

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2018

Veronika Pošustová



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

TRANSFEKCE SOMATICKÝCH BUNĚK POMOCÍ MAGNETICKÝCH NANOČÁSTIC A JEJICH POST- TRANSFEKČNÍ LOKALIZACE

TRANSFECTION OF SOMATIC CELLS USING MAGNETIC NANOPARTICLES AND THEIR POST-
TRANSFECTION LOCALIZATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Pošustová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ondřej Svoboda

BRNO 2018

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Veronika Pošustová

ID: 186681

Ročník: 3

Akademický rok: 2017/18

NÁZEV TÉMATU:

Transfekce somatických buněk pomocí magnetických nanočástic a jejich post-transfekční lokalizace

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s transfekcí buněk pomocí magnetických nanočástic. 2) Nastudujte kultivaci buněčné linie 3T3 a možnosti její transfekce plasmidovou DNA. Kultivaci buněk ověřte v buněčné laboratoři. 3) Na dané oblasti sestavte literární rešerši. 4) Navrhněte design experimentu založeného na SPIO magnetických nanočásticích značených rhodaminem. 5) Navržený experiment otestujte s dostatečným počtem opakování (alespoň 10x). 6) Ve vhodném programovém prostředí statisticky zpracujte nasbímaná data. 7) Dosažené výsledky důkladně diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] WANG, Edina C a Andrew Z WANG. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro [online]. 2014, roč. 6, č. 1, s. 9–26. ISSN 1757-9694.

[2] BREGAR, Vladimír B, Jasna LOJK, Vid ŠUŠTAR, Peter VERANIČ a Mojca PAVLIN. Visualization of internalization of functionalized cobalt ferrite nanoparticles and their intracellular fate. International Journal of Nanomedicine [online]. 2013, roč. 8, s. 919–931. ISSN 1176-9114.

Termín zadání: 5.2.2018

Termín odevzdání: 25.5.2018

Vedoucí práce: Ing. Ondřej Svoboda

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 je zaměřena na experiment založený na magnetických nanočástic SPIO pro transfekci 3T3 buněk. Povrch nanočástic byl modifikován pomocí PEI a Chitosanu za účelem optimalizace této metody. Transfekční experiment byl proveden dvanáctkrát, následně byla nasnímaná data zpracována a statisticky vyhodnocena v programovacím prostředí Matlab R2016a a určena transfekční efektivita. Teoretická část je zaměřena na magnetické nanočástice a jejich využití v medicíně, dále na transfekci a její metody a také konkrétně na transfekční metodu založenou na magnetických nanočásticích.

Klíčová slova

Nanočástice, magnetické nanočástice, transfekce, transfekční efektivita

Abstract

This bachelor thesis is focused on an experiment based on magnetic particles SPIO for transfection of 3T3 cells. Nanoparticle surface was modified with PEI and Chitosan to optimize this method. The transfection experiment was performed twelve times, then the scanned data was processed and statistically analyzed in Matlab R2016a to determine the transfection efficiency. The theoretical part is focused on magnetic nanoparticles and their application in medicine, on transfection and in last part on a transfection of cells using magnetic nanoparticles.

Keywords

Nanoparticles, magnetic nanoparticles, transfection, transfection efficiency

Bibliografická citace:

POŠUSTOVÁ, V. *Transfekce somatických buněk pomocí magnetických nanočástic a jejich post-transfekční lokalizace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2018. 52 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Ondřej Svoboda.

Prohlášení

„Prohlašuji, že svou závěrečnou práci na téma *Transfekce somatických buněk pomocí magnetických nanočástic a jejich post-transfekční lokalizace* 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 závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si 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.

V Brně dne

.....

podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Ondřeji Svobodovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování této práce.

V Brně dne

.....

podpis autora

Obsah

| | |
|---|----|
| ÚVOD..... | 12 |
| TEORETICKÁ ČÁST | 13 |
| 1. NANOČÁSTICE..... | 13 |
| 1.1. Magnetické nanočástice | 14 |
| 1.1.1. Povrchová modifikace MNPs | 16 |
| 1.1.2. Oxid železa | 16 |
| 1.1.3. Magnetické nanočástice v medicíně | 17 |
| 2. TRANSFEKCE..... | 19 |
| 2.1. Metody transfekce | 20 |
| 2.1.1. Chemické metody..... | 20 |
| 2.1.2. Biologické metody | 21 |
| 2.1.3. Fyzikální metody | 21 |
| 2.2. Transfekční efektivita | 22 |
| 3. TRANSFEKCE POMOCÍ MAGNETICKÝCH NANOČÁSTIC..... | 23 |
| 3.1. Využití | 24 |
| EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 25 |
| 4. PRÁCE S BUŇKAMI..... | 25 |
| 4.1. Kultivace a pasážování | 25 |
| 5. POPIS EXPERIMENTU | 26 |
| 5.1. Použitý materiál | 26 |
| 5.2. Transfekce I – IV..... | 26 |
| 5.3. Transfekce V – IX | 28 |
| 5.4. Transfekce X – XII, negativní kontrola..... | 29 |
| 5.5. Fixace buněk..... | 30 |
| 5.6. Vizualizace..... | 30 |
| 6. ZPRACOVÁNÍ OBRAZŮ..... | 32 |
| 6.1. RGB obrazy..... | 32 |
| 6.2. BW obrazy | 34 |
| 7. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ..... | 35 |
| 7.1. Výsledky experimentu I | 35 |

