



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

APLIKACE FLUORESCENČNÍHO ZNAČENÍ PRO „SCRATCH WOUND HEALING ASSAY“ EXPERIMENT

APPLICATION OF FLUORESCENCE STAINING FOR THE "SCRATCH WOUND HEALING ASSAY"
EXPERIMENT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Inna Zumberg

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Larisa Baiazitova

BRNO 2018

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Inna Zumberg

ID: 185961

Ročník: 3

Akademický rok: 2017/18

NÁZEV TÉMATU:

Aplikace fluorescenčního značení pro „Scratch Wound Healing Assay“ experiment

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Nastudujte kultivaci buněčné linie 3T3. 2) Seznamte se s metodou „Scratch Wound Healing Assay“. 3) Kultivaci buněk ověřte v buněčné laboratoři. 4) Navrhněte experiment s použitím fluorescenčního nebo konfokálního mikroskopu. 5) Navržený experiment otestujte s dostatečným počtem opakování. 6) Provedte sběr mikroskopických dat. Ve vhodném programovém prostředí statisticky zpracujte nasnímaná data. 7) Dosažené výsledky vhodně prezentujte a proveďte diskuzi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] RODRIGUEZ, Luis G.; WU, Xiaoyang; GUAN, Jun-Lin. Wound-healing assay. Cell Migration: Developmental Methods and Protocols, 2005, 23-29.

[2] FRONZA, M., et al. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. Journal of ethnopharmacology, 2009, 126.3: 463-467.

Termín zadání: 5.2.2018

Termín odevzdání: 25.5.2018

Vedoucí práce: Larisa Baiazitova

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

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

Tato bakalářská práce se zabývá studiem kultivace buněčné linie 3T3 (myší embryonální fibroblastové buňky) a migrace buněk. Pro studium migrace buněk byla použita metoda *Scratch Wound Healing Assay*. Na konkrétních příkladech byly ukázány základní zásady provedení experimentu, jeho výhody a nevýhody a také praktické použití metody ve vědeckém výzkumu. V praktické části bakalářské práce je popsáno provedení experimentu v buněčné laboratoři včetně kultivace buněk 3T3. Navržený experiment byl testován s dostatečným počtem opakování. Statistické zpracování mikroskopických snímků bylo provedeno v programovém prostředí MATLAB.

KLÍČOVÁ SLOVA

Buněčná linie 3T3, *Scratch Wound Healing Assay* experiment, Buněčná migrace, Kultivace buněk.

ABSTRACT

This bachelor's thesis studies the cell culture of 3T3 cell line (mouse embryonic fibroblast cells) and cell migration. The Scratch Wound Healing Assay was used for the study of cell migration. The basic principles of experimenting, its advantages and disadvantages, as well as the practical use of this method in scientific research were presented on specific examples. Practical part of the bachelor's thesis describes the experiment in the cell laboratory including cell culture of 3T3 cell line. The proposed experiment was tested with a sufficient number of repetitions. The statistical processing of microscopic images was performed in the MATLAB programming environment.

KEYWORDS

3T3 cell line, Scratch Wound Healing Assay, Cell migration, Cell culture.

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

ZUMBERG, I. *Aplikace fluorescenčního značení pro „Scratch Wound Healing Assay“ experiment.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2018. 57 s. Vedoucí bakalářské práce Larisa Baiazitova.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma „Aplikace fluorescenčního značení pro „Scratch Wound Healing Assay“ experiment“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědomá následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákoníku č. 140/1961 Sb.

V Brně dne

.....

podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Larise Baiazitové za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování bakalářské práce.

V Brně dne

.....

podpis autora

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	1
SEZNAM TABULEK	3
ÚVOD	4
1 BUNĚČNÁ LINIE 3T3	5
2 KULTIVACE BUNĚK	6
2.1 Zásady kultivace buněk	6
2.1.1 Kultivační podmínky	6
2.1.2 Kultivační médium	7
2.1.3 Použití fosfátového pufru (PBS)	8
2.1.4 Antibiotika	9
2.1.5 Pasážování	9
2.1.6 Určení počtu buněk	9
3 BUNĚČNÁ MIGRACE	10
4 SCRATCH WOUND HEALING ASSAY EXPERIMENT	11
4.1 Metody provedení Scratch Wound Healing Assay experimentu	12
4.2 Stanovení účinku extraktů z léčivých bylin v experimentu Scratch Wound Healing Assay	13
4.3 High Throughput Migration Assay experiment	15
4.4 Použití metody High Throughput Migration Assay za účelem testování inhibice buněčné migrace	16
5 BARVIVA PRO FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPII	18
5.1 Kalcein	18
5.2 CellTracker TM Green CMFDA	20
5.3 Nanočástice značené rhodaminem	20

6 PRAKTICKÁ ČÁST	22
6.1 Použité přístroje a pomůcky	22
6.2 Kultivační médium a ostatní roztoky	23
6.3 Kultivace a pasážování buněk	23
6.4 Provedení experimentu s použitím fluorescenčního značení buněk	26
6.4.1 Barvení buněk kalceinem	26
6.4.2 Barvení buněk CellTracker™ Green CMFDA	29
6.4.3 Barvení buněk pomocí značených nanočástic.....	31
6.5 Popis algoritmu navrženého v programovém prostředí MATLAB	33
6.6 Výsledky získané v průběhu Scratch Wound Healing Assay experimentu ..	37
6.6.1 Aplikace algoritmu na tři sérií snímků.....	37
6.6.2 Aplikace algoritmu na dvě sérií snímků.....	41
7 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ EXPERIMENTU	44
7.1 Hodnocení vlivu barviv na rychlost buněčné migrace	44
7.2 Analýza rozdílu mezi detekcemi hranice rýhy ve dvou polích	47
8 ZÁVĚR	52
9 LITERATURA	54

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Buněčná linie 3T3 [5].....	5
Obr. 2 Howard Green a George Todaro (zleva doprava) [7] [8]	5
Obr. 3 Kultivační láhve (s uzávěrem bez filtru) z polystyrénu [10]	7
Obr. 4 Dulbeccovo modifikované Eagleho médium (DMEM) [14].....	8
Obr. 5 Migrace buňky po podkladu: (A) polymerace aktinu na přední straně (B) exocytóza váčků na přední straně [19].....	10
Obr. 6 Scratch Wound Healing Assay experiment: (A) na začátku testu (B) po 24 hodinách [21].....	11
Obr. 7 Heřmánek pravý, měsíček lékařský, třezalka tečkovaná (zleva doprava) [24] [25].....	14
Obr. 8 Snímky pořízené fluorescenčním mikroskopem: (A) na začátku testu (B) kontrolní skupina po 12 hodinách (C) pozitivní kontrola po 12 hodinách (D) buňky s přidáním 10 µg/ml hexanového extraktu z měsíčku lékařského po 12 hodinách [23].....	15
Obr. 9 High Throughput Migration Assay experiment [27].....	16
Obr. 10 Postup provedení High Throughput Migration Assay experimentu s použitím degradabilního hydrogelu [28]	17
Obr. 11 Migrace fibroblastů bez přidaného inhibitoru (zleva) a v přítomnosti inhibitoru GPCR [28]	17
Obr. 12 Excitační a emisní spektrum kalceinu-AM [31].....	19
Obr. 13 Konverze kalceinu-AM na kalcein uvnitř buňky [30].....	19
Obr. 14 Excitační a emisní spektrum fluoresceinu [33]	20
Obr. 15 Excitační a emisní spektrum SPIO-rhodamin nanočástic [35].....	21
Obr. 16 Misky s nakreslenou mřížkou.....	25
Obr. 17 Bürkerova komůrka [38]	25
Obr. 18 Snímky buněk 3T3 ve světelném poli (vlevo), ve fluorescenčním poli (vpravo): (A) na začátku testu (B) po 18 hodinách (C) po 26 hodinách. Barvivo – kalcein.....	27

Obr. 19 Intenzita fluorescence buněk (A) hned po obarvení (B) po 6 hodinách inkubace	28
Obr. 20 Snímky buněk 3T3 ve světelném poli (vlevo), ve fluorescenčním poli (vpravo): (A) na začátku testu (B) po 17 hodinách (C) po 40 hodinách. Barvivo – CMFDA	30
Obr. 21 Snímky buněk 3T3 ve světelném poli (vlevo), ve fluorescenčním poli (vpravo): (A) na začátku testu (B) po 17 hodinách (C) po 40 hodinách. Barvivo – SPIO-R nanočástice	32
Obr. 22 Navržený algoritmus v programovém prostředí MATLAB	33
Obr. 23 Převod snímků do binární podoby	35
Obr. 24 Vyplnění děr v snímcích	35
Obr. 25 Kreslení detekované hranice rýhy	36
Obr. 26 Porovnání detekcí ve dvou polích. Hranice která byla detekována ve fluorescenčním poli je červená, ve světelném poli je zelená.....	36
Obr. 27 Krabicový diagram (boxplot). Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy – 17 hodin. Výběrová skupina – tři sérií snímků	46
Obr. 28 Jednofaktorová analýza rozptýlu (one-way ANOVA). Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy – 17 hodin. Výběrová skupina – tři sérií snímků	47
Obr. 29 Porovnání detekce rýhy ve fluorescenčním poli (vlevo) a světelném poli (vpravo). Barvivo – CMFDA	47
Obr. 30 Porovnání detekce rýhy ve fluorescenčním poli (vlevo) a světelném poli (vpravo). Barvivo – SPIO-R nanočástice	48
Obr. 31 Krabicové diagramy (boxploty). Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy – 0 hodin (vlevo), 17 hodin (vpravo). Výběrová skupina – tři sérií snímků. Barvivo – CMFDA. Na levém boxplotu je patrný rozdíl středních hodnot šířky rýhy ve dvou polích	50
Obr. 32 Krabicový diagram (boxplot). Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy – 0 hodin. Výběrová skupina – dvě sérií snímků. Barvivo – SPIO-R nanočástice.....	51

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Scratch Wound Healing Assay experiment: tři sérií snímků, buňky bez barvení	37
Tab. 2 Scratch Wound Healing Assay experiment: tři sérií snímků, buňky obarvené CMFDA.....	38
Tab. 3 Scratch Wound Healing Assay experiment: tři sérií snímků, buňky obarvené SPIO-R nanočásticemi	39
Tab. 4 Scratch Wound Healing Assay experiment: dvě sérií snímků, buňky bez barvení	41
Tab. 5 Scratch Wound Healing Assay experiment: dvě sérií snímků, buňky obarvené CMFDA.....	42
Tab. 6 Scratch Wound Healing Assay experiment: dvě sérií snímků, buňky obarvené SPIO-R nanočásticemi	43
Tab. 7 F-test (tři sérií snímků)	45
Tab. 8 F-test (dvě sérií snímků).....	45
Tab. 9 One-way ANOVA (tři sérií snímků)	46
Tab. 10 One-way ANOVA (dvě sérií snímků).....	46
Tab. 11 Srovnání detekcí hranice rýhy ve dvou polích (tři sérií snímků). Barvivo – CMFDA.....	49
Tab. 12 Srovnání detekcí hranice rýhy ve dvou polích (dvě sérií snímků). Barvivo – CMFDA.....	49
Tab. 13 Srovnání detekcí hranice rýhy ve dvou polích (tři sérií snímků). Barvivo – SPIO-R nanočástice	50
Tab. 14 Srovnání detekcí hranice rýhy ve dvou polích (dvě sérií snímků). Barvivo – SPIO-R nanočástice	51

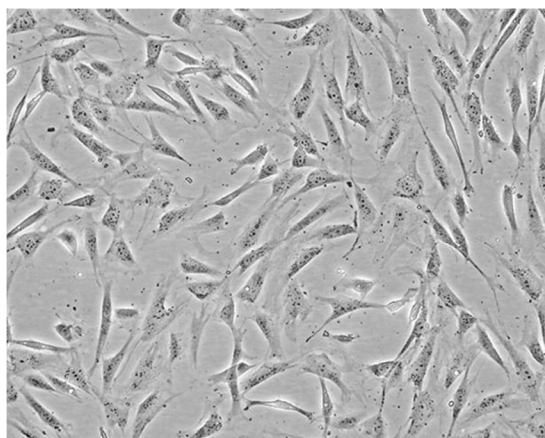
ÚVOD

Buněčná migrace a invazivita hrají podstatnou úlohu v řadě biologických procesů, jako je např. embryogeneze, imunitní odpověď, hojení ran, morfogeneze či zánět. Ke studiu buněčné migrace je v dnešní době využíváno mnoho různých metod. Pro studium migrace jsou nejčastěji užívány in vitro modelové systémy na bázi buněčných linií, nicméně podmínky, ve kterých buňky migrují, jsou zde značně zjednodušeny, a výsledky proto nemusí plně odpovídat skutečnému chování v organismu. [1]

Nejčastěji používanými metodami jsou in vitro testy. *Scratch Wound Healing Assay* je jednoduchá a levná metoda pro měření in vitro migrace buněk. Základní kroky zahrnují vytvoření "rýhy" v buněčné monovrstvě, snímání mikroskopem na začátku a v pravidelných intervalech během migrace buněk a porovnání snímků za účelem kvantifikace rychlosti migrace buněk. Ve srovnání s jinými metodami je *Scratch Wound Healing Assay* zvláště vhodná pro studium účinků mezibuněčných interakcí (cell-cell interactions) na buněčnou migraci. Metoda je vhodná ke studiu procesu hojení mechanických poranění. Ve vztahu k metastazování nádorových buněk lze tuto metodu např. využít k základnímu studiu prometastatických genů a proteinů i jejich vlivu na migrační schopnost buněk. [1] [2]

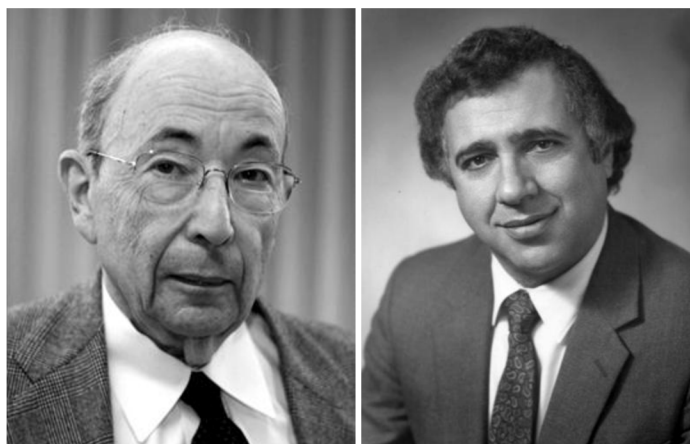
1 BUNĚČNÁ LINIE 3T3

NIH 3T3 myší embryonální fibroblastové buňky byly iniciovány z buněčné linie izolované v roce 1962 na Oddělení patologie Lékařské fakulty (New York University). Název "3T3" pochází z anglického "3-day transfer, inoculum $3 \cdot 10^5$ cells". Tato buněčná linie byla původně vytvořena z primárních myších embryonálních fibroblastových buněk, které byly kultivovány podle určitého protokolu, tzv. "Protokolu 3T3". Primární myší embryonální fibroblastové buňky byly přeneseny ("T", "transferred") každých 3 dny (první "3") a inokulovány na misku o objemu 20 cm^2 hustotou $3 \cdot 10^5$ buněk (druhá "3") nepřetržitě. Imortalizované buňky se stabilní rychlostí růstu byly stanoveny po 20 až 30 generacích v kultuře a poté byly označeny buňky "3T3". [3] [4]



Obr. 1 Buněčná linie 3T3 [5]

Konkrétně je "3T3-L1" jednou ze současných linií. George Todaro a Howard Green, vědci, kteří nejprve kultivovali tuto buněčnou linii, získali buňky z fibroblastů NIH švýcarských myších embryí. [6]



Obr. 2 Howard Green a George Todaro (zleva doprava) [7] [8]

Buněčná linie se od té doby stala standardní buněčnou linií fibroblastů. Když 3T3 linie byla objevena, byly buňky považovány za poněkud anomální. Většina buněčných linií tehdy indukovala nádory, když byly injektovány do zvířecích modelů, a bylo všeobecně uznáno, že pokud jsou buňky nesmrtelné, musí být také onkogenní. Skutečnost, že buňky 3T3 mohly zřejmě růst neomezeně a zároveň nebyly schopny podnítit růst nádorů, pomohly vědcům poprvé rozlišovat rozdíly mezi úmrtností buněk a schopností buněk podstoupit onkogenní transformaci. [6]

Jako jedná z nejčastěji používaných buněčných linií byla buněčná linie NIH 3T3 začleněna do studií pro řadu mechanických a buněčných testů, včetně analýzy funkčních proteinů. Buňky jsou adherentní (pro svoji proliferaci potřebují pevné podloží) a fibroblastické. NIH 3T3 je považována za jednu z relativně snadno rostoucích buněčných linií. Doba zdvojení buněk NIH 3T3 (doba, za kterou dojde ke zdvojnásobení buněk populace) je 20–26 hodin. Jedná se o hypertriploidní linii (3n+). Modální počet chromozomů je 68, který se vyskytuje u 30 % buněk. Vyšší ploidie se vyskytuje u 2,4 % buněk. [3]

2 KULTIVACE BUNĚK

Buněčné kultury dnes patří mezi základní techniky používané v základním a aplikovaném výzkumu. Kultivované buňky jako pokusný model mají dnes již své nenahraditelné postavení. Řadu buněčných linií lze snadno kultivovat a v krátké době je možné získat poměrně velké množství přesně definovaného a homogenního materiálu. Na kultivovaných buňkách lze také provádět experimenty, při nichž dojde k jejich zničení. Na druhou stranu je potřeba počítat i s omezeními, která použití buněčných kultur limitují. Kultivované buňky rostou za nefyziologických podmínek – pěstují se v kultivačním médiu, jehož složení neodráží přesně složení vnitřního prostředí v organismu. [9]

2.1 Zásady kultivace buněk

2.1.1 Kultivační podmínky

Aby pěstované buňky za podmínek in vitro přeživaly (proliferovaly), je třeba jim zajistit vhodné podmínky. Mezi nejdůležitější patří povrch kultivační nádoby, složení kultivačního média a další vlastnosti prostředí (teplota či složení atmosféry). Většina buněčných kultur je adherentní, tj. buňky rostou na vhodném kultivačním povrchu.

