022, vol. 11, no. 17, s. 1-19. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells11172677>. [cit. 2023-10-26].
- [27] *NIH3T3 Cell Line*. Online. Dostupné z: <https://nih3t3.com/>. [cit. 2024-01-02].
- [28] MUKHOPADHYAY, R., 2015. *Generating the 3T3 cell line, the oncogene hypothesis and horses*. Online. ASBMBTODAY. Dostupné z: <https://www.asbmb.org/asbmb-today/people/010115/generating-the-3t3-cell-line>. [cit. 2024-01-02].
- [29] PAUTKE, Christoph; SCHIEKER, Matthias a TISCHER, Thomas et al. Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts. Online. *Anticancer Research*. 2004, vol. 24, no. 6,

- s. 3743—3748. ISSN 02507005. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15736406/>. [cit. 2023-10-26].
- [30] RODAN, Sevgi B.; IMAI, Yasui; THIEDE, Mark A. a WESOLOWSKI, Gregg et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. Online. *Cancer research*. 1987, vol. 47, no. 18, s. 4961—4966. Dostupné z: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/47/18/4961/491558/Characterization-of-a-Human-Osteosarcoma-Cell-Line>. [cit. 2023-11-11].
- [31] HAUSSER, Heinz-Juergen a BRENNER, Rolf E. Phenotypic instability of Saos-2 cells in long-term culture. Online. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, vol. 333, no. 1, s. 216-222. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.097>. [cit. 2024-01-02].
- [32] *Počítání buněk*. Online. Dostupné z: http://www.rustreg.upol.cz/_materials/bubcv/BUBCV4.pdf. [cit. 2024-01-02].
- [33] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019 [cit. 2024-05-27].
- [34] CHINNATHAMBI, Arunachalam a ALAHMADI, Tahani Awad. Zinc nanoparticles green-synthesized by Alhagi maurorum leaf aqueous extract: Chemical characterization and cytotoxicity, antioxidant, and anti-osteosarcoma effects. Online. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021, vol. 14, no. 4, s. 1-11. ISSN 1878-5352. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103083>. [cit. 2024-12-31].
- [35] BISHT, Gunjan; RAYAMAJHI, Sagar; KC, Biplab; PAUDEL, Siddhi Nath; KARNA, Deepak et al. Synthesis, Characterization, and Study of In Vitro Cytotoxicity of ZnO-Fe₃O₄ Magnetic Composite Nanoparticles in Human Breast Cancer Cell Line (MDA-MB-231) and Mouse Fibroblast (NIH 3T3). Online. *Nanoscale Research Letters*. 2016, vol. 11, no. 1, s. 1-11. ISSN 1931-7573. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1734-9>. [cit. 2024-12-31].

Seznam symbolů a zkratek

ATP	adenosintrifosfát – adenosine triphosphate
DDS	cílený transport léčiv – drug delivery system
DLS	Dynamický rozptyl světla – dynamic light scattering
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eagleho médium – Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxid
ECM	extracelulární matrix – extracellular matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová – ethylenediaminetetraacetic acid
EPR	efekt zvýšené permeability a retence – enhanced permeability and retention effect
FBS	fetální bovinní sérum – fetal bovine serum
FDA	fluorescein diacetát – fluorescein diacetate
GF-AFC	glycylfenylalanyl-aminofluorokumarin
GRAS	látka označovaná jako bezpečná – generally recognized as safe
HUVEC	lidské endotelové buňky z pupečnickové žíly – human umbilical vein endothelial cells
IC₅₀	inhibiční koncentrace – half maximal inhibitory concentration
INT	2-(4-iodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-fenyltetrazolium chlorid
LDH	laktátdehydrogenáza – lactate dehydrogenase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difentyltetrazolium bromid
NADH/H⁺	nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma)/(oxidovaná forma)
NIH-3T3	buňky myších fibroblastů – mouse fibroblast cell line
NPs	nanočástice – nanoparticles
NRU	příjem neutrální červeně – neutral red uptake

PBS	fosfátový pufr – phosphate buffered saline
PTH receptor	receptor pro parathormon – parathyroid hormone receptor
ROS	reaktivní forma kyslíku – reactive oxygen species
Saos-2	buňky osteosarkomu – osteosarcoma cell line
SHMP	hexametafosfát sodný – sodium hexametaphosphate
ZnO	oxid zinečnatý – zinc oxide

A Příloha: Tabulky s výslednými parametry

Scratch assay

A.1 Buněčná linie NIH-3T3

Tab. A.1: Tabulka shrnující analyzované parametry z prvního experimentu. Parametry byly analyzovány ze snímků s NIH-3T3 buňkami ze dvou časových intervalů (0 a 24 hodin).