| | | |
|---------------------|---------------------------------------|----|
| 7.2. | Výsledky experimentu II..... | 35 |
| 7.3. | Výsledky experimentu V..... | 37 |
| 7.4. | Experimenty III, IV, VII, IX..... | 38 |
| 7.5. | Výsledky negativní kontroly..... | 39 |
| 7.6. | Post-transfekční lokalizace MNPs..... | 41 |
| ZÁVĚR..... | | 42 |
| Literatura..... | | 43 |
| Seznam zkratek..... | | 46 |
| Seznam příloh..... | | 47 |

Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obr. 1: Rozdělení nanočástic podle složení, vlastností a využití..... | 14 |
| Obr. 2: Struktura magnetické nanočástice | 15 |
| Obr. 3: Schéma dvou typů transfekcí, A - Stabilní transfekce, B - Přechodná transfekce..... | 19 |
| Obr. 4: Princip MATra reagentu | 24 |
| Obr. 5: Fluorescenční spektrum barviva DAPI | 31 |
| Obr. 6: Fluorescenční spektrum proteinu GFP | 31 |
| Obr. 7: Aplikace Color Tresholder – HSV | 32 |
| Obr. 8: Binární obraz jader bez upravení (vlevo), binární obraz jader po úpravě (vpravo) | 33 |
| Obr. 9: Vývojový diagram funkcí Jadera (vlevo) a Transfekce (vpravo)..... | 34 |
| Obr. 10: Výsledek experimentu I..... | 35 |
| Obr. 11: Exp II - původní obraz (vlevo), zpracovaný obraz – jádra a oblast transfekce (vpravo)..... | 37 |
| Obr. 12: Exp V - původní obraz (vlevo), zpracovaná jádra a oblast transfekce (vpravo) | 38 |
| Obr. 13: Exp III - původní obraz (vlevo), zpracovaný obraz - oblast jader buněk (vpravo) | 39 |
| Obr. 14: Exp IX - původní obraz (vlevo), zpracovaný obraz - oblast jader buněk (vpravo) | 39 |
| Obr. 15: Kontrola s novým PEI a DNA - původní obraz (vlevo), zpracovaný obraz (vpravo) | 40 |
| Obr. 16: Kontrola se starým PEI a DNA - originální obraz (vlevo), zpracovaný obraz (vpravo) | 40 |
| Obr. 17: Rozložení MNPs v cytoplazmě | 41 |

Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tabulka 1: Koncentrace PEI a chitosanu pro I. a II. experiment..... | 27 |
| Tabulka 2: Koncentrace PEI a chitosanu pro III. a IV. experiment..... | 27 |
| Tabulka 3: Obsah více-jamkového pole v I. a II. experimentu | 27 |
| Tabulka 4: Obsah více-jamkového pole ve III. a IV. experimentu | 28 |
| Tabulka 5: Obsah více-jamkového pole v V. až IX. experimentu..... | 28 |
| Tabulka 6: Obsah více-jamkového pole v X. experimentu..... | 29 |
| Tabulka 7: Obsah více-jamkového pole v XI. a XII. experimentu..... | 29 |
| Tabulka 8: Transfekční efektivita experimentu II | 36 |
| Tabulka 9: Transfekční efektivita v experimentu II – manuální výpočet..... | 36 |
| Tabulka 10: Transfekční efektivita experimentu V..... | 38 |
| Tabulka 11: Transfekční efektivita negativní kontroly | 40 |

ÚVOD

Nepřetržitý vývoj vědy a techniky umožňuje hlubší a podrobnější poznatky v různých oblastech výzkumu. Díky tomu je stále jednodušší nahlédnout do světa nanotechnologií. Rozvoj v této oblasti poskytuje širokou škálu možností biologických aplikací. Využíváme přirozené, přitom jedinečné vlastnosti nanočástic a jejich chování v biologickém prostředí. Nanotechnologie také umožňují zobrazovat procesy na buněčné úrovni, což donedávna nebylo možné.[1]

Tato práce se zabývá primárně transfekčními metodami. Transfekce je nástroj pro studium funkce genů a regulace funkce bílkovin exprimovaných v modelovém organismu. Využívá se k vývoji terapií u genetických onemocnění, kdy se přenáší požadovaný gen do buněk za účelem cílené léčby.[8][9] Dnes jsou známé různé metody transfekce. Vhodná metoda se volí na základě experimentu. Je požadována zejména vysoká efektivita, nízká toxicita, viabilita buněk, úroveň exprese genu a další.[8] V každém experimentu jsou požadovány co nejlepší výsledky s ohledem na dříve zmíněné požadavky. S novými možnostmi, které přináší moderní nástroje a vybavení se dosahované výsledky strmě zlepšují.