Nejčastěji se pro pěstování buněk používají polystyrénové láhve, jejichž povrch je upraven tak, aby byl hydrofilní. [9]



Obr. 3 Kultivační láhve (s uzávěrem bez filtru) z polystyrénu [10]

Pro správné pěstování buněk in vitro je důležité dodržovat několik zásadních podmínek. Kultivace buněčných kultur probíhá při teplotě 35 až 37 °C. Teplota hraje důležitou roli pro proliferaci buněk a také má vliv na rozpustnost plynů jako je oxid uhličitý a kyslík. Atmosféra v inkubátoru se většinou obohacuje o oxid uhličitý a obvykle obsahuje 5 % CO₂. Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého se podílí na udržení pH médií s bikarbonátovým pufrem. Kromě toho vyšší koncentrace rozpuštěného CO₂ v médiu lépe odpovídá poměrům v extracelulární tekutině. Aby se neodpařovala voda z kultivačního média, udržuje se relativní vlhkost atmosféry kolem 90 %. [9]

Buňky se pěstují ve speciálních laboratorních inkubátorech, zajišťujících všechny uvedené parametry. Inkubátor je vybaven regulátorem teploty a zařízením pro řízení koncentrace CO₂. Musí také umožňovat snadné čištění a dezinfekci, jeho součásti bývají vyrobeny z materiálů, které růstu bakterií a plísní brání. Některé inkubátory používané pro práci s buněčnými kulturami jsou vybavené dalšími součástmi, snižujícími riziko kontaminací – např. umožňují sterilizaci vnitřní atmosféry ultrafialovým zářením. [9]

2.1.2 Kultivační médium

Důležité je také použité médium. Kultivační médium je substrát poskytující výživu buněčným kulturám pěstovaným in vitro. Při práci s buněčnou kulturou se často používá Eagleho minimální esenciální médium, zkráceně EMEM. Dané médium, vyvinuté Harry Eglem, americkým lékařem a patologem, je jedním z nejpopulárnějších ze všech syntetických buněčných kultivačních médií. Obsahuje aminokyseliny, anorganické soli, glukózu a vitaminy (riboflavin (vitamín B₂), niacin (vitamín B₃), kyselinu listovou

(vitamin B₉), kobalamin (vitamin B₁₂)). [11]

Často se také používá Dulbeccovo modifikované Eagleho médium, zkráceně DMEM. V zásadě se jedná o obohacení základního Eagleova média asi na dvakrát více aminokyselin, dvakrát více glukózy a čtyřikrát více vitaminů. Navíc má lepší pufrací systém. Hlavní složky média jsou anorganické soli, jako jsou chlorid sodný, chlorid hořečnatý, síran hořečnatý atd. Médium také obsahuje aminokyseliny (L-leucin, L-lysin, L-methionin, L-glutamin) a další látky (linolovou kyselinu, železo či fenolovou červeň). [12] [13]

Často se do média přidává sérum, nejčastěji fetální bovinní sérum, v objemech odpovídajících 5 až 15 % celkového objemu kapaliny přidávané k buněčným kulturám. Sérum je bohaté na živiny, obsahuje řadu růstových faktorů a tím zlepšuje proliferaci buněk. Obsažený NaHCO₃ společně s 5% atmosférou CO₂ vytváří pufrací systém, který je schopný vyrovnávat výkyvy pH roztoku. Pro vizuální kontrolu slouží také fenolová červeň, která je schopná indikovat již malé odchylky pH roztoku v oblastech blízkých fyziologickým hodnotám. Při pH 7,4 má jasně červenou barvu, která se směrem ke kyselé oblasti mění na žlutou, v alkaličtějším prostředí na fialovou. Přídavek indikátoru usnadňuje běžnou práci s buněčnými kulturami – rostoucí buňky do média vylučují kyselé katabolity, zežloutnutí média je tedy známkou, že je nutné jej vyměnit. [9] [13]



Obr. 4 Dulbeccovo modifikované Eagleho médium (DMEM) [14]

2.1.3 Použití fosfátového pufru (PBS)

Ke stabilizaci pH roztoku se také používá fosfátový pufrovaný fyziologický roztok, zkráceně PBS (Phosphate Buffered Saline). V podstatě se jedná o fosfátový roztok

s 0,15 M chloridu sodného, obsahuje také fosforečnan sodný a (v některých případech) chlorid draselný a fosforečnan draselný. Podstatou nárazníkové funkce fosfátového pufru je kyselina fosforečná a fosforečnanové soli. K přípravě fosfátového pufru se používá $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (nebo $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) a destilovaná H_2O . [15]

2.1.4 Antibiotika

Dále je médium obohaceno o protektivně působící antibiotika penicilin (100 U/ml) a streptomycin (0,1 mg/ml). Použitím kombinace penicilinu a streptomycinu zamezíme růstu grampozitivních i gramnegativních bakterií, obě antibiotika se liší a doplňují v mechanismu svého baktericidního působení. Jedná se o minimální ochranu, která však nechrání kulturu před plným spektrem možných infekcí bakteriemi či jinými mikroorganismy. [12] [13]

2.1.5 Pasážování

Při 80% konfluenci je nutné pro zachování kultury buňky pasážovat. Pod pojmem pasážování rozumíme uvolnění adherentních buněk od kultivačního povrchu i od sebe navzájem, přenesení do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem. Po určité době se živiny z média vyčerpají a početnost buněk stoupne na neúnosnou míru. Proto je nutné část buněk odebrat a přenést do nové sterilní kultivační láhve. Dosáhneme toho použitím trypsinu – trávicího enzymu štěpícího peptidové vazby, který se využívá k uvolnění adherovaných buněk. [16]

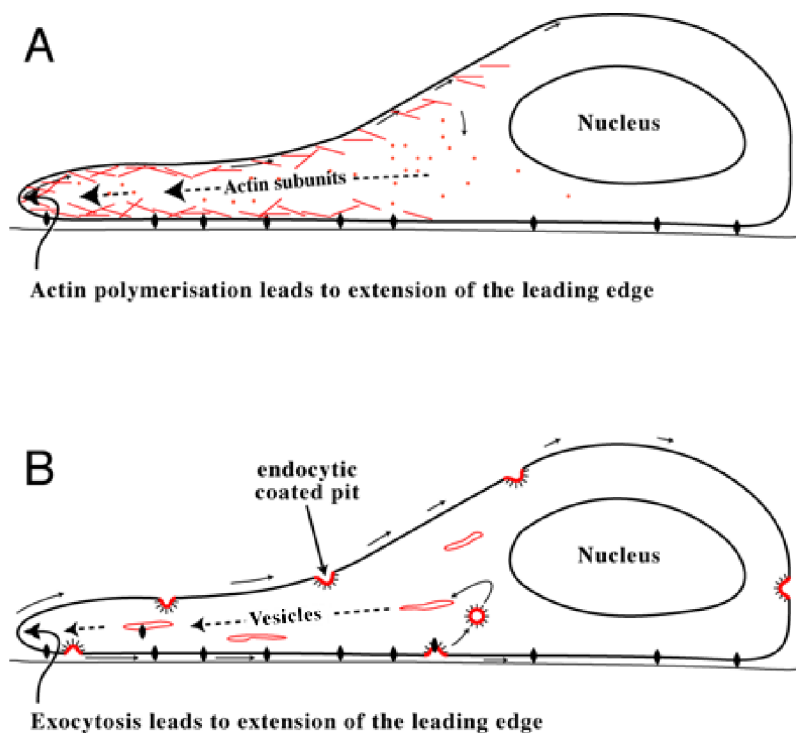
2.1.6 Určení počtu buněk

Počítání buněk patří mezi základní postupy jak při jejich pěstování (například pro stanovení hustoty buněk), tak v pokusech s kultivovanými buňkami. Pro přesné stanovení počtu buněk je zlatým standardem počítání v cytometrické komůrce (např. v Bürkerově). Přesnost této metody je ovšem vyvážena její časovou náročností a pracností. Buněčná suspenze se před počítáním většinou mísí s roztokem trypanové modři – barvivem, které difunduje přes plasmatickou membránu do intracelulárního prostoru, ze živých buněk je však následně rychle transportováno ven. Podle toho jaká část buněk se trypanovou modří obarví, lze pak snadno určit procento živých a mrtvých buněk ve vzorku. Rychlejší metodou je průtoková cytometrie. Mezi její nevýhody však patří poměrně vysoká cena přístroje a nutnost kalibrovat přístroj na každý buněčný typ. [9] [17]

3 BUNĚČNÁ MIGRACE

Interakce buněk s povrchem ovlivňuje chování, jako je proliferace, migrace a diferenciace. Buněčná migrace je důležitý proces, který se uplatňuje jak při vývoji, tak při regeneraci organismu a udržování homeostázy. Většina (lidských) buněk je schopna aktivnímu pohybu, např. fibroblasty se mohou pohybovat rychlostí až 1,2 $\mu\text{m}/\text{min}$, ale spermie dokonce mnohem rychleji (2000 $\mu\text{m}/\text{min}$). [18] [19]

Buněčná migrace je komplexní proces, využívající různé mechanismy. Nejčastěji probíhá jako odpověď na chemické signály vydávané buňkami v okolí. Mechanismem pohybu je cílené přestavování cytoskeletu – na zadním konci se řízeně rozkládají aktinová filamenta a mikrotubuly, zatímco na předním konci dochází k polymeraci aktinu. Dále pohybu buňky napomáhá i odpovídající iontová výměna (aby docházelo k výdeji vody na zadním konci a příjmu na předním konci). [18] [19]

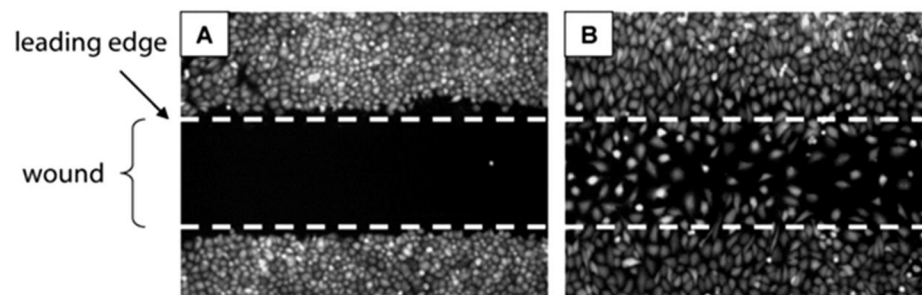


Obr. 5 Migrace buňky po podkladu: (A) polymerace aktinu na přední straně
(B) exocytóza váčků na přední straně [19]

Buněčná migrace je zcela zásadní např. pro takové procesy, jako je hojení ran (díky migraci fibroblastů do místa poškození), embryonální vývoj, imunitní obrana (např. neutrofilů přechází skrz cévní stěnu do místa infekce). Buněčná migrace je ale také podstatou procesů, které organismus poškozují, jako např. metastázování nádorových buněk. [18] [19]

4 SCRATCH WOUND HEALING ASSAY EXPERIMENT

Za účelem studia chování buňky ve vztahu k migraci buněk může být použit experiment *Scratch Wound Healing Assay* (test „hojení ran“ in vitro). *Scratch Wound Healing Assay* je běžně užívaná, jednoduchá, kvantitativní metoda pro měření základních parametrů migrace, jako jsou např. rychlost migrace a polarita buněk. Buňky jsou pěstovány v běžném médiu, dokud nevytvoří souvislou vrstvu. Následně je do této vrstvy špičkou pipety o předem definované velikosti vytvořena rýha. Buňky na okraji rýhy polarizují a začínají migrovat směrem ke středu této rýhy, ve snaze ji zacelit. Tato migrace je chemokinetická (neřízená a náhodná) a výhodou metody tedy je, že buňky ochotně migrují bez nutnosti přidání specifických chemoatraktantů. Nejlepším způsobem, jak buňky při pohybu pozorovat, je snímání mikroskopem v pravidelných časových intervalech. [20]



Obr. 6 *Scratch Wound Healing Assay* experiment: (A) na začátku testu
(B) po 24 hodinách [21]

I když to není přesná duplikace migrace buněk in vivo, tato metoda napodobuje do určité míry migraci buněk při hojení ran. Např. odstranění části endotelu v krevních cévách vyvolá migraci endotelových buněk do vynechané oblasti. V závislosti na typu buňky migrují do rány volně (např. fibroblasty) nebo jako populace buněk (např. epiteliální a endotelové buňky). [20]

Ve srovnání s jinými populárními metodami in vitro je *Scratch Wound Healing Assay* zvláště vhodná pro studium směrové migrace buněk a její regulaci buněčnou interakcí s extracelulárním matrixem (ECM) a mezibuněčnou interakcí (cell-cell interaction). Metoda hojení ran byla nedávno také kombinována s mikroinjekcí nebo transfekcí k posouzení účinků exprese exogenních genů na migraci jednotlivých buněk. To je asi nejjednodušší metoda pro studium migrace buněk in vitro a jediná, která nevyžaduje speciální podmínky – všechno, co potřebujeme, nalezneme ve většině

laboratoří, které jsou určeny pro kultivaci buněk. Základní kroky zahrnují vytvoření "rány" na monovrstvě buněk, získání obrazů na začátku experimentu a v pravidelných intervalech během migrace buněk až do úplného spojení okrajů ráhy, pak následuje porovnání snímků za účelem určení rychlosti migrace buněk. [22]

Protože pohyb buněk je velmi pomalý, jsou vytvářena časosběrná videa. Tímto způsobem lze např. zjistit, které buňky z populace migrují, jak rychlý je jejich pohyb a jaká je trasa migrace. [18]

Další podkapitoly popisují alternativní metodu studia migrace buněk *High Throughput Migration Assay* a použití uvedených metod v buněčných studiích.

4.1 Metody provedení Scratch Wound Healing Assay experimentu

Existují různé protokoly, podle kterých lze provádět daný experiment. Jeden z nich je zaměřen na sledování migrace celé populace buněk. Experiment zahrnuje přípravu misky pro získání snímků (např. nanesením značek žiletkou nebo fixem na vnější dno misky), potažení misky fibronektinem pro zvýšení buněčné adheze, kultivaci konfluentní monovrstvy buněčné linie (obvykle to trvá 2–3 dny) a vytvoření ráhy špičkou pipety (ve vztahu k referenčním značkám na misce). Hned po vytvoření ráhy je nutné získat první mikroskopický snímek. Referenční značky musí být mimo pole snímacího obrazu, ale v okně okuláru tak, aby mohly být později zarovnány pro další pořízení snímků. Po získání prvního snímku je nutné vrátit misku do inkubátoru. Další snímky se získávají podle toho, jak rychle se „hojí“ rána. [22]

Další protokol je zaměřen na sledování migrace jednotlivých buněk. Příprava misky pro experiment a kultivace buněk probíhá stejně jako v předchozím protokolu. Když konfluence buněk 3T3 dosáhne 50–60 % (buňky pokrývají 50–60 % povrchu kultivační láhve), můžeme podstoupit k transfekci. Buňky se transfekují plasmidem kódujícím požadovaný gen spolu s markerovým plasmidem (tj. GFP, Green fluorescent protein, Zelený fluorescenční protein) v poměru 7:1. Když konfluence buněk dosáhne 100 % (obvykle 24 až 48 hodin po transfekci), je nutné vytvořit ráhu pomocí špičky pipety. Dále sledujeme buňky pod fluorescenčním mikroskopem, dokud nezjistíme že dostatečný počet buněk na předním okraji ráhy je pozitivně transfekován (tj. že buňky jsou značeny GFP). Od té chvíle se získávají fázově kontrastní a fluorescenční snímky v pravidelných intervalech (každé 2 hodiny) a sleduje se oblast ráhy, dokud se plně nezahojí (obvykle to trvá asi 10 hodin). [22]

4.2 Stanovení účinku extraktů z léčivých bylin v experimentu Scratch Wound Healing Assay

Od starověku lidé používají rostliny a přípravky z nich k urychlení procesu hojení ran. Často jejich použití je založeno pouze na tradici, bez jakéhokoli vědeckého důkazu účinnosti a bez znalostí jejich způsobu působení. *Scratch Wound Healing Assay* experiment se ukázal jako cenný a levný nástroj pro získání prvního pohledu na to, jak rostlinné přípravky nebo jejich izolované sloučeniny mohou pozitivně ovlivnit vznik nové tkáně. [23]

Po poranění pokožky savců jsou zahájeny složité a komplikované postupy k obnovení funkce a integrity poškozených tkání. Na začátku vzniku nové tkáně jsou pozorovány různé procesy (migrace keratinocytů poraněné pokožky, proliferace těchto buněk na okraji rány). Tato fáze se také nazývá reepitelizace. Důležitou roli při regeneraci hrají fibroblasty. Tyto buňky se prolifерují, migrují do oblasti rány a syntetizují extracelulární matrix (ECM). Konečně dochází k obnovení funkce kožní bariéry. [23]

Při poranění buněčná vrstva reaguje na narušení mezibuněčných interakcí (cell-cell interaction) zvýšením koncentrace růstových faktorů a cytokinů na okraji rány, čímž dochází k proliferaci a migraci různých buněčných typů, jako jsou keratinocyty a fibroblasty. Při provádění *Scratch Wound Healing Assay* experimentu je typicky vytvořena umělá rýha v monovrstvě buněk pomocí ostrého předmětu (špička pipety nebo jehla injekční stříkačky). Buňky se polarizují k ráně a zavírají ji. Progress těchto událostí může být monitorován manuálně pořízením snímků v různých časových okamžicích nebo pomocí časosběrné mikroskopii. [23]

V experimentu byly použity 3T3 myší fibroblasty a jako pozitivní kontrola sloužil růstový faktor odvozený od trombocytů (PDGF, Platelet Derived Growth Factor). Tento experiment byl aplikován na tři bylinné přípravky používané v tradičním lékařství: etanolové extrakty z měsíčku lékařského (*Calendula officinalis*) a heřmánku pravého (*Matricaria recutita*), komerčně dostupný olej z třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*). Přípravky z měsíčku lékařského se používají jako lék na hojení ran, extrakt heřmánku pravého má protizánětlivé účinky a olej z třezalky tečkované je používán jako přípravek na léčbu jizev. [23]

Použité 3T3 myší fibroblasty byly kultivovány v médiu obsahujícím 10 % FBS, dokud nevytvořily souvislou monovrstvu. Následně je do této vrstvy sterilní špičkou pipety o objemu 100 μ l vytvořena rýha. Buňky v DMEM médiu byly považovány za kontrolní skupinu. Buňky s přidáním růstového faktoru PDGF odvozeného

od trombocytů (2 ng/ml) byly považovány za pozitivní kontrolu. Tento růstový faktor stimuluje produkci matrixových proteinů ve fibroblastech, včetně fibronektinu, kolagenu a kyseliny hyaluronové, stejně jako syntézu kolagenáz, čímž zlepšuje rychlost hojení. [23]

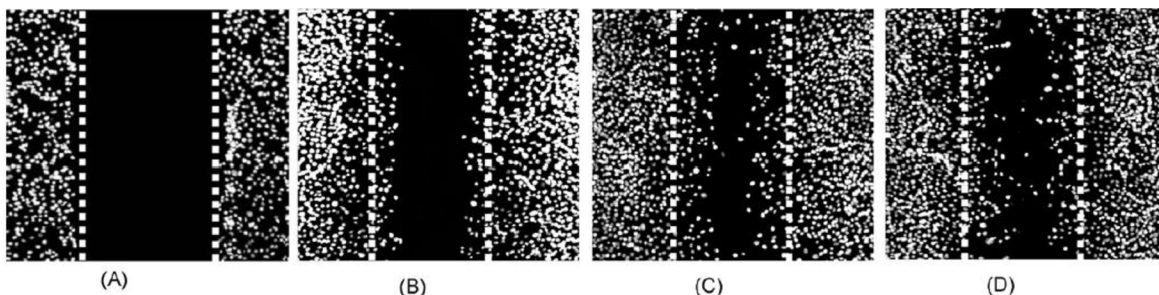


Obr. 7 Heřmánek pravý, měsíček lékařský, třezalka tečkovaná (zleva doprava) [24] [25]

Do dalších kultivačních misek s buňkami byly přidány extrakty léčivých rostlin: etanolvý extrakt z měsíčku lékařského (1 a 10 $\mu\text{g/ml}$), etanolvý extrakt z heřmánku pravého (1 a 10 $\mu\text{g/ml}$), komerčně dostupný olej z třezalky tečkované (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Fibroblasty byly inkubovány 12 hodin při 37 °C s 5 % CO_2 . Buňky byly fixovány 4% paraformaldehydem a barveny 4,6–diamidin–2–fenylyndolem (DAPI). [23]