NIH-3T3, 1.		0 hodin			24 hodin	
miska	snímek z rýhy	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]	šířka rýhy [μm]	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]
1	1	580643,542	49,999	626,140	34555,636	2,976
	2	581193,366	50,047	623,046	64858,019	5,585
	3	605319,256	52,124	647,990	78523,773	6,762
	4	619030,833	53,305	663,977	79599,471	6,854
	5	698806,137	60,174	742,632	83704,448	7,208
2	1	566145,662	48,751	610,387	42631,594	3,671
	2	591887,421	50,967	633,616	45621,380	3,928
	3	592495,210	51,020	634,149	48997,186	4,219
	4	600609,419	51,718	638,050	60812,276	5,237
	5	615716,768	53,019	657,828	82328,423	7,089
3	1	624217,408	53,751	669,151	94274,138	8,118
	2	645122,481	55,552	690,909	113680,049	9,789
	3	670367,341	57,725	698,898	119328,225	10,275
	4	693321,758	59,702	715,529	124114,494	10,688
	5	696318,593	59,960	736,706	170943,893	14,720
4	1	597012,251	51,409	640,672	145133,650	12,497
	2	616102,359	53,053	661,222	195190,673	16,808
	3	638301,135	54,964	683,647	200355,390	17,253
	4	657234,990	56,595	704,140	250952,473	21,610
	5	695665,965	59,904	712,467	255466,140	21,998

Tab. A.2: Tabulka shrnující analyzované parametry ze druhého experimentu. Parametry byly analyzovány ze snímků s NIH-3T3 buňkami ze dvou časových intervalů (0 a 24 hodin).

NIH-3T3, 2.		0 hodin			24 hodin	
miska	snímek z rýhy	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]	šířka rýhy [μm]	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]
1	1	701058,777	60,368	826,206	15832,276	1,363
	2	713183,047	61,412	807,978	22973,667	1,978
	3	763298,097	65,727	748,098	27043,779	2,329
	4	771052,758	66,395	750,472	38314,503	3,299
	5	772870,663	66,552	818,320	40814,955	3,515
2	1	603238,151	51,945	725,55575	52863,580	4,552
	2	648273,153	55,823	674,419	37815,922	3,256
	3	688548,916	59,291	728,485	64187,233	5,527
	4	797923,568	68,709	841,154	89582,799	7,714
	5	840988,774	72,417	662,915	92378,114	7,955
3	1	680936,647	58,635	722,848	55992,82	4,822
	2	695014,073	59,847	745,044	87552,784	7,539
	3	769514,175	66,263	741,809	107654,266	9,270
	4	771666,427	66,448	827,668	110571,389	9,521
	5	787800,338	67,837	842,400	148421,758	12,781
4	1	491907,661	42,358	526,730	252384,363	21,733
	2	482486,307	41,547	531,328	280868,432	24,186
	3	526095,877	45,302	564,447	285572,372	24,591
	4	581059,795	50,035	618,495	381500,600	32,851
	5	590720,988	50,867	628,493	406597,949	35,012

Tab. A.3: Tabulka shrnující analyzované parametry ze třetího experimentu. Parametry byly analyzovány ze snímků s NIH-3T3 buňkami ze dvou časových intervalů (0 a 24 hodin).

NIH-3T3, 3.		0 hodin			24 hodin	
miska	snímek z rýhy	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]	šířka rýhy [μm]	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]
1	1	578942,405	49,853	621,709	2109,821	0,182
	2	586118,260	50,470	628,179	2700,387	0,233
	3	651963,988	56,140	698,315	6192,956	0,533
	4	668666,205	57,579	711,855	20784,872	1,790
	5	689536,835	59,376	732,974	22533,469	1,940
2	1	641121,661	55,207	686,216	27274,794	2,349
	2	714333,939	61,511	765,851	27350,823	2,355
	3	741973,411	63,891	793,636	37071,626	3,192
	4	747786,676	64,392	796,014	52389,361	4,511
	5	765890,125	65,951	799,808	58052,237	4,999
3	1	599802,535	51,649	643,780	30586,748	2,634
	2	633094,819	54,516	681,479	32335,763	2,784
	3	640577,717	55,160	685,900	34248,168	2,949
	4	646068,397	55,633	690,464	45599,965	3,927
	5	677950,208	58,378	726,011	52382,222	4,511
4	1	678742,811	58,446	690,928	290815,637	25,042
	2	687621,062	59,211	731,824	381666,934	32,865
	3	733447,569	63,157	759,333	398044,831	34,276
	4	772934,508	66,557	798,667	428307,730	36,882
	5	824053,859	70,959	865,324	580750,883	50,008

A.2 Buněčná linie Saos-2

Tab. A.4: Tabulka shrnující analyzované parametry z prvního experimentu. Parametry byly analyzovány ze snímků s buňkami Saos-2 ze dvou časových intervalů (0 a 24 hodin).