Cílem této práce je realizace transfekce somatických buněk pomocí magnetických nanočástic. Pro zvýšení efektivity byl povrch magnetických nanočástic modifikován Polyethyleniminem (PEI) a Chitosanem v různých koncentračních řadách. Optimalizujeme transfekční postup pro co nejvyšší transfekční efektivitu společně se zachováním fyziologické morfologie buňky.

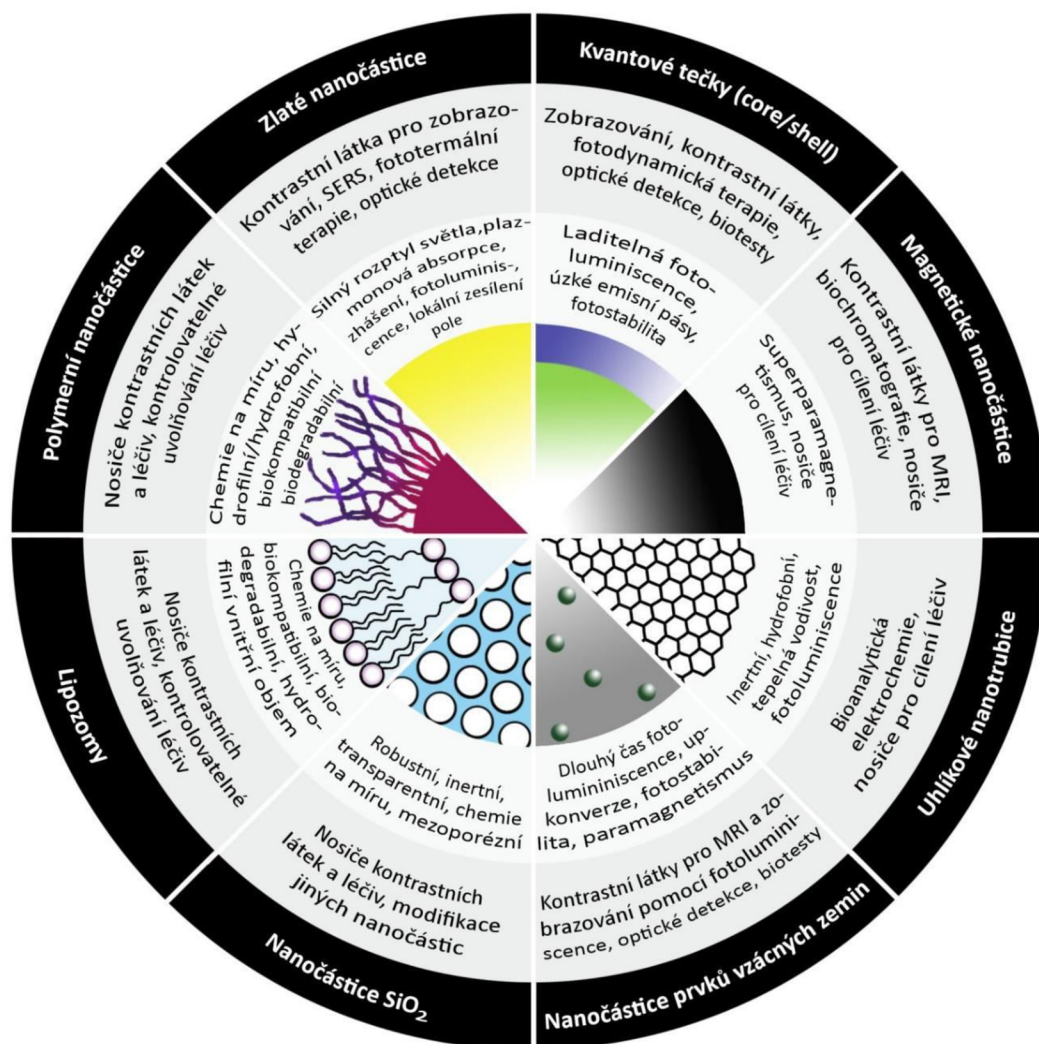
TEORETICKÁ ČÁST

1. NANOČÁSTICE

Nanočásticemi rozumíme částice o velikosti od 1 do 100 nanometrů. Předpona nano vyjadřuje mocninu 10^{-9} , tj. jednu miliardtinu. Ve vztahu k rozměrům částic tedy uvažujeme o velikostech v miliardtině metru. Pro představu použijeme srovnání s tloušťkou vlasu. Abychom dosáhli takových rozměrů, museli bychom použít asi 8000 nanočástic o velikosti 10 nm. Díky své velikosti nabývají tyto částice nových vlastností vůči jiným větším molekulám.[2] Manipulace s nanočásticemi neznamena jen práci ve stále menších dimenzích. Spíše umožňuje využití jedinečných fyzikálních, chemických, mechanických a optických vlastností nanomateriálů, které jsou v tomto měřítku přirozené.[4] Výhodou je také snadný průchod přes buněčnou membránu, čehož se využívá například při cílené dopravě léčiv.