Účinek etanolového extraktů z květů měsíčku lékařského na migraci a proliferaci fibroblastů byl zkoumán za stanovených podmínek. Etanolvý extrakt z měsíčku lékařského zvýšil počet buněk na 60,80 % \pm 4,36 a 70,53 % \pm 2,64 při koncentraci 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Při srovnání výsledků s kontrolní skupinou byl v obou případech pozorován významný rozdíl. Aktivita extraktů z měsíčku lékařského při podpoře hojení byla podobná aktivitě PDGF o koncentraci 2 ng/ml. Oba způsoby obnovily buňky do konfluentního nebo téměř konfluentního stavu během 18 hodin, na rozdíl od kontrolních buněk. [23]

Etanolvý extrakt připravený z květů heřmánku pravého byl zkoumán za stejných podmínek. Byla pozorována nižší migrační a proliferační aktivita s hodnotami 6,36 % \pm 1,67 a 24,35 % \pm 0,60 pro koncentrace 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Změny nebyly statisticky významné. Rovněž byla provedena analýza komerčního farmaceutického oleje z třezalky tečkované. Zkoumala se pouze koncentrace 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a bylo dosaženo vyššího počtu buněk o 19,90 % \pm 1,05. Vyšší koncentrace byly cytotoxické. [23]



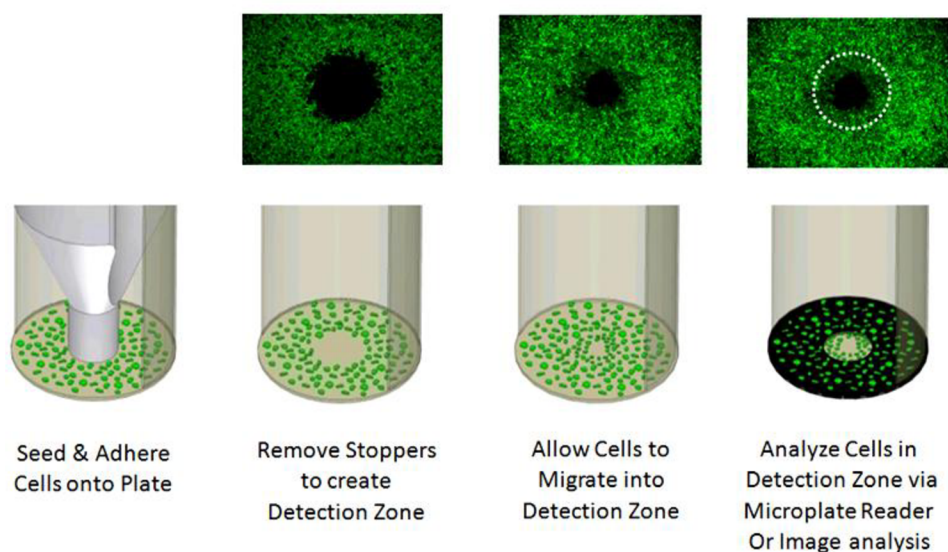
Obr. 8 Snímky pořízené fluorescenčním mikroskopem: (A) na začátku testu (B) kontrolní skupina po 12 hodinách (C) pozitivní kontrola po 12 hodinách (D) buňky s přidáním 10 µg/ml hexanového extraktu z měsíčku lékařského po 12 hodinách [23]

Scratch Wound Healing Assay experiment zahrnuje druhou fázi hojení ran, charakterizovanou proliferací a migrací keratinocytů nebo fibroblastů. Proto olej z třezalky tečkované, který se používá jako přípravek na léčbu jizev, nedokázal zvýšit počet buněk v terapeuticky relevantních dávkách kvůli jeho antiproliferační aktivitě. Ačkoli experiment nemůže nahradit *in vivo* studie jako konečný důkaz účinnosti při hojení ran, tato studie potvrzuje svou užitečnost pro získání prvního pohledu na potenciál extraktu nebo sloučeniny urychlit proces hojení ran. Navíc výsledky experimentu s extraktem z měsíčku lékařského jsou v souladu s předpokladem, že přípravky z měsíčku lékařského stimulují granulaci a zvyšují metabolismus kolagenu v místě rány. Daný extrakt vykazoval nejslibnější účinky v experimentu, protože byla prokázána vysoká aktivita při nízkých koncentracích. [23]

Výsledkem studie bylo, že *Scratch Wound Healing Assay* experiment je vhodný a nenákladný způsob, který poskytuje robustní a reprodukovatelné výsledky. Tudiž tato metoda může být použita k získání prvního pohledu na potenciál extraktů z léčivých bylin. To bylo úspěšně prokázáno s extraktem z měsíčku lékařského, tradiční léčivou rostlinou, známou pro své vlastnosti při hojení ran. [23]

4.3 High Throughput Migration Assay experiment

Je dalším způsobem studia migrace buněk. Alternativně může být rýha vytvořena fyzickým vyloučením buněk pomocí vložek. Takové vložky vytvářejí lineární nebo kruhové rýhy tím, že se drží na ošetřovaném dně nádoby a zabraňují růstu buněk v předem definované oblasti. Existují různé komerčně vyráběné vložky. [26]

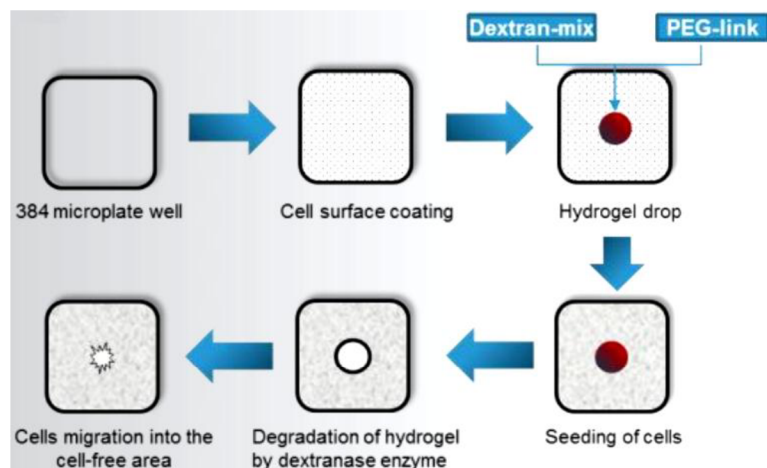


Obr. 9 High Throughput Migration Assay experiment [27]

Samotný experiment se začíná odebráním vložky. Výhody použití takového inzertu zahrnují potřebu menšího množství buněk a také větší reprodukovatelnost rýh ve srovnání s metodou *Scratch Wound Healing Assay*. Zatímco velikost rýh vytvořených vložkou může být více reprodukovatelná, buňky přiléhající k vložce mohou být vytrženy z monovrstvy, přičemž zanechávají zubaté okraje. To znamená, že okraje rýhy nemusí být nutně lépe definovány ve srovnání s experimentem *Scratch Wound Healing Assay* (kde pro vytvoření rýhy používáme žiletku nebo špičku pipety). Komerční vložky jsou navíc nákladnější. Vložky mohou být znovu použity ke zmírnění nákladů, ale v průběhu času může dojít k ohrožení jejich přilnavosti ke dnu misky. [26]

4.4 Použití metody High Throughput Migration Assay za účelem testování inhibice buněčné migrace

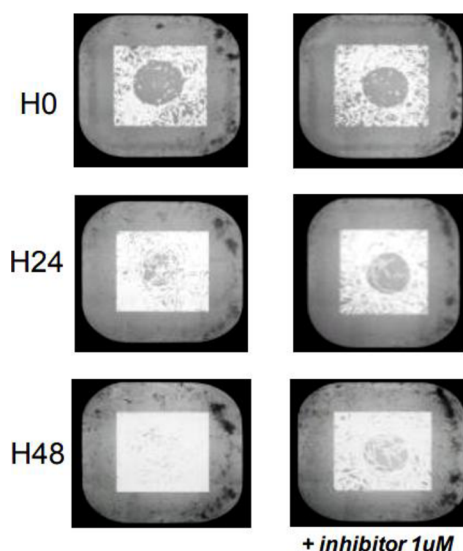
Migrace buněk je vysoce integrovaný vícestupňový proces. Pochopení procesů spojených s pohybem buněk může poskytnout důležitý pohled na zvládnutí různých onemocnění. Daný experiment popisuje použití metody *High Throughput Migration Assay* pro hodnocení vlivu inhibitoru GPCR na migraci buněk. Jako vložka se tady používá biomimetický hydrogel. Velikost kapky hydrogelu je definována uživatelem, je navíc možnost přidání enzymu pro další degradaci hydrogelu. Aby se zvýšila kvalita těchto testů pro screening léků, automatizace se stává nezbytnou součástí. V této studii bylo popsáno použití robota pro manipulaci s tekutinami. [28]



Obr. 10 Postup provedení High Throughput Migration Assay experimentu s použitím degradabilního hydrogelu [28]

Migrace fibroblastické buněčné linie byla stanovena v přítomnosti nebo nepřítomnosti specifického inhibitoru GPCR (G protein-coupled receptor, receptor spřažený s G proteinem). Za použitím velmi přesného dávkovacího zařízení bylo na testovací destičku nanášeno malé množství viskózního hydrogelu. [28]

Použitý v tomto experimentu hydrogel obsahuje dvě složky: dextranový polymer a polyethylenglykol (PEG) a je velmi stabilní (nezhoršuje se po několika dnech kultivace). Gelové složky jsou rozpustné ve vodě a nevázejí se na buňky. Přidáním dextranázy se spustí proces degradace hydrogelu, který vytvoří oblast bez buněk pro pozorování migrace buněk. [28]



Obr. 11 Migrace fibroblastů bez přidaného inhibitoru (zleva) a v přítomnosti inhibitoru GPCR [28]

Robotické dávkovací zařízení bylo schopné přesně dávkovat malé objemy hydrogelu do jamkových destiček, což vedlo k obecně přesným oblastem bez buněk po degradaci hydrogelových kapek. Nicméně někdy nebyl získán perfektní kruhový tvar. Po 24 a 48 hodinách proliferace fibroblastových buněk byla získána reprodukovatelná data. Migrace fibroblastů byla inhibována v buněčných vzorcích s přidáním inhibítorem GPCR. [28]

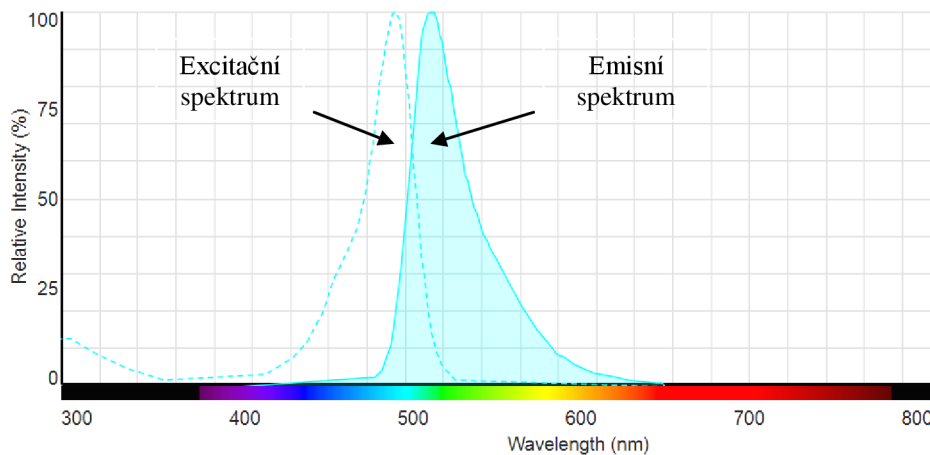
Tato studie ukázala, jak může nová automatizovaná platforma zlepšit rychlost a spolehlivost testů migrace buněk. [28]

5 BARVIVA PRO FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPII

Fluorescenční mikroskopie je založena na schopnosti některých látek emitovat viditelné světlo po ozáření světlem o kratší vlnové délce (nejčastěji ultrafialovým zářením nebo světlem ve fialovém spektru viditelného světla). Pozorování buněčných struktur ve fluorescenční mikroskopii vyžaduje aplikaci speciálních fluorescenčních barviv, nebo fluoroforů. Jedná se o molekuly, které jsou schopné absorbovat foton světla a okamžitě ztratit získanou energii vyzářením fotonu o delší vlnové délce. Dnes jsou na trhu různá fluorescenční barviva, která se liší hodnotou excitační vlnové délky, molekulovou hmotností, složením atd. Fluorofor volíme také na základě toho, co chceme zviditelnit v bunce – může to být jádro, DNA, cytoskelet nebo další intracelulární organely. [29]

5.1 Kalcein

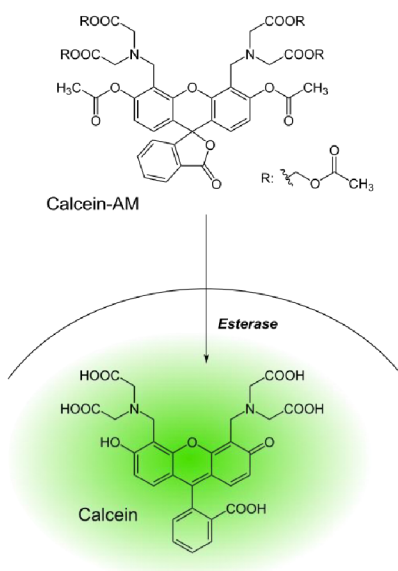
Kalcein (známý rovněž jako fluorexon) je fluorescenční barvivo s excitační vlnovou délkou 495 nm a emisní vlnovou délkou 515 nm. To znamená, že obarvené buňky emitují světlo v zelené oblasti viditelného spektra. [30]



Obr. 12 Excitační a emisní spektrum kalceinu-AM [31]

Nefluorescenční acetomethoxyderivát kalceinu (kalcein-AM, AM=acetoxymethyl) se používá v biologii, protože může být transportován přes buněčnou membránu do živých buněk, což je užitečné pro krátkodobé značení buněk (obarvené buňky vykazují fluorescenci maximálně po dobu 6 hodin). Po přenesení do buňky je intracelulární ester odstraněn z acetomethoxyskupiny a dochází ke konverzi kalceinu-AM na kalcein, což vede k zelené fluorescenci. [30]

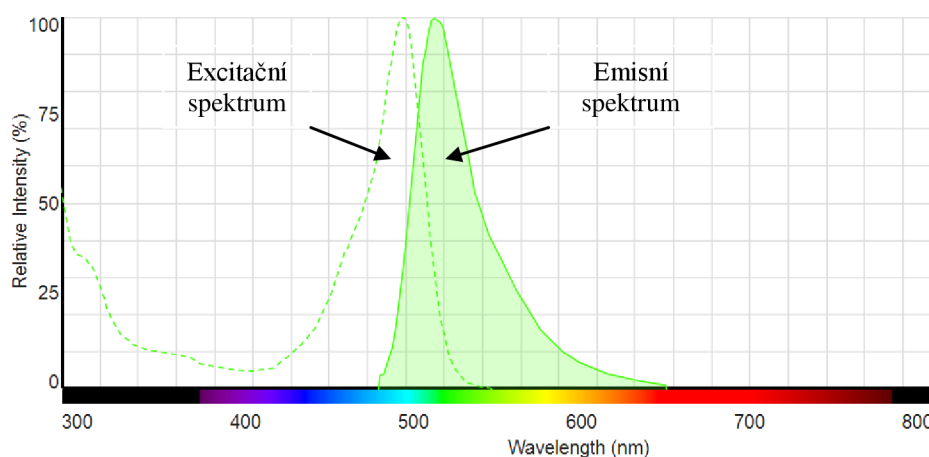
Vzhledem k tomu, že pouze živé buňky mají dostatečné esterázy a po excitaci fluoreskují zeleně, můžeme použít kalcein-AM pro testování životaschopnosti buněk. Kalcein se běžně používá pro sledování buněk a při studiích endocytózy a migrace buněk. [30]



Obr. 13 Konverze kalceinu-AM na kalcein uvnitř buňky [30]

5.2 CellTracker™ Green CMFDA

CellTracker™ Green CMFDA (5-chlormethylfluorescein diacetát) je fluorescenční barvivo vhodné pro sledování pohybu buněk. Zelené excitační/emisní spektrum je ideální pro multiplexování s červenými fluorescenčními barvivy a bílkovinami. [32]



Obr. 14 Excitační a emisní spektrum fluoresceinu [33]

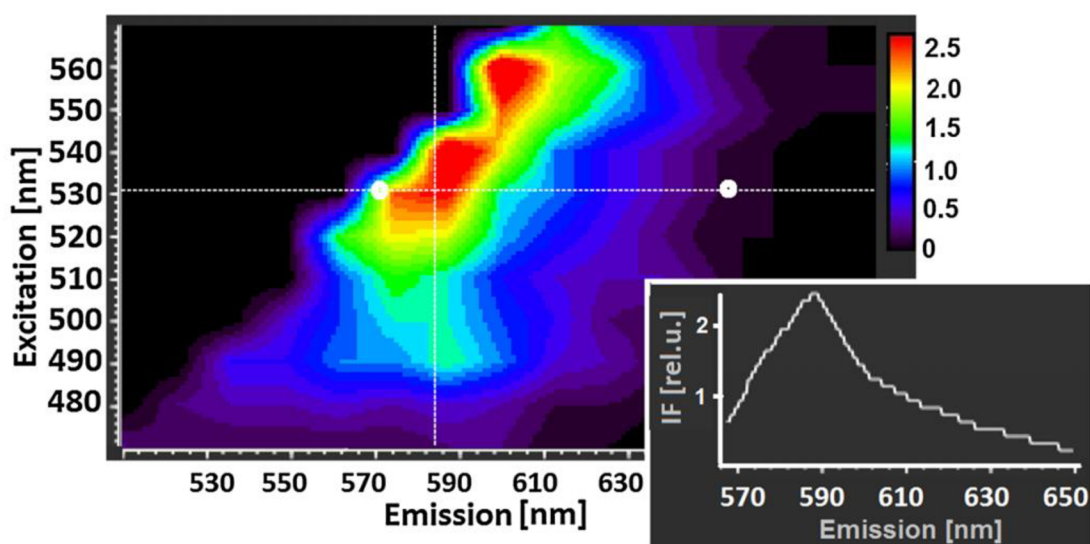
Má velmi malou permeabilitu přes buněčnou membránu. To znamená, že barvivo zůstává po relativně dlouhou dobu lokalizováno uvnitř buněk, což umožňuje vícegenerační sledování buněčných pohybů. Mezi výhody CellTracker™ Green CMFDA patří snadné použití, stabilita a nízká toxicita (neovlivňuje proliferaci buněk a jejich životaschopnost). Další výhodou je, že obarvené buňky vykazují fluorescenci po dobu nejméně 24 hodin. [32]

5.3 Nanočástice značené rhodaminem

SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxides) jsou nanočástice, které pronikají přímo do buňky a můžeme s nimi značit buněčné struktury. Skládají se z funkční slupky, magnetického jádra a bioaktivní látky. Magnetické jádro se skládá nejčastěji z maghemitu nebo magnetitu, které mají magnetické vlastnosti a umožňují cílený pohyb částic. Funkční slupka je nutná z důvodu zabránění agregace (lepší dispergace). Na tuto horní vrstvu se umisťují protilátky, enzymy nebo jiné biologicky aktivní látky. [34]

Syntéza SPIO nanočástic probíhá následujícím způsobem. 10 g chloridu železitého hexahydrátu $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (37 mmol) se rozpustí v 800 ml deionizované vody. Směs je redukována přidáním 2 g borohydridu sodného NaBH_4 (3,5 %, 100 ml) při pokojové teplotě. Vzniklý černý precipitát se zahřívá 2 hodiny při 100 °C. Pak se nechá vychladnout na pokojovou teplotu. Magnetická složka je separována ze směsi pomocí externího magnetu a několikrát propláchnuta vodou. Finálním krokem je zahřátí meziproductu na teplotu 400 °C po dobu 2 hodin. [35] [36]

Na povrch vytvořených SPIO nanočástic můžeme navázat molekuly fluorescenčního barviva. V našem případě se jedná o rhodamin. Rhodamin je heterocyklická sloučenina, která se zařazuje do skupiny organických fluoroforů. Excitační interval rhodaminu je od 540 nm do 650 nm a emisní interval je v rozmezí od 550 nm do 800 nm. [35]



Obr. 15 Excitační a emisní spektrum SPIO-rhodamin nanočástic [35]

Povrch SPIO nanočástic je funkcionalizován inkubací v tetramethylammonium perchlorátu $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{ClNO}_4$ (pH=7) s rhodamin B isothiokyanátem RITC (50 μM). Inkubační směs se mírně protřepává po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po inkubaci byly nanočástice separovány externím magnetickým polím a propláchnuty roztokem tetramethylammonium perchlorátu (50 mM) pro fixaci derivátu rhodaminu. [35]

6 PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem této práce je ověření kultivace buněk v buněčné laboratoři, návrh experimentu s použitím konfokálního mikroskopu, sběr a následná analýza mikroskopických dat.