Saos-2, 1.		0 hodin			24 hodin	
miska	snímek z rýhy	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]	šířka rýhy [μm]	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]
1	1	504256,649	43,421	546,548	311380,415	26,813
	2	505485,303	43,527	589,823	330220,122	28,435
	3	510401,741	43,951	547,439	339083,223	29,198
	4	510775,571	43,983	549,819	346091,041	29,802
	5	512543,492	44,135	547,270	370421,830	31,897
2	1	482834,935	41,577	522,367	326667,909	28,129
	2	482679,103	41,563	522,241	338982,415	29,190
	3	485523,570	41,808	525,830	346479,991	29,835
	4	485993,588	41,849	518,881	361165,580	31,100
	5	489785,651	42,175	529,550	375092,168	32,299
3	1	487720,346	41,997	524,241	308736,311	26,585
	2	492799,393	42,435	534,674	326115,147	28,082
	3	493824,695	42,523	530,526	334501,511	28,804
	4	496512,910	42,755	538,816	347284,772	29,905
	5	500846,816	43,128	537,586	351165,450	30,239
4	1	452918,265	39,001	496,291	343925,775	29,615
	2	464955,550	40,037	523,017	355652,655	30,625
	3	467000,508	40,213	499,691	368903,833	31,766
	4	506020,844	43,573	577,191	390212,910	33,601
	5	516536,352	44,479	540,302	459839,978	39,597

Tab. A.5: Tabulka shrnující analyzované parametry ze druhého experimentu. Parametry byly analyzovány ze snímků s buňkami Saos-2 ze dvou časových intervalů (0 a 24 hodin).

Saos-2, 2.		0 hodin			24 hodin	
miska	snímek z rýhy	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]	šířka rýhy [μm]	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]
1	1	493836,876	42,524	528,542	134475,428	11,580
	2	505213,066	43,504	540,629	152644,343	13,144
	3	511575,735	44,052	547,467	153987,189	13,260
	4	530674,243	45,696	567,951	162212,258	13,968
	5	554789,633	47,773	592,993	162594,067	14,001
2	1	433681,342	37,344	465,091	162329,867	13,978
	2	444248,548	38,254	474,855	167410,159	14,416
	3	466899,280	40,205	498,860	174300,786	15,009
	4	474173,002	40,831	508,479	186445,599	16,055
	5	480217,286	41,351	513,551	193707,116	16,680
3	1	480373,958	41,365	514,261	166656,200	14,351
	2	481184,623	41,435	513,941	173130,997	14,908
	3	486699,664	41,910	520,977	188011,061	16,190
	4	489862,518	42,182	524,247	191754,806	16,512
	5	491676,643	42,338	525,811	215298,876	18,539
4	1	538042,893	46,331	576,074	319657,991	27,526
	2	547077,816	47,109	586,477	334598,958	28,812
	3	548717,207	47,250	587,379	361755,304	31,151
	4	552073,696	47,539	592,635	380090,132	32,730
	5	554254,090	47,727	599,339	381934,074	32,888

Tab. A.6: Tabulka shrnující analyzované parametry ze třetího experimentu. Parametry byly analyzovány ze snímků s buňkami Saos-2 ze dvou časových intervalů (0 a 24 hodin).

Saos-2, 3.		0 hodin			24 hodin	
miska	snímek z rýhy	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]	šířka rýhy [μm]	plocha rýhy [μm^2]	plocha rýhy [%]
1	1	486028,871	41,852	519,160	149414,296	12,866
	2	488844,356	42,094	523,314	166708,283	14,355
	3	492415,062	42,402	527,118	173919,397	14,976
	4	493802,013	42,521	529,997	200837,164	17,294
	5	494979,367	42,623	529,725	207124,888	17,836
2	1	421347,055	36,282	461,894	131210,938	11,299
	2	442410,481	38,096	535,593	141773,908	12,208
	3	447778,930	38,558	478,753	177822,338	15,312
	4	463863,277	39,943	497,210	237591,668	20,459
	5	471292,412	40,583	504,280	338387,651	29,139
3	1	454766,189	39,160	486,860	158614,684	13,658
	2	457065,453	39,358	491,710	169502,339	14,596
	3	457765,229	39,418	491,879	176073,322	15,162
	4	459945,624	39,606	492,290	180642,854	15,555
	5	460575,674	39,660	495,957	233053,660	20,068
4	1	462995,908	39,868	496,712	273150,759	23,521
	2	464567,253	40,004	499,366	309988,008	26,693
	3	466951,364	40,209	504,971	324996,601	27,985
	4	490164,942	42,208	524,570	335730,945	28,910
	5	512374,639	44,120	548,375	338120,089	29,116