První idea o nanočásticích byla vyslovena dávno před tím, než se nanotechnologie začaly používat. V roce 1959 tuto myšlenku vyslovil fyzik Richard Feynman na Kalifornském technologickém institutu (CalTech). Domníval se, že by vědci mohli manipulovat a řídit jednotlivé atomy a molekuly a pracovat tak s velmi velkou přesností. Později profesor Norio Taniguchi definoval termín nanotechnologie, jako procesy separace, konsolidace a deformace materiálů jedním atomem nebo molekulou [3]. Až s příchodem skenovacího tunelového mikroskopu a mikroskopu atomových sil (AFM, z angl. atomic force microscopy), které jsou schopné zobrazit atom, se začaly rozvíjet studie moderních nanotechnologií. I když jsou tyto mikroskopy určeny zejména pro měření a pozorování objektů, umožňují také drobnými předměty, jako jsou například uhlíkové nanotrubičky, pohybovat.[4]

Dnes jsou známé různé typy nanočástic s různým tvarem, velikostí, složením a funkcemi. Na Obr. 1 vidíme základní rozdělení nanočástic podle jejich vlastností, složení a využití.[5] Dále se v této práci budeme zabývat pouze magnetickými nanočásticemi (MNPs, z angl. Magnetic Nanoparticles), které jsou v poslední době předmětem intenzivního výzkumu. Týká se především vyvíjení postupů při jejich syntéze a vhodné povrchové modifikace.



Obr. 1: Rozdělení nanočástic podle složení, vlastností a využití [5]

1.1. Magnetické nanočástice

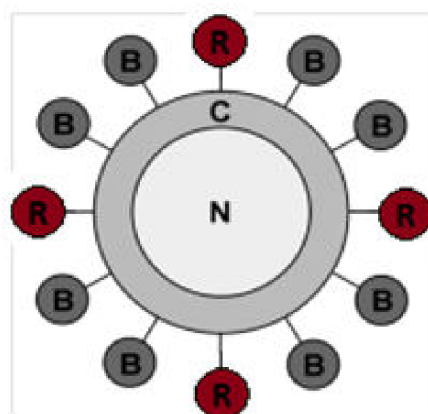
Atomy a molekuly mají své nenulové magnetické momenty, které jsou vyrovnávány náhodným chaotickým pohybem. Pokud je vložíme do magnetického pole, magnetické momenty se přizpůsobí tomuto poli a stanou se také magnetickými. Tuto vlastnost využíváme u magnetických nanočástic. Jsou to částice, které při specifických podmínkách vykazují magnetické vlastnosti. Ve své molekule obsahují magnetický prvek – nejčastěji železo, kobalt, nikl nebo jejich chemické sloučeniny. Na povrch je navázána potřebná látka, poté jsou vnějším magnetickým polem navedeny na požadované místo (např. tkáň, orgán), kde je následně tato látka uvolněna.[5] Spojení magnetických vlastností a nanotechnologií přináší řadu výhod. Jednou z nich je dopravení léku přímo na místo, kde je potřeba. Nejsou přítomny žádné vedlejší účinky na jiné tkáně nebo orgány.

Pro jednotlivé biomedicínské aplikace magnetických nanočástic jsou požadovány specifické vlastnosti, které musí být splněny. Týkají se např. koncentrace

nebo chemické či termické stability.[7] Pro optimalizaci těchto a dalších vlastností provádíme povrchovou modifikaci, což obnáší nanosení vnější vrstvy na anorganické magnetické jádro. Vhodná povrchová vrstva by měla eliminovat přitažlivé síly nanočástic a udržet je tak navzájem od sebe, čímž zajistí prostorovou stabilitu a neutralitu náboje.[22] Dalším kritickým bodem, který je třeba vzít v úvahu a který je dnes intenzivně zkoumán, je toxicita magnetického iontu obsaženého v magnetickém jádru. Také z tohoto důvodu je nanášena povrchová vrstva. Zajišťuje totiž oboustrannou izolaci, která zabraňuje uvolňování toxických iontů z jádra do biologického prostředí a zároveň ho chrání před oxidací a korozí.[22]

Dodnes bylo použito mnoho různých chemických postupů pro syntézu magnetických nano a mikročástic použitelných pro biologické aplikace. Metody syntézy do značné míry ovlivňují vlastnosti částic, zejména jejich velikost. Využívá se koprecipitace, mikroemulze, sol-gel syntéza, termolýza prekurzorů a další procesy. Mezi nejjednodušší a nejučinnější metody pro získání těchto částic patří v současné době koprecipitace, tedy reakce více málo-rozpustných látek srážením. Tato metoda umožňuje kontrolu experimentálních parametrů, jako je reakční teplota nebo hodnota pH. Hlavní výhodou procesu koprecipitace je syntéza relativně velkého množství nanočástic. Volba velikosti částic je však omezená. Tento nedostatek lze řešit přidáním polymerních komplexních povrchových činidel (dextran, karboxy-dextran, škrob nebo polyvinylalkohol).[21]

Na Obr. 2 vidíme základní strukturu magnetické nanočástice s navázanou bioaktivní látkou a barvivem rhodamine. Vzhledem k tomu, že nanočástice nejsou klasickým mikroskopem pozorovatelné, je toto barvivo nutné pro jejich vizualizaci. Rhodamine je jedna z možností této vizualizace.