Jednotlivé cíle práce:

1. Kultivace buněčné linie 3T3;
2. Barvení monovrstvy buněk zvoleným fluorescenčním barvivem;
3. Provedení *Scratch Wound Healing Assay* experimentu;
4. Intervalové snímání buněk konfokálním mikroskopem;
5. Návrh algoritmu v programovém prostředí MATLAB;
6. Aplikace statistických testů na výběrové skupiny získaných hodnot;
7. Diskuze dosažených výsledků.

6.1 Použité přístroje a pomůcky

Inkubátor – MEMMERT INCOmed

Chladnička pro laboratorní účely – LIEBHERR Thermostatic cabinet

Vodní lázeň – Julabo ED

Laminární box – BIOAIR Aura Mini, EuroClone

Mrazicí skříň – MANEKO

Inverzní mikroskopy – Arsenal AI 2-T

Laboratorní centrifuga – Hettich EBA 20

Konfokální mikroskop – Leica TCS SP8 X

Laboratorní minitřepačka IKA Lab dancer

Sterilní kultivační láhve – 25T

Konfokální misky se skleněným tenkým dnem BIO-PORT Europe s.r.o.

Plastové pipety – 3 ml

Serologické sterilní pipety – 1 ml, 5 ml

Nastavitelné pipety – HTL, Discovery comfort; 0,5–10 μ l, 20–200 μ l, 100–1000 μ l

Pipetový dávkovač – Eppendorf Easypet

Sterilní špičky pro pipety

Plastové centrifugační zkumavky s uzávěrem

Tenký černý fix pro kreslení mřížek na miskách

6.2 Kultivační médium a ostatní roztoky

Dulbeccovo modifikované Eagleho médium – DMEM D6429 (s přídavkem fetálního bovinního séra, 4500 mg/l glukózy, penicilinu, streptomycinu, L-glutaminu, pyrohroznanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného; sterilní, vhodný pro buněčné kultury), Sigma-Aldrich

Fosfátový pufovaný fyziologický roztok – PBS P4417-50TAB, Sigma-Aldrich

Trypsin – EDTA solution 10X 0,5% trypsin, 0,2% EDTA, Sigma-Aldrich

Kalcein – 4 mM Calcein AM in DMSO, L-3224, Invitrogen

Fibronektin – F4759 Fibronectin Bovine Plasma (powder, BioReagent, suitable for cell culture), Sigma-Aldrich

CellTracker™ Green CMFDA C7025, Invitrogen

SPIO-Rhodamine nanoparticles (koncentrace 1 mg/ml), UPOL

6.3 Kultivace a pasážování buněk

Pro ověření *Scratch Wound Healing Assay* experimentu byla použita buněčná linie s označením 3T3, jedná se o fibroblasty z myších embryí.

Jako základní médium bylo použito Dulbeccovo modifikované Eagleho médium. Kultivace probíhala v kultivačních láhvích o objemu 25 cm³.

Nastavené parametry pro inkubaci lahví:

- Teplota: 37 °C
- Koncentrace oxidu uhličitého (CO₂): 5,1 %
- Vlhkost vzduchu: 72 %

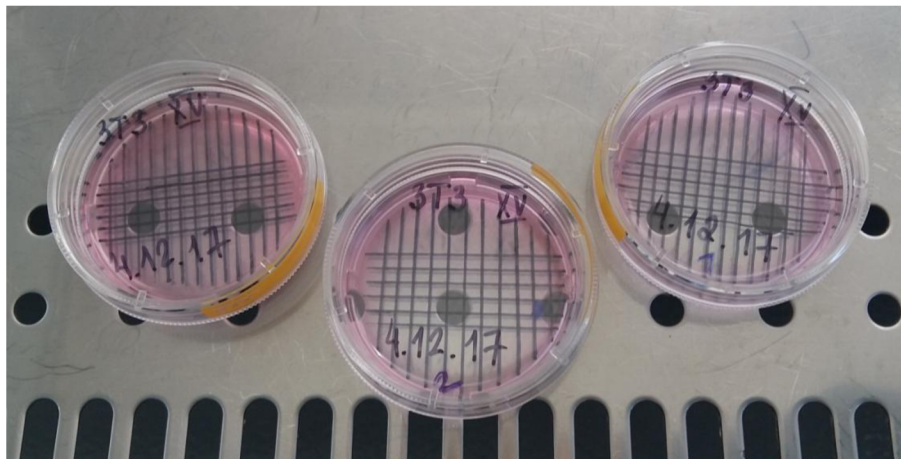
Pasážování buněk bylo prováděno při 70 až 80 % konfluenci (při 70–80% obsazení dna buňkami). Před vlastním pasážováním je třeba vytřít etanolem povrchy v boxu a připravit vše potřebné: pipety (dle počtu a velikosti pasážovaných kultivačních lahví), kádinku pro odpad, trypsin, fibronektin, DMEM, PBS (roztoky je třeba zahřát ve vodní

lázni na 37 °C). Vždy je potřeba všechny pomůcky postříkat etanolem, otřít a vložit do boxu.

Postup provedení pasážování:

1. Připravit misky pro *Scratch Wound Healing Assay* experiment: na vnější spodní straně misky nakreslit mřížku černým fixem (je nezbytná pro orientaci na misce a nalezení stejných úseků rýhu).
2. Dále následuje potažení misek adhezním faktorem – fibronectinem (povrchové pokrytí 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$): rozředit fibronectin na požadovanou koncentraci pomocí sterilního roztoku PBS.
3. Do každé misky přidat 600 μl směsi fibronectinu s PBS. Inkubovat misky 30–60 minut v inkubátoru.
4. Odsát staré médium z láhve (v ní zůstanou adherované buňky).
5. Buňky opláchnout 2 ml sterilním roztokem PBS.
6. Po odstranění PBS přidat do láhve 1 ml sterilního roztoku trypsinu, láhev dát do inkubátoru. Trypsin odlepí buňky ode dna kultivační láhve a buňky přejdou do suspenze.
7. Po 3 minutové inkubaci zkontrolovat buňky pod mikroskopem (zakulacení buněk, plavání v roztoku). Pokud to bude nutné, buňky jemně mechanicky sklepat ze dna láhve.
8. Ve stadiu, kdy jsou buňky v suspenzi, přidat do láhve 3 ml média (zastaví účinek trypsinu).
9. Pipetováním (nejméně pětkrát) šetrně resuspendovat buňky.
10. Suspenzi buněk odsát a přelit do nachystané plastové centrifugační zkumavky.
11. Centrifugovat buňky (3 minuty, 1500 ot/min).
12. Po centrifugaci odstranit pipetou supernatant z plastové zkumavky. Do ní poté přidat 1 ml média a pipetováním znovu resuspendovat buňky.
13. Spočítat koncentraci buněk v 1 μl buněčné suspenze (postup je popsán níže).
14. Odsát fibronectin z misek, opláchnout misky sterilním roztokem PBS.
15. Do nové sterilní láhve přidat 5 ml média, do každé nové misky s mřížkou přidat 2 ml média.
16. Na základě spočítané koncentrace buněk do každé misky přidat 70–90 μl buněčné suspenze ($5\text{--}6 \cdot 10^5$ buněk), do nové láhve s médiem přidat 160–200 μl buněčné suspenze ($8\text{--}10 \cdot 10^5$ buněk).
17. Popsat láhev a misku – typ buněk, číslo pasáže, datum, jméno, koncentrace buněk. Buňky zkontrolovat pod mikroskopem a vložit do inkubátoru.

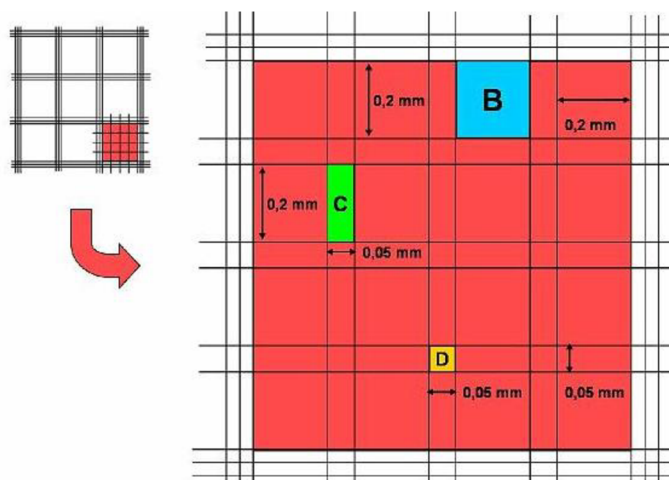
Po ukončení práce je nutné vyhodit jednorázový spotřebný materiál do biologického odpadu. Povrchy v boxu je třeba znovu vyčistit etanolem a nechat vysvítit UV po dobu 20 minut.



Obr. 16 Misky s nakreslenou mřížkou

Na tomto místě se musíme ještě zmínit o koncentraci buněk v 1 μ l buněčné suspenze získané z kultivační láhve po pasážování. Je důležité vědět koncentraci buněk v suspenzi před jejich přidáním do misky. Počítání buněk jsme prováděli pomocí Bürkerovy komůrky.

Na této komůrce jsou vyryty dvě počítací mřížky. Každá z nich je rozdělena třemi čarami na 9 velkých čtvercových polí, jejichž strana měří 1 mm. Tato pole jsou tvořena středními čtverci o ploše $1/25 \text{ mm}^2$ a v jejich rozích jsou malé čtverce s plochou $1/400 \text{ mm}^2$. Po stranách středních čtverců jsou obdélníky, jejichž plocha se rovná čtyřem malým čtvercům, tedy $1/100 \text{ mm}^2$. Přikrytím ploch s mřížkami krycím sklem vzniká prostor na počítání buněk vysoký 0,1 mm. [37]



Obr. 17 Bürkerova komůrka [38]

Počet buněk v 1 μl suspenze lze určit vzorcem (1):

$$b = \frac{n}{c \cdot v \cdot h} \cdot z \quad (1)$$

kde b je počet buněk v 1 μl suspenze, n je celkový počet napočítaných buněk, c je počet čtverců ve kterých se počítalo, v je plocha použitého čtverce ($0,0025 \text{ mm}^2$ nebo $0,04 \text{ mm}^2$), h je hloubka komůrky ($0,1 \text{ mm}$), z je použité ředění suspenze.

Teď můžeme ukázat konkrétní příklad počítání množství buněk v 1 μl suspenze. V našem experimentu jsme počítali buňky ve velkých čtvercích o ploše $0,04 \text{ mm}^2$ a spočítali jsme 348 buněk v 16 čtvercích. Číslo ředění suspenze je v našem případě rovno 1. Aplikujeme tak vzorec a dostáváme:

$$b = \frac{348}{16 \cdot 0,04 \cdot 0,1} \cdot 1 \approx 5438 \text{ buněk}$$

Do každé nové sterilní misky jsme přidávali přibližně $5-6 \cdot 10^5$ buněk a do nové kultivační láhve - $8-10 \cdot 10^5$ buněk. Na základě těchto hodnot jsme vypočítali množství buněčné suspenze, které jsme přidávali do každé misky.

6.4 Provedení experimentu s použitím fluorescenčního značení buněk

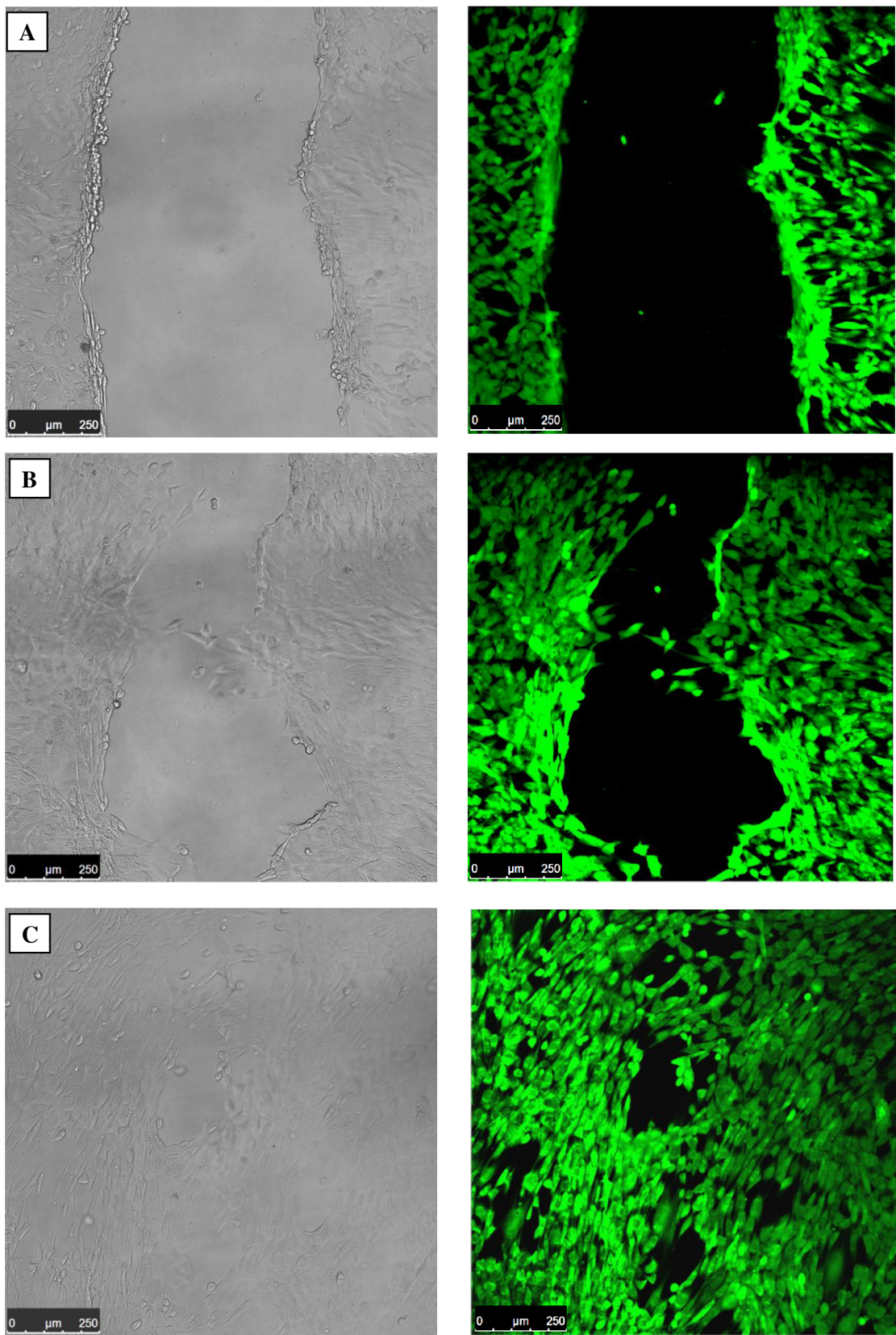
6.4.1 Barvení buněk kalceinem

Po pasážování buňky opět rostou a začnou adherovat na dno misek. Na vytvoření konfluentní monovrstvy budou buňky potřebovat přibližně 2–3 dny.

Postup provedení barvení:

1. Ve sterilní zkumavce smíchat 600 μl média a 0,01 μl kalceinu.
2. Odsát staré médium z misky.
3. Přidat do misky 500 μl směsi média s kalceinem, misku dát do inkubátoru.
4. Po 10 minutové inkubaci odsát médium s kalceinem z misky.
5. Přidat do misky 500 μl média.
6. Špičkou pipety vytvořit rýhu v souvislé vrstvě buněk, odsát médium.
7. Přidat do misky 1000 μl média, buňky zkontrolovat pod mikroskopem.

Další fází bylo pořízení snímků vytvořené rýhy pomocí konfokálního mikroskopu. Pro sledování označených buněk byl využit Leica TCS SP8 X. Vybírali jsme nejvhodnější úseky rýhy (rána měla rovné a hladké okraje a byla dostatečně široká).



*Obr. 18 Snímky buněk 3T3 ve světelném poli (vlevo), ve fluorescenčním poli (vpravo):
 (A) na začátku testu (B) po 18 hodinách (C) po 26 hodinách. Barvivo – kalcein*

První snímky byly získány hned po vytvoření rýhy. Protože pohyb buněk je velmi pomalý, další reprodukovatelné snímky byly pořízeny po 18 hodinách a po 26 hodinách. V intervalech mezi snímky bylo nutné vrátit misku do inkubátoru.

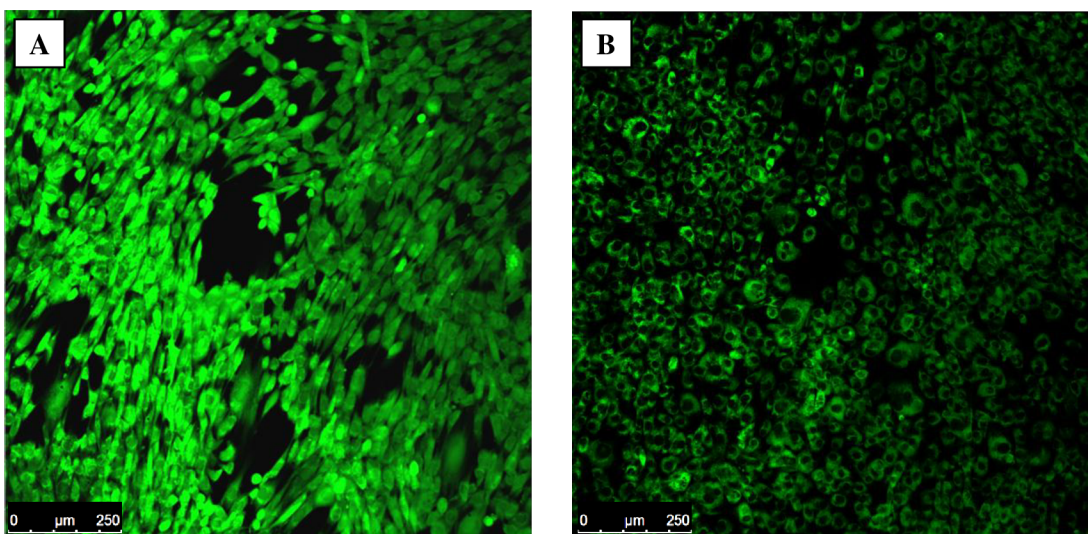
Obrázek 18 reprezentuje snímky získané pomocí konfokálního mikroskopu v experimentu *Scratch Wound Healing Assay*. Po ozáření světlem o vlnové délce 490 nm obarvené kalceinem buňky emitují světlo v zeleném spektru (500–560 nm), což umožňuje jejich další kvalitativní a kvantitativní analýzu.

Jak vidíme na obrázku 18 A, špičkou pipety byla v monovrstvě buněk vytvořena rýha průměrné šířky 500–550 μm .

Na obrázku 18 B vidíme, že buňky na okraji rýhy polarizují a začínají migrovat směrem ke středu této rýhy. Proces bude trvat tak dlouho, dokud se „rána“ úplně nezahojí.

Na obrázku 18 C můžeme pozorovat buňky, které pokračují v migraci do středu rýhy. Pokud bychom neměli nakreslenou mřížku na dně misky, tak by bylo obtížné najít úsek vybraný pro pořízení snímků. Po 26 hodinách migrace jsme nemohli pozorovat rýhu jako takovou, ale jen jednotlivé malé úseky bez buněk. Pokud bychom pokračovali v inkubaci buněk a snímání místa rány, došlo by k úplnému spojení její okrajů.

Jako fluorescenční barvivo pro daný experiment jsme použili kalcein. Obarvené kalceinem buňky vykazují fluorescenci po dobu maximálně 6 hodin, což pro nás nebylo dostačující. S časem intenzita fluorescence klesala. To mělo negativní vliv na kvalitu mikroskopických snímků (viz Obrázek 19).



Obr. 19 Intenzita fluorescence buněk (A) hned po obarvení (B) po 6 hodinách inkubace

Proto pro získání kvalitních mikroskopických snímků jsme prováděli dodatečné barvení buněk. Postup a použité koncentrace jsou stejné jako v případě prvního barvení buněk na začátku experimentu (před vytvořením rýhy).

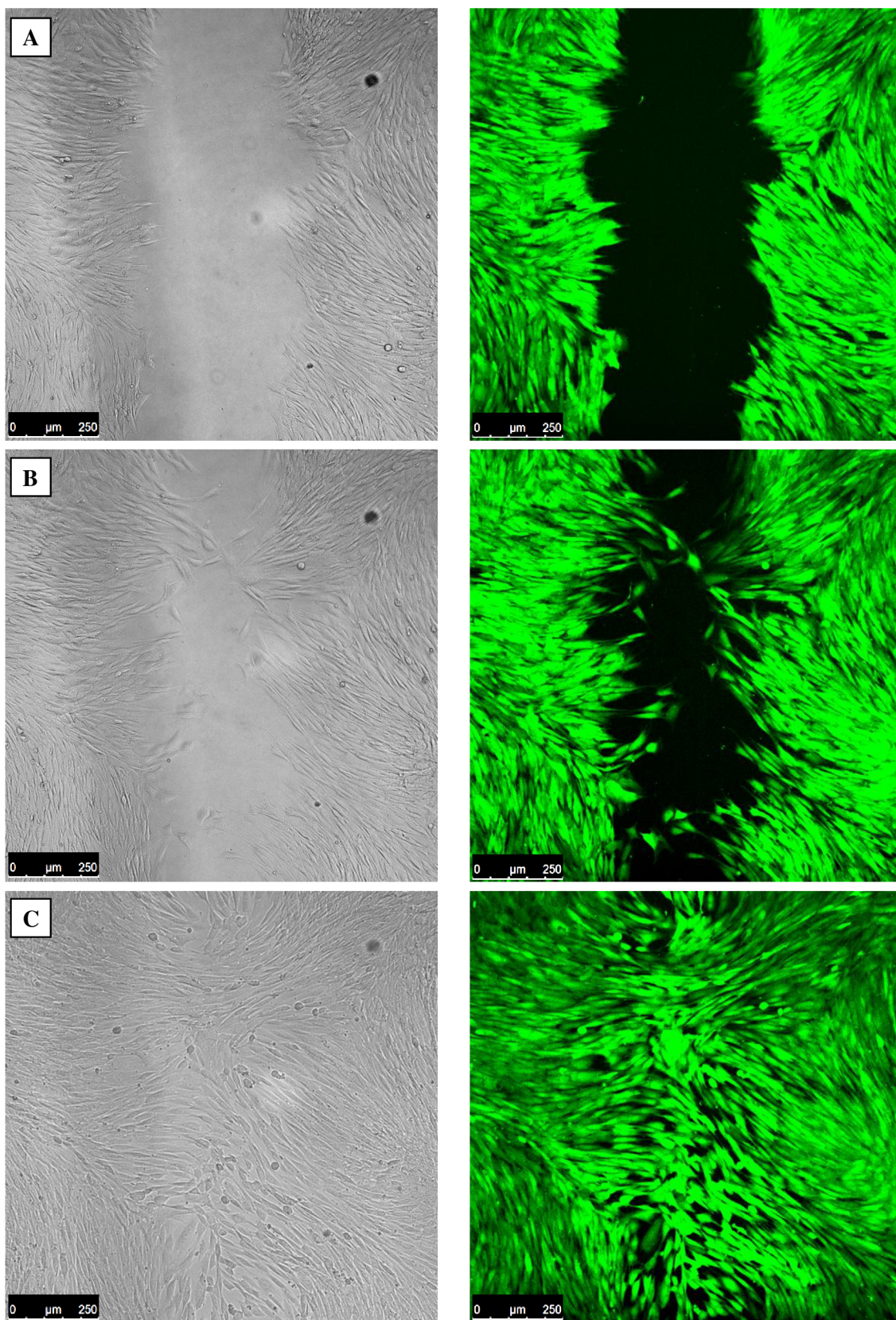
6.4.2 Barvení buněk CellTracker™ Green CMFDA

Pro značení buněk 3T3 v *Scratch Wound Healing Assay* experimentu jsme použili další fluorescenční barvivo CellTracker™ Green CMFDA. Jak již bylo výše zmíněno, buňky značené daným barvivem vykazují fluorescenci po dobu nejméně 24 hodin. Tím eliminujeme nutnost dodatečného barvení buněk v průběhu experimentu, které může snížit životaschopnost buněk a zhoršit jejich adhezi na povrch misky.

Postup provedení barvení:

1. Ve sterilní zkumavce smíchat 800 μ l média (bez přídavku fetálního bovinního séra) a 1,4 μ l CellTracker™ Green CMFDA.
2. Odsát staré médium z misky.
3. Přidat do misky směs média s fluorescenčním barvivem, misku dát do inkubátoru.
4. Po 20 minutové inkubaci odsát médium s CellTracker™ Green CMFDA z misky.
5. Přidat do misky 500 μ l média.
6. Špičkou pipety vytvořit rýhu v souvislé vrstvě buněk, odsát médium.
7. Přidat do misky 1000 μ l média, buňky zkontrolovat pod mikroskopem a dát do inkubátoru na 10 minut.

Obrázek 20 reprezentuje další snímky získané v experimentu *Scratch Wound Healing Assay*. V tomto případě jsme ale použili CellTracker™ Green CMFDA jako fluorescenční barvivo. Postup pořízení snímků pomocí konfokálního mikroskopu byl stejný jako v případě barvení kaceinem. Po ozáření světlem o vlnové délce 490 nm buňky emitují světlo v zeleném spektru (500–560 nm).



*Obr. 20 Snímky buněk 3T3 ve světelném poli (vlevo), ve fluorescenčním poli (vpravo):
 (A) na začátku testu (B) po 17 hodinách (C) po 40 hodinách. Barvivo – CMFDA*

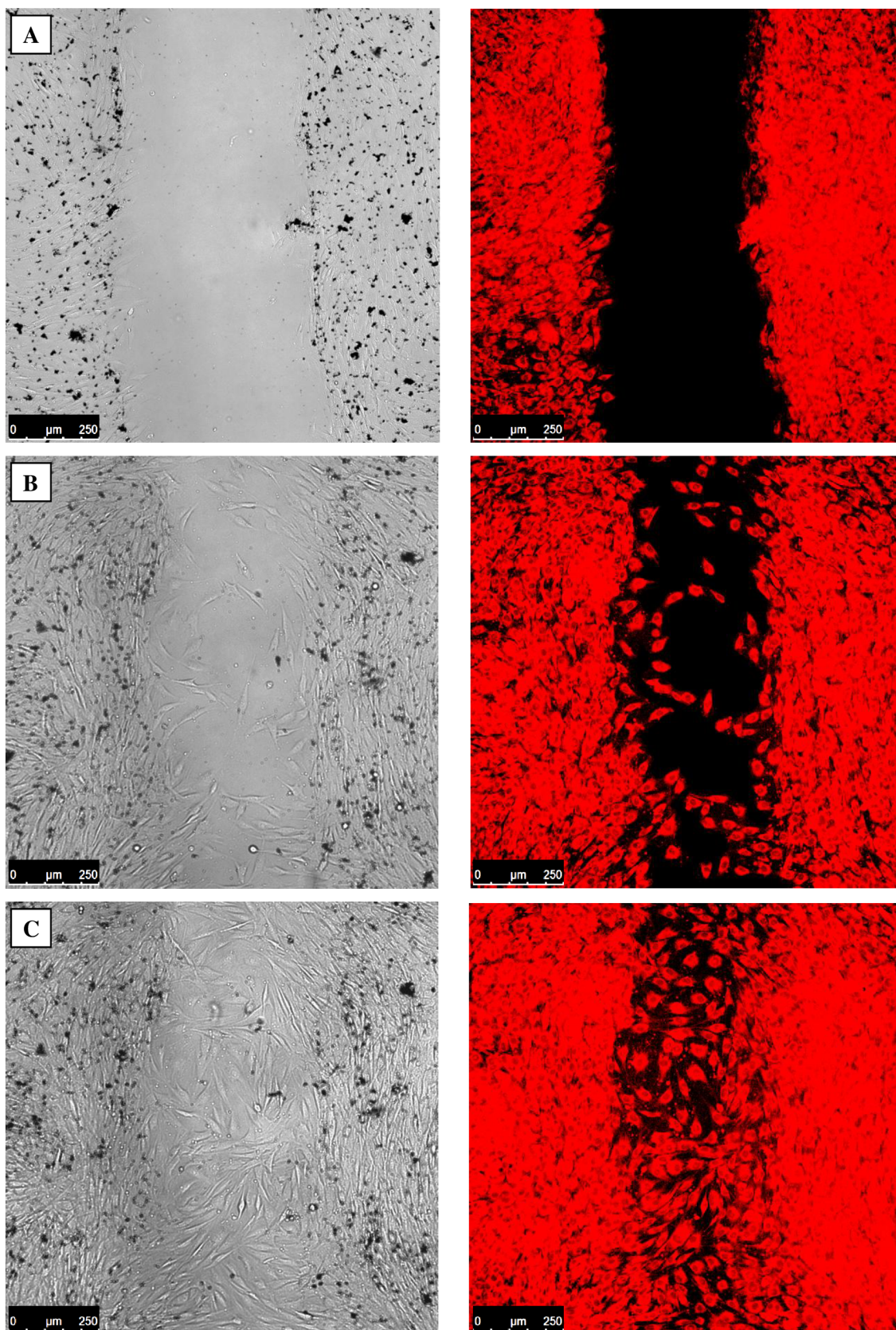
6.4.3 Barvení buněk pomocí značených nanočástic

Jako alternativní fluorescenční barvivo v *Scratch Wound Healing Assay* experimentu jsme použili kovové železité nanočástice značené rhodaminem. Jak již bylo zmíněno výše, rhodamin je heterocyklická sloučenina ze skupiny organických fluoroforů.

Postup provedení barvení:

1. Odsát staré médium z misky.
2. Přidat do misky 900 μl čerstvého média.
3. Ve sterilní zkumavce smíchat 100 μl média a 100 μl suspenze nanočástic (koncentrace 1 mg/ml).
4. Důkladně resuspendovat směs média s nanočásticemi.
5. Ihned po resuspendaci přidat směs do misky.
6. Misku se směsí opatrně, ale důkladně promíchat krouživým pohybem.
7. Misku dát do inkubátoru.
8. Po šestihodinové inkubaci odsát médium s nanočásticemi z misky.
9. Přidat do misky 500 μl média.
10. Špičkou pipety vytvořit rýhu v souvislé vrstvě buněk, odsát médium.
11. Přidat do misky 1000 μl média, buňky zkontrolovat pod mikroskopem.

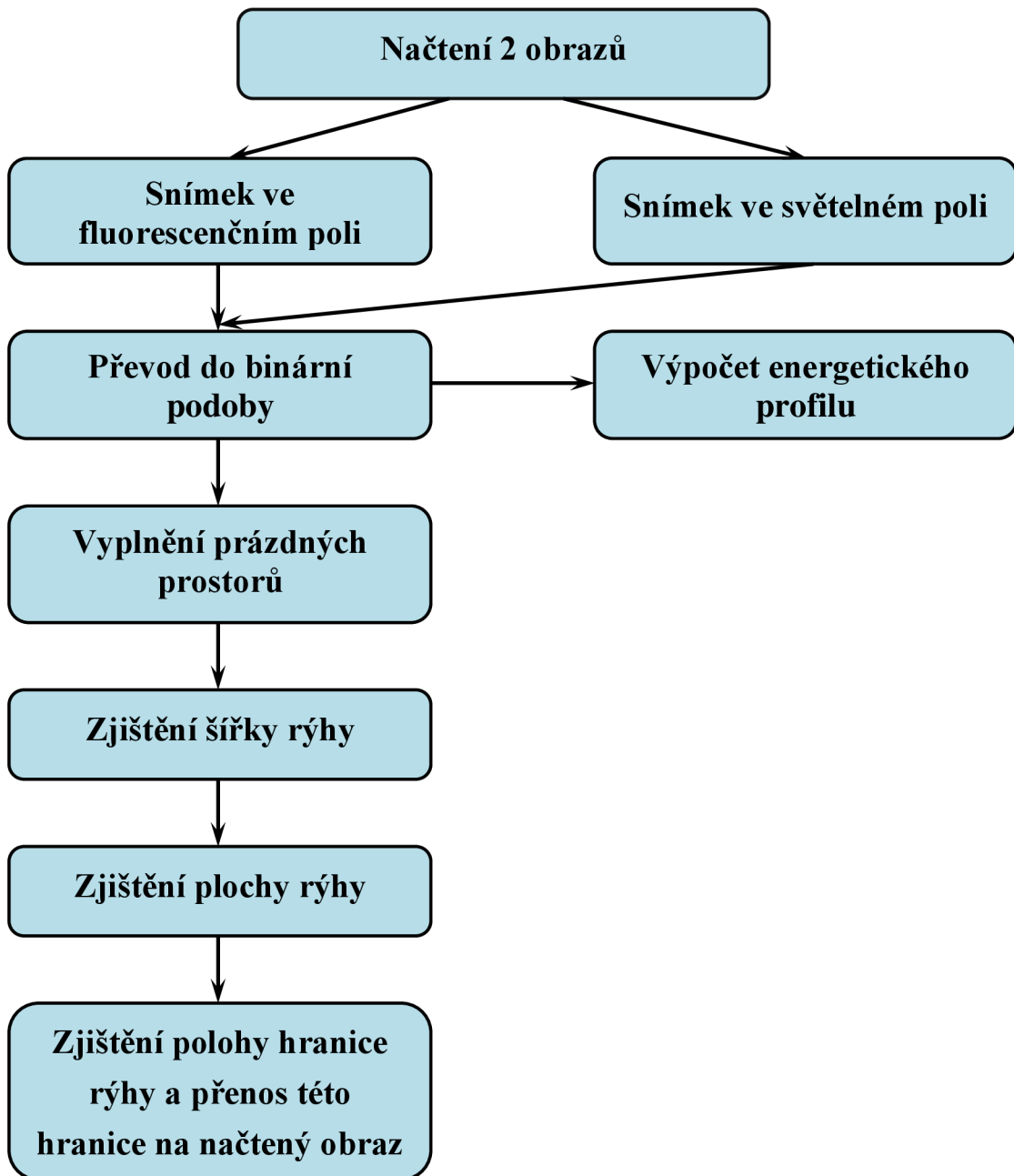
Obrázek 21 reprezentuje snímky získané v experimentu *Scratch Wound Healing Assay*. Jako fluorescenční barvivo byly použity nanočástice značené rhodaminem. Postup pořízení snímků pomocí konfokálního mikroskopu byl stejný jako v případě barvení kaceinem a CellTracker™ Green CMFDA. Po ozáření světlem o vlnové délce 560 nm buňky emitují světlo v červeném spektru (570–640 nm).



Obr. 21 Snímky buněk 3T3 ve světelném poli (vlevo), ve fluorescenčním poli (vpravo): (A) na začátku testu (B) po 17 hodinách (C) po 40 hodinách. Barvivo – SPIO-R nanočástice

6.5 Popis algoritmu navrženého v programovém prostředí MATLAB

Za účelem analýzy nasnímaných obrazů buněk 3T3 byl navržen algoritmus v programovém prostředí MATLAB (verze R2015b), jehož názorné schéma je na obrázku (viz Obrázek 22).



Obr. 22 Navržený algoritmus v programovém prostředí MATLAB

Algoritmus umožňuje současnou statistickou analýzu dvou buněčných snímků – ve fluorescenčním a světelném polích – stejného úseku rýhy ve stejný čas. To nám pomůže znázornit výsledky aplikace daného algoritmu na vybrané snímky.

Navržený algoritmus slouží k detekci hranice rýhy v různých časových okamžicích a znázornění procesu hojení rány. Pomocí vyvinuté funkce můžeme také spočítat šířku a plochu rýhy a vykreslit intenzitní profil obrazu.

Po spuštění algoritmu dojde nejprve k načtení zvolených snímků (funkce *imread*) a převodu snímků do binární podoby na základě stanoveného prahu (funkce *im2bw*). Z vytvořených binárních obrázků sumací po sloupcích můžeme vypočítat intenzitní profily.

Poté následuje aplikace morfologických operací – uzavření a otevření. Avšak nejdříve je potřeba nastavit masku operace pomocí funkce *strel*, která má dva parametry: první stanovuje tvar masky a druhý její velikost.