- N - Magnetické jádro (Nanoparticles)
- C - Polymerní plášť (Coating layer)
- B - Bioaktivní látka (Bioactiv subsance)
- R - Červené barvivo (Rhodamin)

Obr. 2: Struktura magnetické nanočástice

1.1.1. Povrchová modifikace MNPs

Magnetické nanočástice jsou konjugovány s funkčními skupinami, jako jsou proteiny, peptidy, polymery aj., které umožňují funkcionalizaci a specifické rozpoznání buněčných typů. Funkcionalizované nanočástice s dobrou biokompatibilitou a specificitou umožňují spoustu využití a aplikací v biomedicíně.[24] Díky vazbě na odpovídající buněčný receptor funkční skupiny nasměrují nanočástice ke specifické tkáni nebo k buněčnému typu. Polymerní funkční skupiny lze klasifikovat jako biopolymery (chitosan, dextran, ramnóza) nebo syntetické polymery (polyethylenglykol (PEG), polyvinylalkohol (PVA), polyethylenimin (PEI), polyvinylpyrolidon (PVP)). V některých případech se také používají jiné organické molekuly ke zvýšení rozpustnosti komplexů magnetických nanočástic ve vodě.[22]

Chitosan je polysacharidový biopolymer, který je netoxický, hydrofilní, biologicky odbouratelný, biokompatibilní, snadno na sebe váže kovové ionty. Získává se různým stupněm deacetylace přirozeně se vyskytujícího polymeru chitinu. Při tomto procesu vznikají volné aminoskupiny, které nesou pozitivní náboj. Díky tomu chitosan snadno reaguje s molekulami nesoucími záporný náboj, jako jsou proteiny, molekuly DNA nebo fosfolipidy.[23]

Dalším biopolymerem je dextran, který je neutrálním rozvětveným polysacharidem složeným z glukózových podjednotek. Díky jeho vysoké biokompatibilitě je jedním z nejčastěji zvolených polymerů. Výhodou je rezistence vůči enzymatické degradaci, takže povrchově imobilizovaný dextran na magnetické nanočástice je stabilní ve většině tkáňových prostředích. Nevýhodou je relativně malé buněčné vychytávání magnetických nanočástic s navázaným dextranem.[22]

PEI je syntetický polymer, který existuje buď jako lineární nebo rozvětvená forma. Ačkoli je PEI toxický a biologicky neodbouratelný, používá se pro aplikaci genů díky své schopnosti vázat se na DNA. Jedná se o kationtový polymer se silnými kovalentními vazbami s povrchem magnetických nanočástic, takže může dále interagovat se širokým spektrem záporně nabitých komplexů.[22]

1.1.2. Oxid železa

Nejvýznamnější jsou pro nás nanočástice se superparamagnetickým jádrem, tzv. SPIONy (z angl. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles), hlavně maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a magnetit (Fe_3O_4). Jak je patrné z chemických vzorců, tyto sloučeniny jsou oxidy železa. Vzhledem k jejich vhodným vlastnostem jsou dnes nejvíce používanými magnetickými nanočásticemi. Mezi tyto vlastnosti patří celková stabilita, která je zajištěna hydrofilním obalem dextranu nebo jiné biokompatibilní látky.[5][7]

Superparamagnetické vlastnosti těchto jader způsobují vysokou susceptibilitu s vnějším magnetickým polem. Při jeho působení se stávají magnetickými a po

odstranění tohoto vnějšího pole nevykazují žádný zbytkový magnetismus. Proto se SPIONy využívají jako kontrastní látka pro T2 váženou magnetickou rezonanci (MRI). SPIONy mohou být používány pomocí magnetických, optických, radionuklidových nebo jiných specifických cílených ligandů pro multimodální zobrazování. Dále je využíváme například jako neinvazivní diagnostické nástroje nebo jako nosiče léků, enzymů, proteinů nebo nukleových kyselin.[1][5][6][7]

Oxidy železa buď ve formě magnetitu nebo maghemitu se obvykle připravují reakcí ze směsi železnatých a železitých solí ve vodném alkalickém prostředí. Při chemické reakci molekul Fe^{2+} a Fe^{3+} dochází k syntéze magnetitu. Nicméně tato sloučenina není příliš stabilní a je citlivá na oxidaci, která vede následně k syntéze maghemitu.[21]

Mezi různými typy magnetických nanočástic je oxid železa zdaleka nejčastěji využívaný pro in vivo aplikace. Je to částečně díky fyziologické toleranci železa. Lidský organizmus je přirozeně navržen pro zpracování přebytečného železa. Tento prvek je dokonce nezbytný pro přežití. Je součástí erytrocytů jako základní jednotka hemoglobinu – červeného barviva, které je zodpovědné za přenos kyslíku a dalších plynů z plic do tkání.