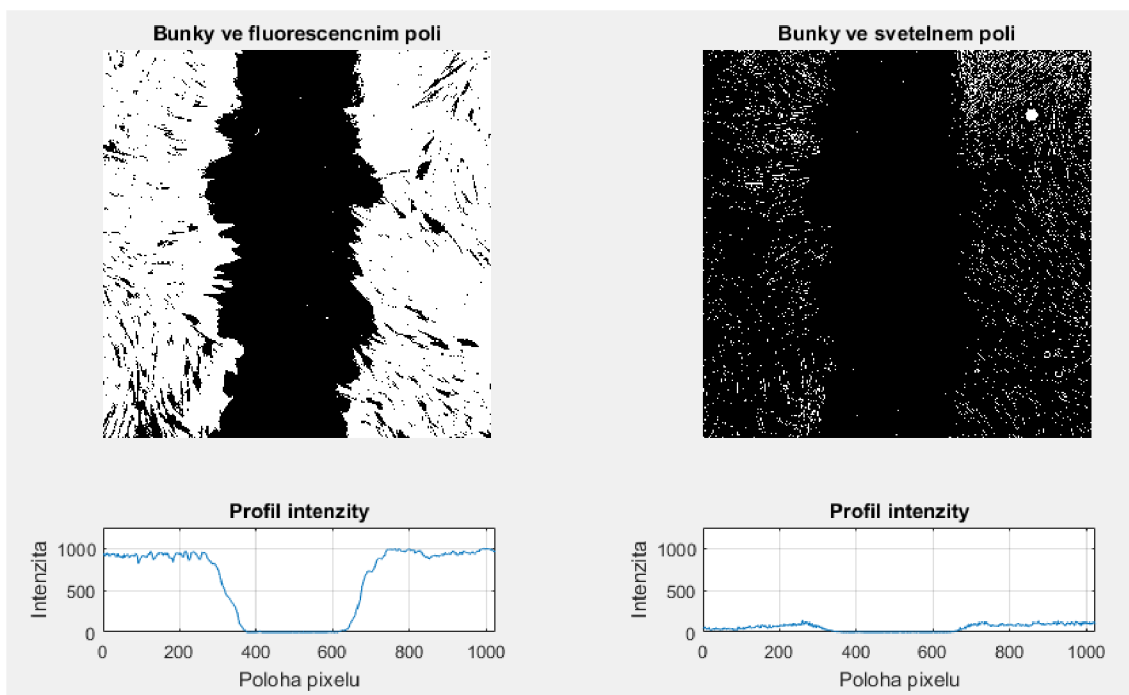
Operace uzavření je realizována příkazem *imclose* a je složena z dilatace a následné eroze. Morfologické uzavření spojuje blízké objekty a zaplňuje díry, míra spojení a zaplnění je dána velikostí a tvarem masky. Operace otevření je realizována příkazem *imopen* a je složena z eroze a následné dilatace. Morfologické otevření odstraňuje šum (maže malé předměty a čáry) a vyhlazuje hrany objektů, míra redukce šumu je dána velikostí a tvarem masky. Po použití morfologických operací jsou ve snímcích zaplněny veškeré dutiny pomocí funkce *imfill*. [39]

Následně je vypočítána šířka vytvořené rýhy jako průměrný počet černých pixelů přes všechny řádky snímku. Získaná šířka je pak vyjádřena v mikrometrech. Plocha rýhy je vypočítána jako součet všech černých pixelů obrazu. Pro přehlednost je plocha vyjádřena v milimetrech čtverečních.

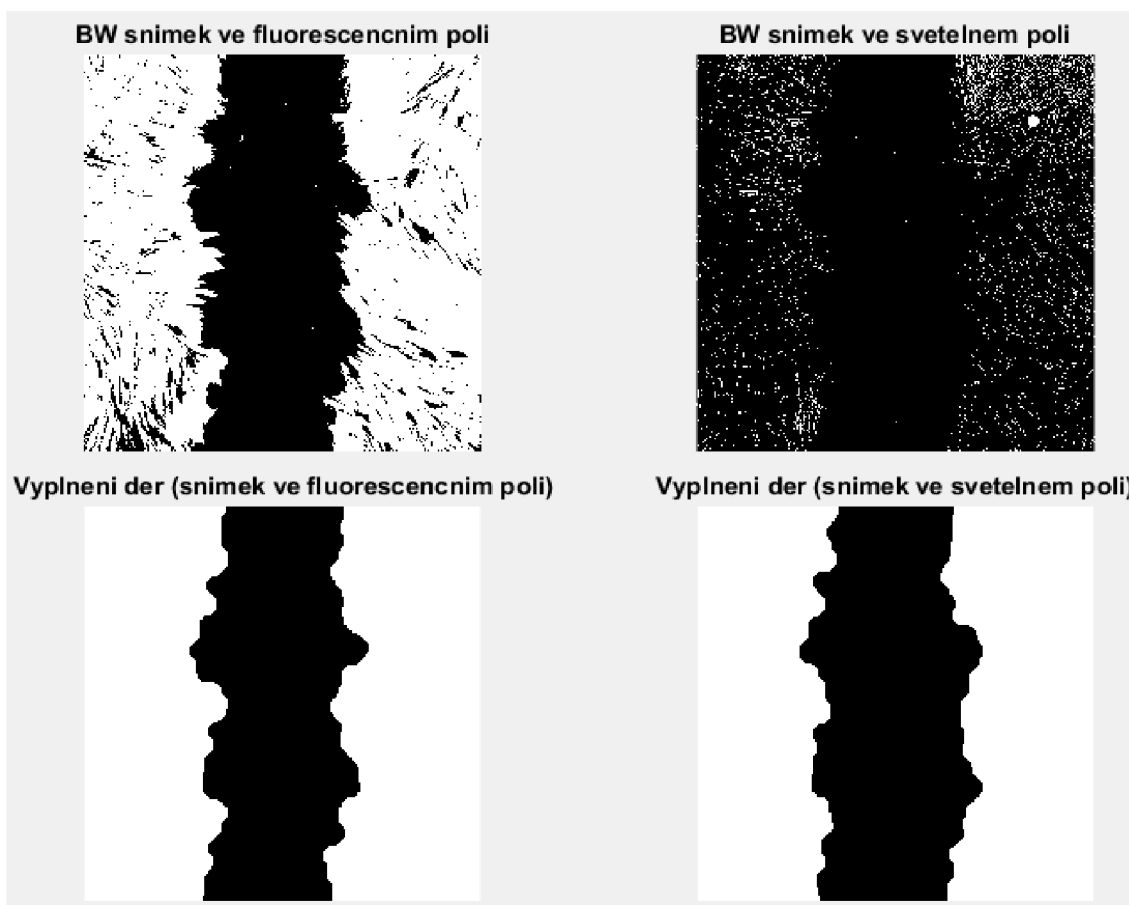
Posledním krokem je zjištění polohy hranice rýhy. To bylo dosaženo porovnáním sousedních pixelů v jednom řádku obrazu. Ve chvíli, kdy došlo ke změně černé barvy na bílou (a naopak) v binárním obrazu, do nové matice byly zapsány pozice těchto pixelů. Poté jsme sečetli vstupní snímek s maticí pozic pixelů, čímž byly příslušné pixely vstupního obrazu označeny zvolenou barvou. Níže jsou uvedeny výstupy navrženého algoritmu (viz Obr. 23, Obr. 24, Obr. 25, Obr. 26).

Pomocí mikroskopu byl získán určitý počet řezů pro každý mikroskopický snímek o rozměrech $1,16 \times 1,16 \text{ mm}^2$. Překrytím získaných řezů v softwaru MATLAB je složen každý výsledný obraz. Velikost jednoho pixelu obrazu je $1,2996 \text{ } \mu\text{m}^2$.

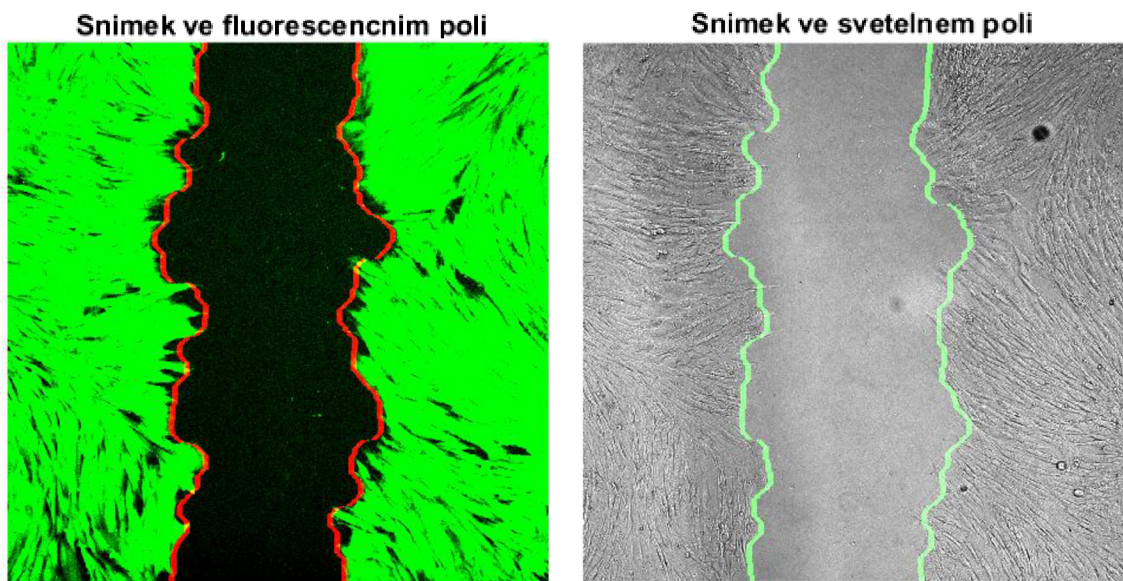
Nevýhodou algoritmu je že není univerzální. Někdy může docházet k nesprávné detekci. To je způsobeno tím, že každý obraz je jiný, má jiný kontrast a jas.



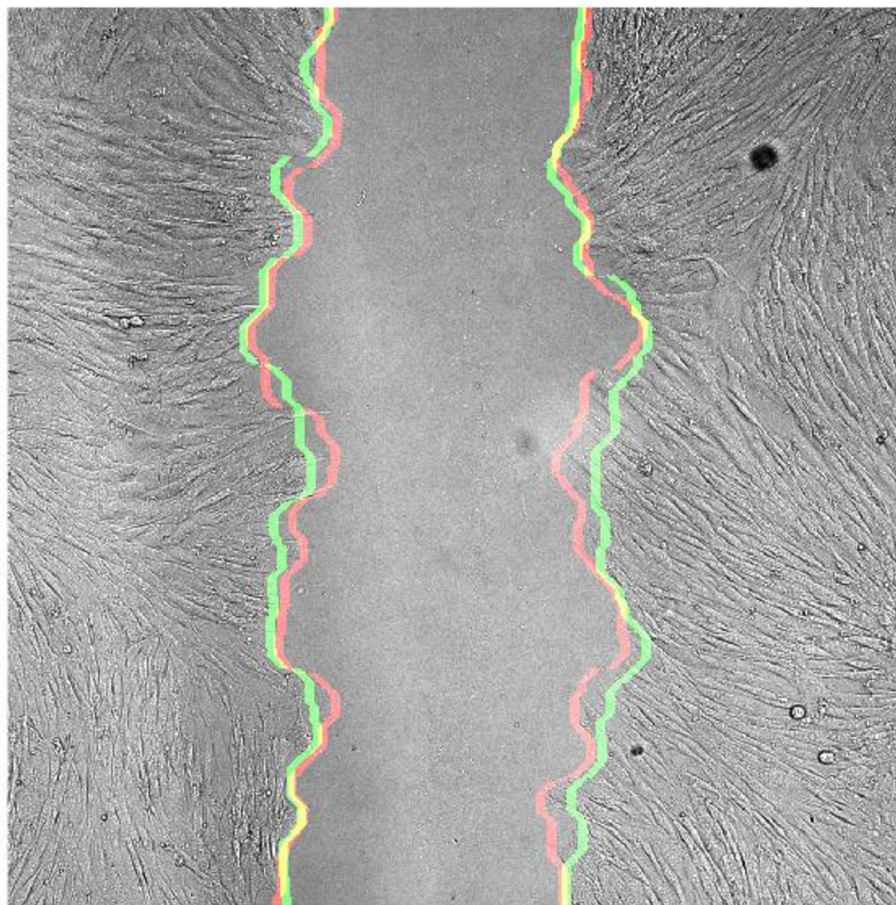
Obr. 23 Převod snímků do binární podoby



Obr. 24 Vyplnění děr v snímcích



Obr. 25 Kreslení detekované hranice rýhy



Obr. 26 Porovnání detekcí ve dvou polích. Hranice která byla detekována ve fluorescenčním poli je červená, ve světelném poli je zelená

6.6 Výsledky získané v průběhu Scratch Wound Healing

Assay experimentu

Pro akvizici dat jsme si zvolili misky s buňkami, které byly získány ze stejné kultivační nádoby a ze stejné pasáže. Kultivace buněk probíhala také za stejných podmínek. To všechno nám umožňuje provést kvalitní statistickou analýzu v dalších kapitolách této práce.

Po aplikaci navrženého algoritmu na mikroskopické snímky byly získány číselné hodnoty, které jsme zanesli do tabulek (viz Tab.1, Tab.2, Tab.3, Tab.4, Tab.5, Tab.6).

6.6.1 Aplikace algoritmu na tři sérii snímků

První skupina obsahuje snímky buněk, které byly získány hned po vytvoření rýhy, po 17 hodinách a po 40 hodinách inkubace – tři sérii snímků. Průměrná šířka rýhy byla větší než 500 μm .

Tab. 1 Scratch Wound Healing Assay experiment: tři sérii snímků, buňky bez barvení

Úsek rýhy	Buňky bez značení fluorescenčními barvivou (snímek ve světelném poli)					
	0 hodin po vytvoření rýhy		17 hodin po vytvoření rýhy		40 hodin po vytvoření rýhy	
	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm^2]	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm^2]	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm^2]
1	624,83240	0,72940	276,61810	0,32291	1,45950	0,00170
2	550,87830	0,64307	186,46240	0,21767	0,00000	0,00000
3	689,56970	0,80498	378,89750	0,44231	0,00000	0,00000
4	529,14810	0,61771	374,27070	0,43691	27,71850	0,03236
5	631,61120	0,73732	456,72590	0,53316	6,03620	0,00705
6	531,38580	0,62032	311,64530	0,36380	9,90710	0,01157
7	550,30380	0,64240	292,08710	0,34097	45,58000	0,05320
8	546,39840	0,63784	236,30840	0,27586	7,14280	0,00834
9	556,06170	0,64912	346,42970	0,40441	10,42140	0,01217
10	513,58450	0,59954	234,01280	0,27318	12,00900	0,01402

Tab. 2 Scratch Wound Healing Assay experiment: tři sérií snímků, buňky obarvené CMFDA

Úsek rýhy	Čas pořízení snímku [hod]	Buňky značené fluorescenčním barvivem CMFDA			
		Snímek ve fluorescenčním poli		Snímek ve světelném poli	
		Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]
1	0	595,06220	0,69465	591,93280	0,69100
	17	427,51780	0,49907	424,18460	0,49518
	40	29,87820	0,03488	56,30530	0,06573
2	0	605,77640	0,70716	590,17820	0,68895
	17	473,80360	0,55310	478,94580	0,55910
	40	64,30200	0,07506	24,07250	0,02810
3	0	580,74320	0,67794	621,19760	0,72516
	17	386,20620	0,45084	361,97000	0,42255
	40	1,26470	0,00148	0,00000	0,00000
4	0	583,64210	0,68132	579,71230	0,67673
	17	421,99040	0,49261	402,28860	0,46962
	40	4,07460	0,00476	1,54860	0,00181
5	0	505,46090	0,59005	513,54330	0,59949
	17	235,31650	0,27470	261,28150	0,30501
	40	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
6	0	513,63120	0,59959	546,04110	0,63743
	17	354,47770	0,41380	350,57340	0,40925
	40	9,86810	0,11152	8,74480	0,10208
7	0	541,07470	0,63163	595,66670	0,69536
	17	389,64180	0,45485	349,89650	0,40846
	40	7,82080	0,00913	4,57340	0,00534
8	0	451,80070	0,52741	516,98000	0,60350
	17	279,85440	0,32669	263,28990	0,30735
	40	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

Úsek rýhy	Čas pořízení snímku [hod]	Buňky značené fluorescenčním barvivem CMFDA			
		Snímek ve fluorescenčním poli		Snímek ve světelném poli	
		Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]
9	0	495,10960	0,57797	531,45260	0,62040
	17	145,11960	0,16941	198,80980	0,23208
	40	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
10	0	447,23070	0,52208	537,55790	0,62752
	17	281,48760	0,32860	270,75450	0,31607
	40	15,43010	0,01801	11,34100	0,01324

*Tab. 3 Scratch Wound Healing Assay experiment: tři sérii snímků,
buňky obarvené SPIO-R nanočásticemi*

Úsek rýhy	Čas pořízení snímku [hod]	Buňky značené SPIO-rhodamin nanočásticemi			
		Snímek ve fluorescenčním poli		Snímek ve světelném poli	
		Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]
1	0	512,40660	0,59745	492,02910	0,57369
	17	212,82490	0,24815	271,55040	0,31662
	40	0,00000	0,00000	5,55080	0,00647
2	0	536,51360	0,62556	535,23780	0,62407
	17	283,69410	0,33078	259,44130	0,30250
	40	0,00000	0,00000	3,03590	0,00354
3	0	578,43420	0,67444	571,14560	0,66594
	17	391,54770	0,45653	363,61210	0,42396
	40	31,73300	0,03700	62,49070	0,07286
4	0	560,50710	0,65353	554,58880	0,64663
	17	263,37340	0,30708	275,02500	0,32067
	40	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

Úsek rýhy	Čas pořízení snímku [hod]	Buňky značené SPIO-rhodamin nanočásticemi			
		Snímek ve fluorescenčním poli		Snímek ve světelném poli	
		Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]
5	0	547,29690	0,63813	512,49460	0,59755
	17	191,70370	0,22352	185,29560	0,21605
	40	0,00000	0,00000	6,56280	0,00765
6	0	573,70170	0,66892	593,55370	0,69206
	17	380,32580	0,44345	342,84830	0,39975
	40	1,82130	0,00212	0,00000	0,00000
7	0	698,02180	0,81387	711,14740	0,82917
	17	487,13740	0,56799	465,39500	0,54264
	40	25,24250	0,02943	14,55280	0,01697
8	0	513,85050	0,59913	481,75580	0,56171
	17	201,89130	0,23540	194,76300	0,22709
	40	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
9	0	548,90110	0,64000	535,12870	0,62394
	17	300,47790	0,35035	284,31530	0,33150
	40	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
10	0	604,63970	0,70499	611,65120	0,71317
	17	330,57440	0,38544	295,99140	0,34512
	40	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

6.6.2 Aplikace algoritmu na dvě sérií snímků

Druhá skupina obsahuje snímky buněk, které byly získány hned po vytvoření rýhy a po 24 hodinách – dvě sérií snímků. Průměrná šířka rýhy byla menší než 500 μm .