1.1.3. Magnetické nanočástice v medicíně

Biokompatibilní materiály, které reagují s vnějším magnetickým polem, našly mnoho zajímavých aplikací v různých oblastech biologických věd a biotechnologie, včetně různých lékařských oborů. Konkrétně oblast nanomedicíny se zabývá aplikacemi nanomateriálů pro léčbu, diagnostiku, zobrazování, cílené poskytování léků nebo řízení biologických systémů.[1][7][21]

Jedno z využití je v oblasti zobrazování a diagnostiky. Magnetické rezonanční zobrazování je neinvazivní technika, která využívá magnetického pole pro vytváření vysoce kontrastních obrazů tkáňové struktury a funkce.[24] Jak již bylo zmíněno výše, magnetické nanočástice oxidů železa vytvářejí záporný T2 kontrast při zobrazování magnetickou rezonancí a slouží tedy jako účinné kontrastní látky. Měkké tkáně jsou při zobrazení tmavé. Na rozdíl od běžně používaných kontrastních látek, založených na gadoliniu, vykazují SPIONy značné výhody v nízké toxicitě, zvýšené citlivosti, kontrastu a specifičnosti zobrazení. Další výhodou je jednoduchý metabolismus těchto nanočástic. V těle dochází k degradaci na molekuly železa a oxid železa, které jsou metabolizovány a uloženy v buňkách jako bílkovina feritin nebo jsou začleněny do hemoglobinu.[5][22]

Pomocí nanočástic lze zviditelnit ložiska nemoci a cíleně dodat léčiva na dané místo. Během léčby je často potřebné, aby léčebné látky s vysokými cytotoxickými účinky byly dodány přímo do jednotlivých postižených buněk. V tom nacházíme značnou výhodu, protože pacientovi bude aplikována nižší dávka podávaných léků,

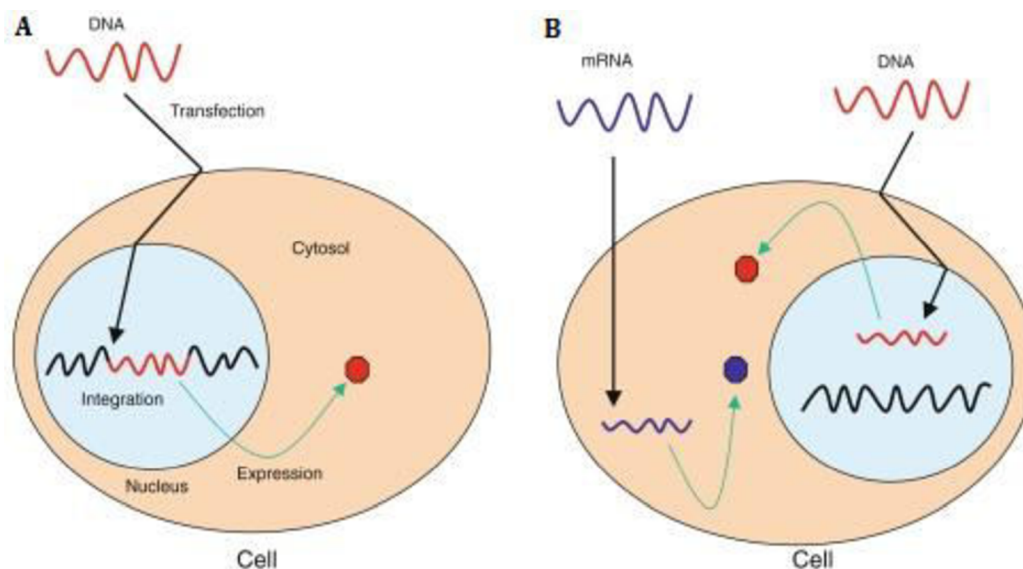
z čehož vyplývá zmírnění vedlejších účinků, nebo se vedlejší účinky u zdravých tkání vůbec neprojeví.[24]

Další využití vyplývá z jedné z vlastností magnetických nanočástic, a sice z produkce tepla ve vysokofrekvenčním střídavém magnetickém poli. Toho většinou využíváme v kombinaci s další konvenční léčbou, jako je ozařování nebo chemoterapie. Tkáň je vystavena vysokým teplotám a stane se tak citlivější. Z toho důvodu již není zapotřebí vysoká dávka zatěžujících cytostatik nebo ozařování. Tento jev se nazývá hypertermie.[7] Dochází k ohřevu tkáně při teplotách v rozmezí 42 - 46°C a dělí se na celotělovou a lokalizovanou. Hypertermie celého těla vyžaduje pečlivé řízení teploty pro léčbu metastatických rakovinných buněk, které jsou rozšířeny v celém organismu. Lokalizovaná hypertermie zahrnuje pouze ohřívání malé oblasti zájmu.[24]