Tab. 4 Scratch Wound Healing Assay experiment: dvě sérií snímků, buňky bez barvení

Úsek rýhy	Buňky bez značení fluorescenčními barvivy (snímek ve světelném poli)			
	0 hodin po vytvoření rýhy		24 hodiny po vytvoření rýhy	
	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm^2]	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm^2]
1	473,82700	0,55313	10,16200	0,01186
2	388,07870	0,45303	7,05820	0,00824
3	460,54220	0,53762	0,00000	0,00000
4	346,51880	0,40451	0,00000	0,00000
5	432,65230	0,50506	6,05620	0,00707
6	391,66680	0,45722	1,33370	0,00156
7	368,98930	0,43074	0,00000	0,00000
8	354,97080	0,41438	0,00000	0,00000
9	461,51520	0,53875	5,29370	0,00618
10	392,45840	0,45814	3,72620	0,00435

Tab. 5 Scratch Wound Healing Assay experiment: dvě sérií snímků, buňky obarvené CMFDA

Úsek rýhy	Čas pořízení snímku [hod]	Buňky značené fluorescenčním barvivem CMFDA			
		Snímek ve fluorescenčním poli		Snímek ve světelném poli	
		Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]
1	0	412,20460	0,48119	420,98170	0,49144
	24	10,92460	0,01275	0,00000	0,00000
2	0	329,50900	0,38466	337,62370	0,39413
	24	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
3	0	403,65460	0,47121	412,81470	0,48190
	24	0,00000	0,00000	1,43610	0,00168
4	0	401,05730	0,46818	395,78260	0,46202
	24	5,20010	0,00607	3,06490	0,00358
5	0	362,36300	0,42301	371,04770	0,43315
	24	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
6	0	371,73130	0,43394	398,52910	0,46523
	24	0,00000	0,00000	2,09300	0,00244
7	0	429,34800	0,50120	425,39030	0,49658
	24	14,52160	0,01695	8,90630	0,01040
8	0	358,48990	0,41849	350,63790	0,40932
	24	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
9	0	381,17750	0,44497	383,40520	0,44757
	24	21,14570	0,02469	10,29340	0,01202
10	0	372,26900	0,43457	384,73220	0,44912
	24	4,07460	0,00476	9,86370	0,01151

Tab. 6 Scratch Wound Healing Assay experiment: dvě sérii snímků, buňky obarvené SPIO-R nanočásticemi

Úsek rýhy	Čas pořízení snímku [hod]	Buňky značené SPIO-rhodamin nanočásticemi			
		Snímek ve fluorescenčním poli		Snímek ve světelném poli	
		Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]	Šířka rýhy [μm]	Plocha rýhy [mm ²]
1	0	358,24500	0,41770	379,41400	0,44238
	24	5,69890	0,00664	0,00000	0,00000
2	0	440,04110	0,51307	425,53510	0,49616
	24	4,34960	0,00507	0,00000	0,00000
3	0	425,89800	0,49658	445,27350	0,51917
	24	5,53860	0,00646	2,19210	0,00256
4	0	440,81260	0,51397	463,52020	0,54045
	24	2,25880	0,00263	1,35040	0,00157
5	0	447,22180	0,52145	480,18830	0,55988
	24	6,96580	0,00812	5,22130	0,00609
6	0	401,78430	0,46847	395,00330	0,46056
	24	1,56970	0,00183	0,00000	0,00000
7	0	404,57200	0,47172	460,78040	0,53726
	24	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
8	0	343,05650	0,39990	373,71290	0,43574
	24	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
9	0	468,37520	0,54611	503,20540	0,58672
	24	5,33260	0,00622	7,48460	0,00873
10	0	393,82880	0,45919	355,53080	0,41454
	24	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

7 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ EXPERIMENTU

Do tabulek (viz výše) jsme zanesli hodnoty šířky a plochy rýhy, které byly zjištěny aplikací navrženého algoritmu na snímky. Hodnoty jsou podkladem pro analýzu experimentu pomocí statistických testů. Analýzu jsme rozdělili na 2 části. Nejprve zkusíme analyzovat, jestli použitá barviva mají vliv na životaschopnost buněk a rychlost buněčné migrace. Ve druhé části zjistíme, jestli je patrný rozdíl mezi detekcemi hranice rýhy ve dvou polích.

7.1 Hodnocení vlivu barviv na rychlost buněčné migrace

Základem analýzy bude porovnávání šířky rýhy ve všech testových skupinách (buňky bez barvení, buňky obarvené CMFDA, buňky s přidáním SPIO-R nanočásticemi). Chceme ověřit, zda je střední hodnota šířka rýhy přibližně stejná podle času ve všech skupinách.

Statistické metody, které umožňují provádět vícenásobné porovnávání středních hodnot, jsou soustředěny pod souhrnným názvem analýza rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance). Tato metoda je založena na hodnocení vztahů mezi rozptyly porovnávaných výběrových skupin. Metoda je vhodným testem pro více než dva výběry. Jsme si zvolili jednofaktorovou analýzu rozptylu, nebo one-way ANOVA (příkaz *anova1* v MATLAB), protože analyzujeme účinek jednoho faktoru (barvení) na rychlost buněčné migrace.

Analýza rozptylu má stejně jako většina dalších statistických testů svoje předpoklady, bez jejichž splnění nelze na její výsledky spoléhat. Předpoklady analýzy rozptylu jsou následující:

- nezávislost měření (uvnitř skupin i mezi skupinami);
- normální rozdělení dat v jednotlivých skupinách;
- stejný rozptyl hodnot ve všech srovnávaných skupinách.

Pro ověření předpokladu normálního rozložení a shody rozptylu dat ve skupinách jsme použili Vícevýběrový test o shodnosti (homogenitě) rozptylů (F-test, příkaz *vartestn* v MATLAB).

Výsledkem obou testů je tzv. p-hodnota, která určuje, na jaké hladině významnosti je možné zamítnout nulovou hypotézu. Porovnává se nejčastěji s hodnotou 0,05 a je-li p-hodnota menší, zamítáme nulovou hypotézu.

Na začátku musíme ověřit rozložení dat a rozptyl v každé testovací skupině pomocí F-testu. Nulovou a alternativní hypotézu F-testu vyjádříme jako:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2, \quad H_A: \neg H_0 \quad (2)$$

kde σ_1^2 je rozptyl ve skupině „Bez barvení“, σ_2^2 je rozptyl ve skupině „CMFDA“ a σ_3^2 je rozptyl ve skupině „Nanočástice“.

Výsledné p-hodnoty F-testu jsme zanesli do tabulek (viz Tab.7 a Tab.8):

Tab. 7 F-test (tři sérií snímků)

Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy	p-hodnota
0 hodin	0,2500
17 hodin	0,9794
40 hodin	0,6761

Tab. 8 F-test (dvě sérií snímků)

Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy	p-hodnota
0 hodin	0,2615
24 hodin	0,3623

Jak vidíme z tabulky, ve všech skupinách jsme prokázali shodu rozptylu (p-hodnota F-testu je větší než 0,05 ve všech skupinách, což znamená, že nezamítáme nulovou hypotézu). Data v jednotlivých skupinách splňují předpoklady parametrického ANOVA testu.

Stejně jako u F-testu musíme vyjádřit nulovou a alternativní hypotézu pro one-way ANOVA:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3, \quad H_A: \neg H_0 \quad (3)$$

kde μ_1 je střední hodnota šířky rýhy ve skupině „Bez barvení“, μ_2 je střední hodnota šířky rýhy ve skupině „CMFDA“ a μ_3 je střední hodnota šířky rýhy ve skupině „Nanočástice“.

Výsledné p-hodnoty one-way ANOVA testu jsme zanesli do tabulek (viz Tab.9 a Tab.10):

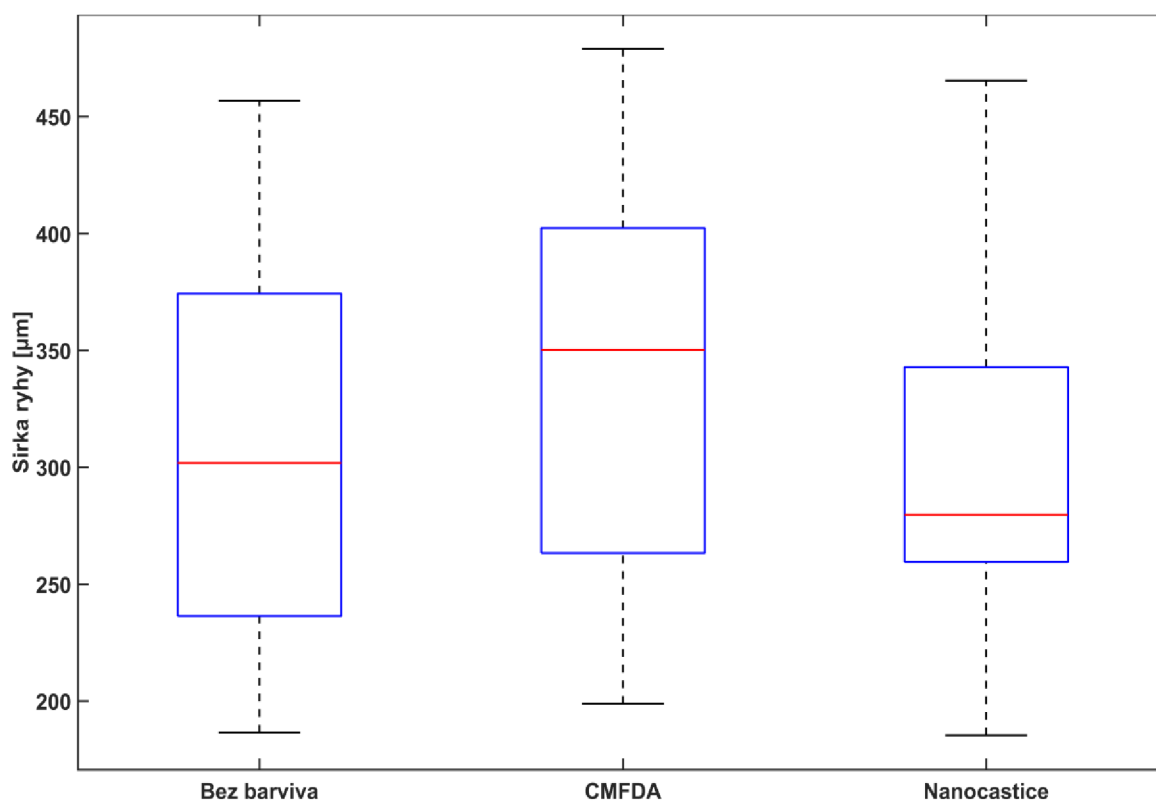
Tab. 9 One-way ANOVA (tři sérií snímků)

Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy	p-hodnota
0 hodin	0,86785
17 hodin	0,52440
40 hodin	0,93602

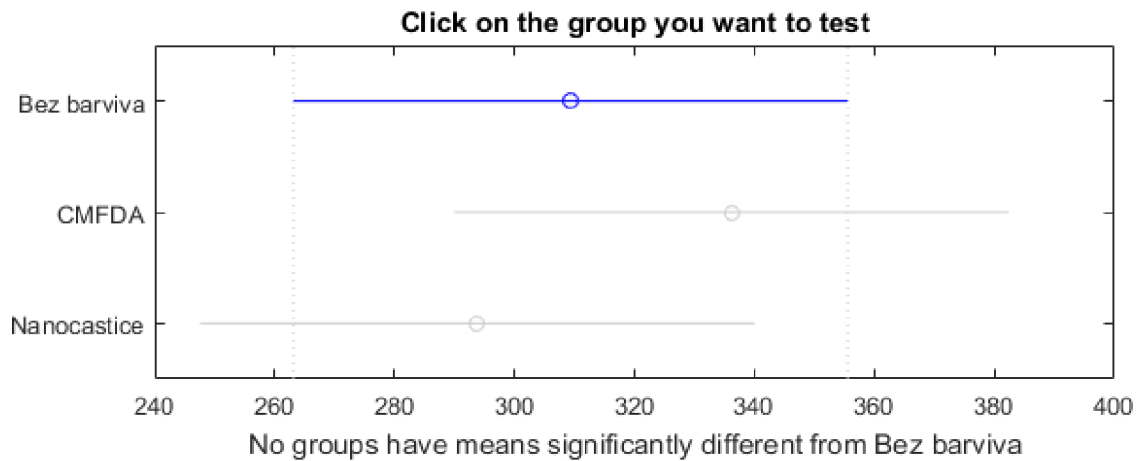
Tab. 10 One-way ANOVA (dvě sérií snímků)

Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy	p-hodnota
0 hodin	0,13195
24 hodin	0,43223

Níže jsou uvedeny příklady grafických výstupů statistických testů (viz Obr. 27 a Obr. 28).



Obr. 27 Krabicový diagram (boxplot). Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy – 17 hodin.
Výběrová skupina – tři sérií snímků

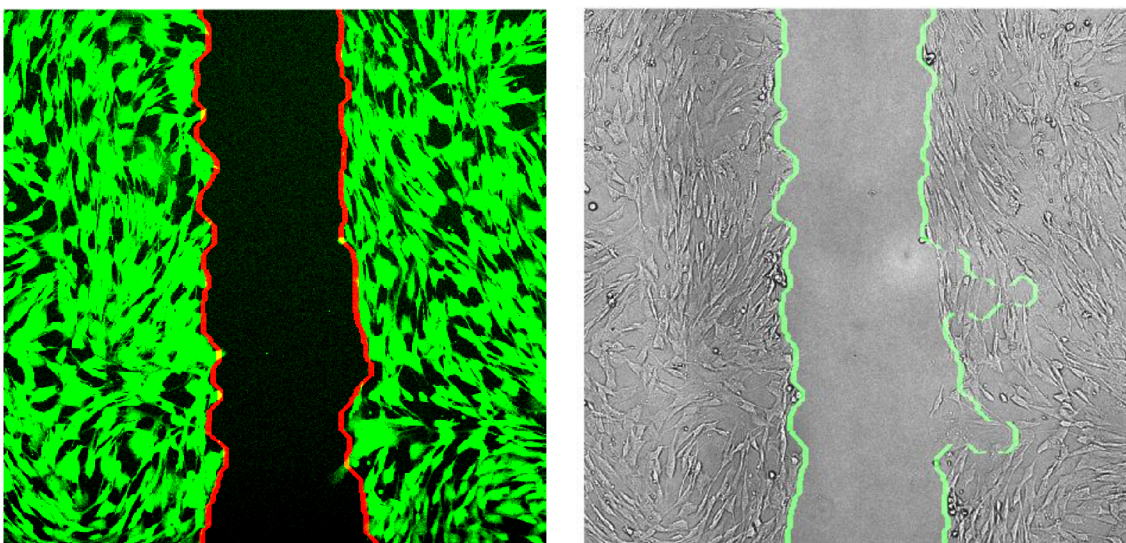


Obr. 28 Jednofaktorová analýza rozptýlu (one-way ANOVA). Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy – 17 hodin. Výběrová skupina – tři sérii snímků

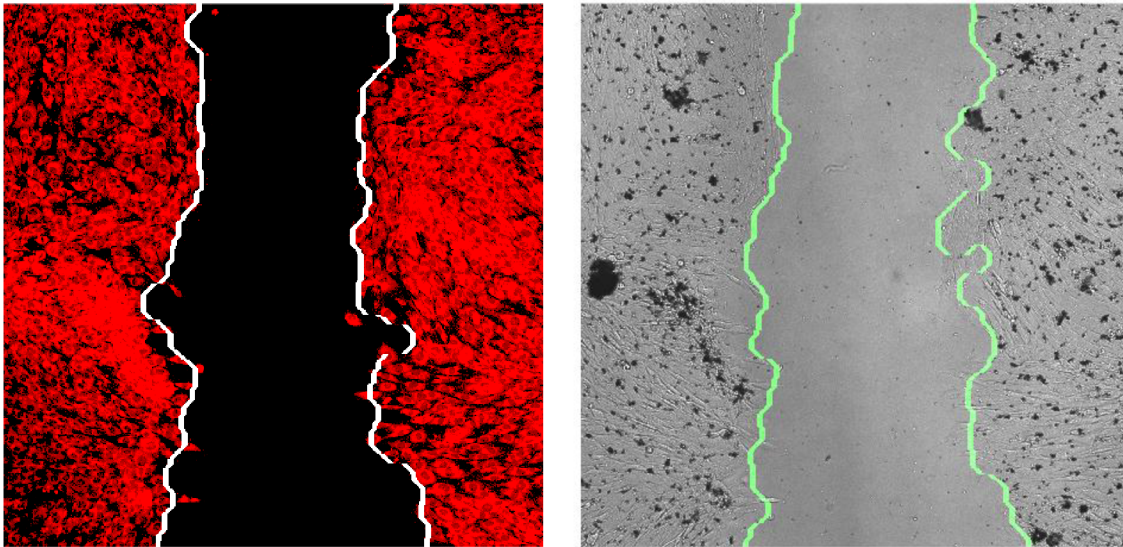
Z tabulek je patrné, že ve všech skupinách jsme prokázali shodu středních hodnot šířky rýhy (p-hodnota testu ANOVA je větší než 0,05 ve všech skupinách, což znamená, že nezamítáme nulovou hypotézu). Tím jsme prokázali, že použitá barviva nemají statisticky významný vliv na rychlost buněčné migrace.

7.2 Analýza rozdílu mezi detekcemi hranice rýhy ve dvou polích

Teď zkusíme analyzovat přínos fluorescenčního značení buněk s pohledu kvality detekce hranice rýhy.



Obr. 29 Porovnání detekce rýhy ve fluorescenčním poli (vlevo) a světelném poli (vpravo).
Barvivo – CMFDA



Obr. 30 Porovnání detekce rýhy ve fluorescenčním poli (vlevo) a světelném poli (vpravo).
Barvivo – SPIO-R nanočástice

Jak vidíme z Obrázku 29 a Obrázku 30, detekce hranice rýhy ve fluorescenčním poli proběhla s větší přesností. Na snímku ve světelném poli můžeme pozorovat drobné chyby detekce (některé skupiny buněk nebyly rozpoznány počítačem, protože neměly dostatečný kontrast), což má za následek větší hodnotu vypočtené průměrné šířky rýhy.

Nemůžeme říct, že detekce rýhy pomocí navrženého algoritmu ve fluorescenčním poli je vždy ideální nebo naopak. Nemáme „zlatý standard“ detekce pro každý snímek. Kvůli tomu výsledkem našeho testu bude jen skutečnost, jestli se šířka rýhy ve fluorescenčním poli významně liší od šířky rýhy ve světelném poli.

Základem statistického testu je porovnání šířky stejného úseku rýhy ve dvou polích - světelném a fluorescenčním. Studentův t-test je nejčastěji používaným parametrickým testem. V našem případě aplikujeme párový t-test (paired-sample t-test, příkaz *ttest* v MATLAB). Porovnává dvojice závislých hodnot ze dvou skupin. To znamená, že hodnoty šířky konkrétního úseku rýhy ve dvou polích musí být spárovány.

Parametrické testy mají předpoklad, že data v souboru musí mít normální rozložení. Pro ověření normality dat lze použít Lillieforsův test (Lilliefors test, příkaz *lillietest* v MATLAB), který je modifikací Kolmogorovova-Smirnovova testu. Pokud se nepodaří prokázat normální rozložení dat aspoň v jednom souboru, musíme použít neparametrické testy, např. Wilcoxonův párový test (Wilcoxon signed rank test, příkaz *signrank* v MATLAB), který je neparametrickou obdobou párového t-testu.

Na začátku musíme ověřit rozložení dat v každé testovací skupině pomocí Lillieforsova testu. Nulovou a alternativní hypotézu vyjádříme jako:

$$H_0: \text{data v souboru mají normální rozložení}, \quad H_A: \neg H_0 \quad (4)$$

Stejně jako u Lillieforsova testu musíme vyjádřit nulovou a alternativní hypotézu pro párový t-test:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0, \quad H_A: \neg H_0 \quad (5)$$

kde μ_1 je střední hodnota šířky rýhy ve skupině „Světelné pole“ a μ_2 je střední hodnota šířky rýhy ve skupině „Fluorescenční pole“.