2. TRANSFEKCE

Transfekce je přenos nukleové kyseliny do eukaryotických buněk. Tato nukleová kyselina se začlení do genetické informace v buněčném jádře a vznikne geneticky modifikovaná buňka. Tento proces je nezbytný pro následnou expresi požadovaného genu. Transfekce se dělí na stabilní a přechodnou v závislosti na povaze začleněného genetického materiálu (DNA/RNA, z angl. deoxyribonucleic acid/ ribonucleic acid).[8] Aby se dosáhlo efektivního přenosu genů transfekcí, využívá se komplex plazmidové DNA s lipidovými činidly pro zprostředkování účinného dodávání do buněčného jádra. Plazmidy jsou malé kruhové molekuly DNA, které se přirozeně vyskytují v bakteriích a jsou skutečně používány bakteriemi k přenosu genetické informace. Mechanismus přidávání plazmidu DNA do savčí buňky je známý jako plazmidová transfekce.[16]

Pro stabilní transfekci jsou obvykle použity genetické materiály obsahující tzv. transgeny, které v genomu buňky udržují expresi i po její replikaci. DNA se dostane do jádra průchodem přes jadernou membránu a trvale se začlení do genomu buňky. Na rozdíl od stabilní transfekce, přechodně transfekované geny jsou exprimovány pouze po omezenou dobu. DNA je vnesena do jádra, ale není integrována do genomu. K expresi dochází odděleně. Také je do cytosolu vnesena mRNA (Messenger RNA), kde je překládána.[8] Při začlenění nové genetické informace do genomu buňky dochází ke změně exprese genu, při translaci vznikají odlišné proteiny a buňka tedy získává novou funkci.



Obr. 3: Schéma dvou typů transfekcí, A - Stabilní transfekce, B - Přechodná transfekce [8]

Hlavním účelem transfekce je studium funkce genů nebo genových produktů zvýšením nebo snížením specifické exprese genu v buňkách a produkci rekombinantních proteinů v buňkách savců.[8] Využívá se k vývoji terapií u genetických onemocnění.

2.1. Metody transfekce

Existují různé metody transfekce a každá využívá různé přístupy, které je třeba vzít v úvahu v závislosti na druhu a účelu experimentu. Ne všechny metody mohou být aplikovány na všechny typy buněk. Ideální metoda by měla mít vysokou efektivitu, nízkou buněčnou toxicitu, minimální účinky na normální fyziologii buňky a měla by být snadno použitelná a reprodukovatelná. Transfekční metody dělíme na chemické, biologické a fyzikální.[8]

2.1.1. Chemické metody

Metody chemické transfekce jsou nejrozšířenějšími metodami v současném výzkumu. Byly prvními, které byly použity k zavedení cizích genů do savčích buněk. Princip spočívá v interakci záporně nabitých nukleových kyselin s pozitivně nabitými molekulárními nosiči, jako jsou polymery nebo lipidy. Díky kladnému náboji přijde nukleová kyselina do kontaktu s negativně nabitými membránovými složkami a přejde do buňky endocytózou.

První transfekční nevirusová metoda je pomocí DEAE-dextranu (polykationický derivát dextranu, uhlovodíkový polymer), který se smísí s DNA a díky přebytku kladného náboje dojde k přiblížení k buněčné membráně. Ta DNA/DEAE-dextran komplex endocytuje. Mezi výhody této metody patří jednoduchost a nízké náklady. Velkou nevýhodou je ovšem nízká efektivita transfekce a cytotoxicita.

Další chemická metoda je zprostředkovaná fosforečnanem vápenatým. Ten je smíchán s DNA, přidán do PBS pufru a inkubován za pokojové teploty. Vytvoří se sraženiny fosforečnanu vápenatého a DNA, které přilnou k povrchu buněk. Komplex je opět endocytován. Výhodou je dostupnost a možnost použití pro stabilní transfekci, což umožňuje dlouhodobé studie genové exprese. Nevýhody spočívají v toxicitě a velké citlivosti na změnu pH a teploty. Ve srovnání s jinými metodami je míra efektivit nízká.

Poslední a také nejvíce používaná chemická metoda je pomocí kationových lipidů. Nukleové kyseliny jsou zabaleny do lipozomových kladně nabitých vezikulů a endocytovány.