Výsledné hodnoty statistického testování pro CellTracker™ Green CMFDA jsme zanesli do tabulek (viz Tab.11 a Tab.12):

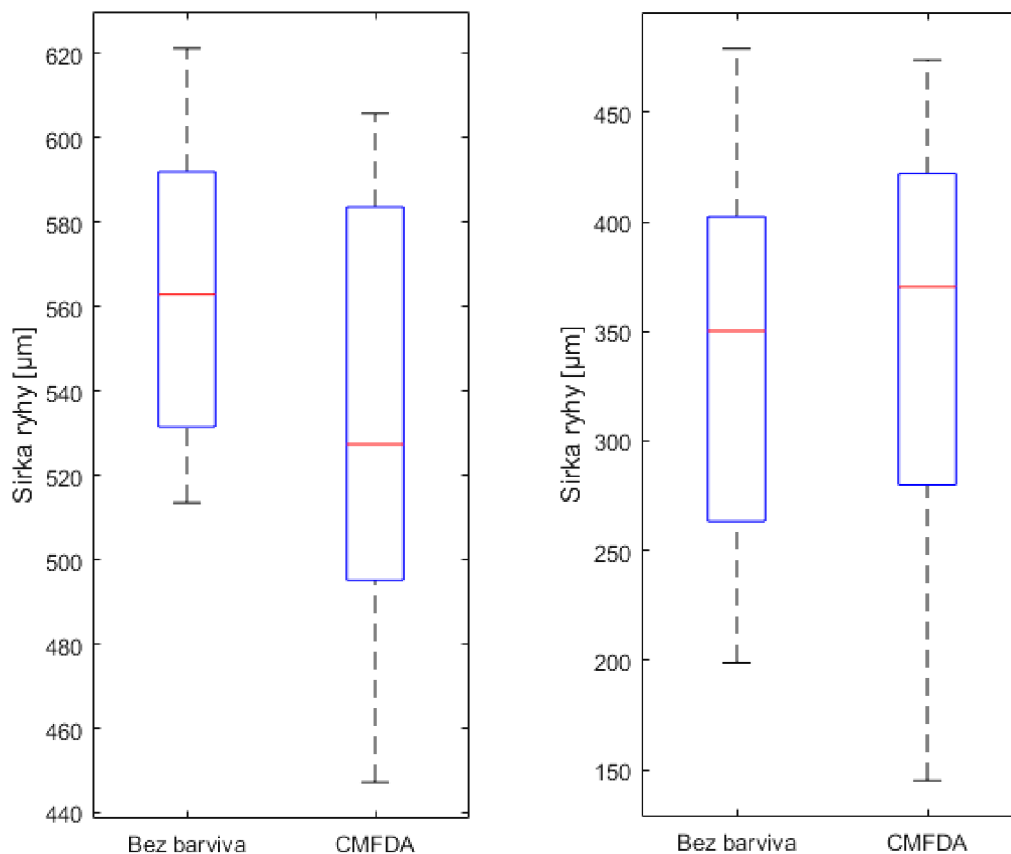
Tab. 11 Srovnání detekce hranice rýhy ve dvou polích (tři sérii snímků). Barvivo – CMFDA

Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy	p-hodnota Lillieforsův test		Použitý parametrický/ neparametrický test	p-hodnota
	Světelné pole	Fluorescenční pole		
0 hodin	0,50000	0,31220	párový t-test	0,01980
17 hodin	0,50000	0,49810	párový t-test	0,70204
40 hodin	0,02170	0,04250	Wilcoxonův test	0,21880

Tab. 12 Srovnání detekce hranice rýhy ve dvou polích (dvě sérii snímků). Barvivo – CMFDA

Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy	p-hodnota Lillieforsův test		Použitý parametrický/ neparametrický test	p-hodnota
	Světelné pole	Fluorescenční pole		
0 hodin	0,5000	0,5000	párový t-test	0,0999
24 hodin	0,0863	0,0363	Wilcoxonův test	0,3750

Výsledky statistického testování říkají, že detekce hranice rýhy hned po její vytvoření (tři sérii snímků) se liší ve dvou polích (p-hodnota párového t-testu je menší než 0,05, zamítáme nulovou hypotézu). Dost malou p-hodnotu, ale větší než 0,05 jsme obdrželi také pro další výběrovou skupinu (dvě sérii snímků, akvizice snímku hned po vytvoření rýhy). Ale ve všech zbývajících skupinách bylo prokázáno, že kvalita detekce hranice rýhy se statisticky neliší ve dvou polích (p-hodnota je značně větší než 0,05, nezamítáme nulovou hypotézu).



Obr. 31 Krabicové diagramy (boxploty). Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy – 0 hodin (vlevo), 17 hodin (vpravo). Výběrová skupina – tři sérii snímků. Barvivo – CMFDA. Na levém boxplotu je patrný rozdíl středních hodnot šířky rýhy ve dvou polích

Výsledné hodnoty statistického testování pro nanočástice značené rhodaminem jsme zanesli do tabulek (viz Tab.13 a Tab.14).

Tab. 13 Srovnání detekci hranice rýhy ve dvou polích (tři sérii snímků). Barvivo – SPIO-R nanočástice

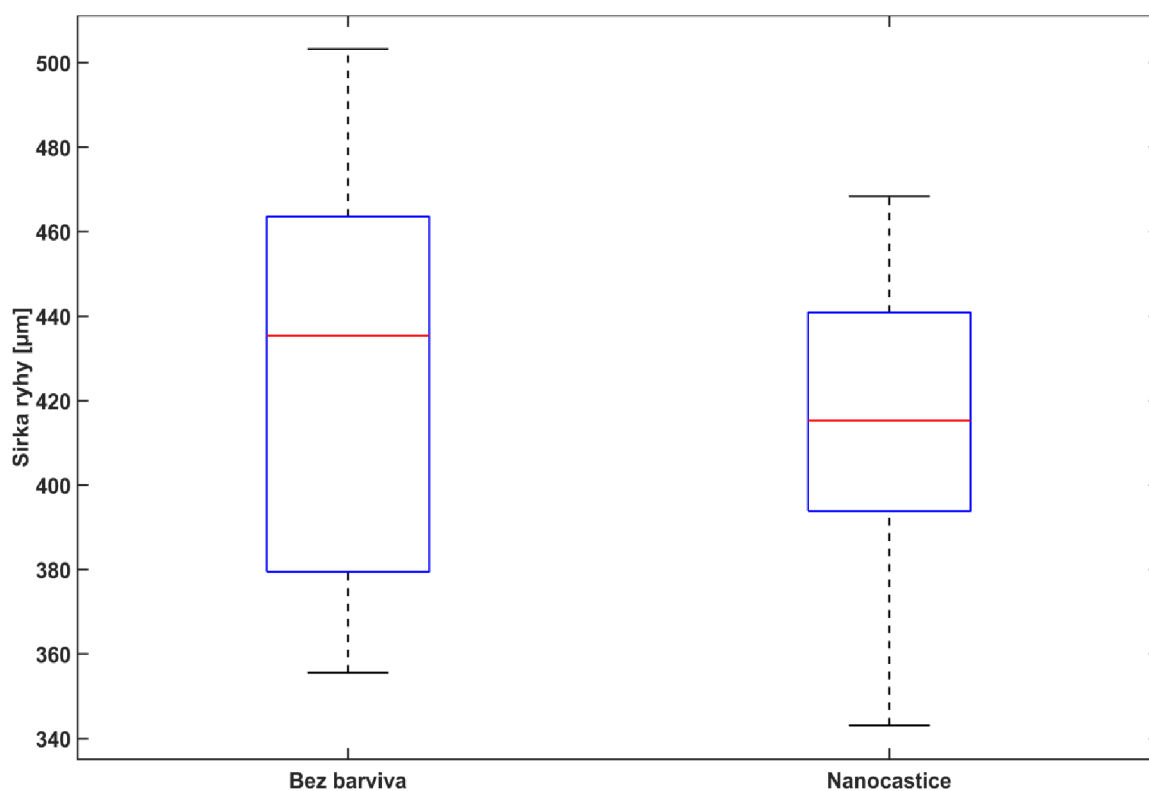
Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy	p-hodnota Lillieforsův test		Použitý parametrický/ neparametrický test	p-hodnota
	Světelné pole	Fluorescenční pole		
0 hodin	0,5000	0,1881	párový t-test	0,2218
17 hodin	0,3778	0,5000	párový t-test	0,2714
40 hodin	0,0010	0,0010	Wilcoxonův test	0,4375

Tab. 14 Srovnání detekce hranice rýhy ve dvou polích (dvě sérii snímků).

Barvivo – SPIO-R nanočástice

Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy	p-hodnota Lillieforsův test		Použitý parametrický/neparametrický test	p-hodnota
	Světelné pole	Fluorescenční pole		
0 hodin	0,5000	0,5000	párový t-test	0,1052
24 hodin	0,0030	0,3926	Wilcoxonův test	0,1094

Z tabulek je patrné, že ve všech skupinách jsme prokázali shodu středních hodnot šířky rýhy (p-hodnota statistických testů je větší než 0,05 ve všech skupinách, což znamená, že nezamítáme nulovou hypotézu). Tím jsme prokázali, že kvalita detekce hranice rýhy se statisticky neliší ve dvou polích.



Obr. 32 Krabicový diagram (boxplot). Čas akvizice snímků po vytvoření rýhy – 0 hodin. Výběrová skupina – dvě sérii snímků. Barvivo – SPIO-R nanočástice

8 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit kultivaci buněčné linie v buněčné laboratoři a ohodnotit přínos aplikace fluorescenčního značení buněk v *Scratch Wound Healing Assay* experimentu. Práce je rozdělena na dvě základní části – teoretickou a praktickou.

Teoretická část obsahuje popis zvolené pro experiment buněčné linie 3T3 a popis zásad kultivace buněk *in vitro*. Následuje seznámení s principy buněčné migrace a metodou *Scratch Wound Healing Assay*, která je běžně užívaná pro měření parametrů migrace buněk. Část také obsahuje popis konkrétních experimentů, které využívají danou metodu a způsoby vytvoření rýhy v monovrstvě buněk. Závěrem teoretické části je vysvětlení principu fluorescenční mikroskopie a popis některých použitých fluorescenčních barviv (kalcein, CellTracker™ Green CMFDA, železité nanočástice značené rhodaminem) včetně uvedení excitačních a emisních spekter.

V praktické části byl popsán navržený experiment s použitím konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 X. Náplní experimentu byly kultivace buněk 3T3 podle zvoleného protokolu, značení buněk pomocí fluorescenčních barviv, vytvoření rýhy špičkou pipety v buněčné monovrstvě a sledování procesu migrace buněk pořízením snímků v určitých časových okamžicích. Experiment byl otestován s dostatečným počtem opakování. Pro analýzu mikroskopických snímků byl v programovém prostředí MATLAB vytvořen algoritmus, který provádí detekci vytvořené rýhy a vypočítá šířku a plochu rýhy. Získané hodnoty byly analyzovány pomocí statistických testů.

První analýza byla zaměřena na sledování vlivu použitých barviv na rychlost buněčné migrace. Libovolné fluorescenční barvivo je chemickou sloučeninou, která může negativně působit na živou buňku a způsobit buněčný stres. Základem testu bylo porovnávání střední hodnoty šířky rýhy obarvených a neobarvených buněk v různých časových okamžicích. Výsledkem statistického testu je skutečnost, že průměrná šířka rýhy se neliší ve všech skupinách. To znamená, že použitá fluorescenční barviva nemají statisticky významný vliv na rychlost buněčné migrace.

Cílem druhé analýzy bylo zjistit přínos fluorescenčního značení buněk s pohledu kvality detekce hranice rýhy. Základem bylo porovnávání šířky stejného úseku detekované rýhy ve dvou polích – světelném a fluorescenčním. V jednom případě bylo prokázáno, že kvalita detekce hranice rýhy se liší (tři sérii snímků, pořízení hned po vytvoření rýhy).

Podle subjektivního vjemu připadá detekce rýhy ve fluorescenčním poli jako kvalitnější a přesnější. Navíc snímky v fluorescenčním poli nevyžadují dodatečnou úpravu kontrastu snímku, na rozdíl od snímků ve světelném poli. Na základě provedených statistických testů a vlastních zkušeností je možné říct, že fluorescenční značení buněk pro *Scratch Wound Healing Assay* experiment má své výhody: neovlivňuje rychlost migrace buněk a zjednodušuje detekci rýhy počítačem.

9 LITERATURA

- [1] KOVAŘÍKOVÁ, P., MICHALOVÁ, E., KNOPFOVÁ, L., BOUCHAL, P. *Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk* [online]. Poslední změna 31.3.2014 [cit. 29.11.2017]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Pavel_Bouchal/publication/263321940_Methods_for_Studying_Tumor_Cell_Migration_and_Invasiveness/links/5641b06e08ae24cd3e4254d2/Methods-for-Studying-Tumor-Cell-Migration-and-Invasiveness.pdf
- [2] LIANQ, CC, PARK, AY, GUAN, JL. *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro* [online]. [cit. 29.11.2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406593>
- [3] *NIH 3T3 Cell Line. Mouse embryonic fibroblasts. NIH3T3 General Information* [online]. [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: <http://www.nih3t3.com/>
- [4] *3T3 Cells* [online]. Poslední změna 15.10.2017 07:57 [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/3T3_cells
- [5] MUKHOPADHYAY, Rajendrani. *Generating the NIH 3T3 cell line, the oncogene hypothesis and horses* [online]. [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: <http://www.asbmb.org/asbmbtoday/201501/Generations/3T3/>
- [6] *Albino Swiss Mouse Embryo Fibroblasts (3T3 Line)* [online]. Nikon Instruments Inc., ©2017. [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/gallery-images/albino-swiss-mouse-embryo-fibroblasts-3t3-line>
- [7] CAMERON, David. *Howard Green, regenerative medicine pioneer, dies at 90* [online]. Poslední změna 10.11.2015 [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: <https://hms.harvard.edu/news/howard-green-regenerative-medicine-pioneer-dies-90>
- [8] *George J. Todaro* [online]. [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: <https://archives.med.nyu.edu/islandora/object/nyumed%3A730>
- [9] VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury* [online]. [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
- [10] *50 ml Cell culture flask T-25 – Plug Cap* [online]. [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: https://www.abcsscientific.com/cellculture_flask_t25-plugcap
- [11] *Eagle's minimal essential medium* [online]. Poslední změna 22.4.2017 16:08 [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Eagle%27s_minimal_essential_medium

- [12] *DMEM, w/o: Glucose, w/o: L-Glutamine, w: Sodium pyruvate, w: 3.7 g/L NaHCO₃* [online]. PAN-Biotech, ©2017. [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: <https://www.pan-biotech.de/dmem-w-o-glucose-w-o-l-glutamine-w-sodium-pyruvate-w-3-7-g-l-nahco3.html>
- [13] HEGER, Tomáš. *Vzájemné porovnání GC-MS rozborů silic tří odrůd levandule (Lavandula angustifolia Mill.) a jejich antiproliferačních účinků* [online]. [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: <https://socv2.nidv.cz/archiv37/getWork/hash/1047df5c-a879-11e4-98b3-faa932cbcfda>
- [14] *DM-22: DMEM (1X) High Glucose* [online]. [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: <https://www.omegascientific.com/shop/tissue-culture-media/dmem1x-high-glucose/>
- [15] *Fosfátový pufr* [online]. Poslední změna 10.3.2015 22:41 [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Fosfátový_pufr
- [16] *Kultivace buněk in vitro* [online]. [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky_MM09.pdf
- [17] MASCOTTI, K., MCCULLOUGH, J., BURGER, S.R. *HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide* [online]. [cit. 17.05.2018]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1537-2995.2000.40060693.x>
- [18] *In vitro přístupy k analýze migrace buněk* [online]. [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: http://organonet.med.muni.cz/media/62510/vy_04.pdf
- [19] *Buněčná migrace* [online]. Poslední změna 8.5.2014 12:06 [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Buněčná_migrace
- [20] CORY, G. Scratch-Wound Assay. In: *Cell migration: developmental methods and protocols*. 2nd ed. New York: Springer, 2011. s. 25-30. ISBN 978-1-61779-207-6
- [21] VOGT, Andreas. *Advances in two-dimensional cell migration assay technologies* [online]. Poslední změna 1.11.2010 [cit. 5.12.2017]. Dostupné z: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/4346/advances-in-two-dimensional-cell-migration-assay-technologies/>
- [22] RODRIGUEZ, Luis G.; WU, Xiaoyang; GUAN, Jun-Lin, 2005. Wound-healing assay. In: *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*. 2nd ed. New York: Springer, 2011. 23-29. [cit. 5.11.2017]. ISBN 978-1-61779-207-6

- [23] FRONZA, M., HEINZMANN, B., HAMBURGER, M., LAUFER, S., MERFORT, I. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. Elsevier, 10.12.2009, 463-467 [cit. 5.11.2017]. ISSN: 0378-8741. Dostupné z: http://eeb.lu.lv/grozs/Mikrobiologijas/Biol%20Akt%20Probl/Biol%20Akt%20Probl%202013%20Pavasaris/Raksta%20analize/9_seminars_Krisha_Lasma_Baiba/Silamikele%20Baiba_Determination%20of%20the%20wound%20healing%20effect%20of%20Calendula%20extracts%20using%20the%20scratch%20assay%20with%203T3%20fibroblasts.pdf
- [24] ŠROT, Radoslav. *Léčivé bylinky ze zahrady* [online]. Poslední změna 2.8.2008 [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: <https://www.novinky.cz/bydleni/zahrada/146261-lecive-bylinky-ze-zahrady.html>
- [25] *Johanniskraut - Hypericum perforatum* [online]. Poslední změna 5.12.2017 [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: http://www.awl.ch/heilpflanzen/hypericum_perforatum/johanniskraut.htm
- [26] JONKMAN, James E.N., CATHCART, Judith A., XU, Feng, BARTOLINI, Miria E., AMON, Jennifer E., STEVENS, Katarzyna M., COLARUSSO, Pina. *An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy* [online]. Poslední změna 31.10.2014 [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5154238/>
- [27] *Cell Migration Assays* [online]. [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: <http://www.enzolifesciences.com/platforms/cellular-analysis/cell-migration/>
- [28] JENKINS, J., PETER, A. *High throughput cell migration assay to test drug inhibition* [online]. [cit. 5.11.2017]. Dostupné z: <https://www.eposters.net/pdfs/high-throughput-cell-migration-assays-to-test-drug-inhibition.pdf>
- [29] MATĚJOVÁ, L. *Fluorescenční mikroskopie* [online]. Poslední změna 4.09.2014 14:23 [cit. 21.05.2018]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/spoluprace/laboratore/fluorescencni-mikroskopie>
- [30] *Calcein* [online]. Poslední změna 17.11.2017 13:36 [cit. 30.11.2017]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Calcein>
- [31] *Fluorescence SpectraViewer* [online]. [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?SID=srch-svtool&UID=481ph9>
- [32] *CellTracker™ Green CMFDA Dye* [online]. [cit. 8.12.2017]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C7025>

- [33] *Fluorescence SpectraViewer* [online]. [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?SID=srch-svtool&UID=2761old_2
- [34] POLÁKOVÁ, K. *Magnetické nanočástice v medicíně* [online]. [cit. 10.04.2018]. Dostupné z: http://nanosystemy.upol.cz/upload/15/polakova_ls_ii_pdf.pdf
- [35] CMIEL, V., SKOPALIK, J., POLAKOVA, K., SOLAR, J., HAVRDOVA, M., MILDE, D., JUSTAN, I., MARGO, M., STARCUK, Z., PROVAZNIK, I. *Rhodamine bound maghemite as a long-term dual imaging nanoprobe of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells* [online]. [cit. 17.05.2018]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00249-016-1187-1>
- [36] SKOPALIK, J., POLAKOVA, K., HAVRDOVA, M., JUSTAN, I., MARGO, M., MILDE, D., KNOPFOVA, L., SMARDA, J., POLAKOVA, H., GABRIELOVA, E., VIANELLO, F., MICHALEK, J., ZBORIL, R. Mesenchymal stromal cell labeling by new uncoated superparamagnetic maghemite nanoparticles in comparison with commercial Resovist – an initial in vitro study. *Dove Press journal: International Journal of Nanomedicine*, 20.11.2014, 5355–5372 [cit. 17.05.2018].
- [37] *Počítání krevních elementů* [online]. [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: http://projekty.sosvet.cz/2006_hematologie/04_pocitani.htm
- [38] *Index of /docs/img/databaze/genetika/slides* [online]. [cit. 15.12.2017]. Dostupné z: <http://atraktivnibiologie.upol.cz/docs/img/databaze/genetika/slides/>
- [39] HORÁK, K. *Matematická morfologie* [online]. [cit. 15.04.2018]. Dostupné z: http://midas.uamt.feec.vutbr.cz/ZVS/Lectures/11_Matematicka_morfologie.pdf