Efektivita transfekce chemických metod je do značné míry závislá na faktorech, jako je poměr nukleové kyseliny a chemikálie, pH roztoku a podmínky buněčné membrány, takže proces vede k nízké transfekční efektivitě, zejména in vivo, ve srovnání s metodami zprostředkovanými virem. Avšak tyto metody mají výhodu

v relativně nízké cytotoxicitě, v žádné mutagenезi a v neomezené velikosti nukleové kyseliny. Efektivita chemické transfekce se také liší v závislosti na typu buňky. [8][17]

2.1.2. Biologické metody

Řadíme sem metody, které využívají geneticky modifikované viry. Ty jsou schopny nést cizí gen a úspěšně jej přenášet do buňky jako virovou infekci. Používají se adenoviry, retroviry, adeno-asociované viry, herpes simplex viry a vaccinia viry. Obecně je dosažená transfekční efektivita v cílových buňkách a buněčných liniích vysoká. Ovšem tato metoda přináší řadu nevýhod.[17]

Hlavní nevýhodou virové transfekce je imunogenita (navození tvorby protilátek) a cytotoxicita. Zavedení virového vektoru může způsobit imunologickou reakci nebo inserční mutaci, protože virové vektory se integrují do hostitelského genomu náhodně, což může vést až k aktivaci onkogenů. Ve výsledku je většinou buňka usmrcena.[8][17]

2.1.3. Fyzikální metody

Fyzikální metody umožňují přímý přenos nukleových kyselin do cytoplazmy a jádra fyzikálními nebo mechanickými prostředky.

Metoda mikroinjekce se používá hlavně k manipulaci s jednotlivými buňkami, jako jsou oocyty. Pomocí mikromanipulátoru a mikroskopu se do cytoplazmy nebo přímo do jádra vloží velmi tenká špička mikroinjekce a vnese se nukleová kyselina. Významnou výhodou je vysoká efektivita, avšak tato metoda je časově i finančně náročná. Také není vhodná pro transfekci velkého počtu buněk vzhledem k tomu, že se transfekuje vždy jen jedna buňka.

Biolistic particle delivery je přenos nukleových kyselin do jádra buňky pomocí vysokorychlostních zlatých nebo wolframových částic o velikosti 0,5 - 1,5 μm . K transfekci dochází bombardováním cílových buněk těmito částicemi pokrytými danou nukleovou kyselinou. Částice se urychlují určitou hnací silou, např. tlakem plynu (helium). Je to lehká a rychlá technika s možností maximální kontroly, nicméně nevýhodou je relativně vysoká cena a velká úmrtnost buněk.

Často používanou fyzikální metodou je elektroporace. Buňky a DNA jsou suspendovány v elektroporačním pufru, na který jsou přivedeny vysokonapěťové impulzy. Ten narušuje buněčné membrány a dělá v ní póry, kterými mohou procházet nukleové kyseliny. Protože elektroporace je snadná a rychlá, je schopna transfekovat velké množství buněk v krátkém čase. Dochází však k vysoké úmrtnosti buněk způsobené elektrickými impulzy.[8][17]

Transfekce zprostředkovaná laserem (také známá jako optoporace nebo fototransfekce) využívá impulsní laser k ozařování buněčné membrány za vzniku přechodného póru. Při vzniku póru v membráně jsou nukleové kyseliny přeneseny do

buňky díky osmotickému rozdílu mezi médiem s DNA a cytosolem. Laserová metoda umožňuje sledovat transfekci a vytvářet póry v libovolném místě buňky. Lze ji použít i na velmi malé buňky, ale vyžaduje drahý laserový mikroskopový systém. [8]

Další fyzikální metodou je transfekce pomocí magnetických nanočástic. Touto tematikou se budeme podrobněji zabývat v následující kapitole.

2.2. Transfekční efektivita

Transfekční efektivita určuje úspěšnost provedeného experimentu. Závisí na více faktorech, jako je například typ a hustota buněk, počet pasáží, poměr DNA k transfekčním činidlům, množství použitého transfekčního činidla, inkubační doba atd.[9] Také záleží na vybrané transfekční metodě. Ta se volí na základě požadovaných výsledků.

Mezi postupy určování efektivity patří zjištění počtu transferovaných buněk. Tyto buňky je možné spočítat pod mikroskopem. K vizualizaci transfekovaných buněk pak slouží fluorescenční proteiny, které reagují na expresi požadovaného proteinu. Mezi ně patří GFP, luciferáza nebo β -galaktosidáza. Transfekci poté vidíme jako barevné oblasti, charakteristické pro daný protein, a to zejména kolem buněčné stěny, protože protein, který vznikl po transfekci, je zde uvolňován z buňky. Účinnost transfekce definujeme jako počet buněk, které exprimují dodaný gen děleno celkovým počtem buněk v kultuře.

Dalšími metodami jsou real-time PCR a western blot analýza. Fluorimetrie a průtoková cytometrie také využívá k určení míry exprese požadovaného proteinu fluorescenci.[6]

Jak již bylo zmíněno, naším cílem je dosáhnout co nejvyšší transfekční efektivity. Proto transfekční postup optimalizujeme pro získání co nejlepších výsledků společně se zachováním fyziologické morfologie buněk. Jedna z možností optimalizace je použití PEI, které významně zvyšuje efektivitu transfekce. Nukleová kyselina nese záporný náboj, takže kladně nabitý PEI ji obklopí a tím se kolem plazmidu vytvoří kontinuální vrstva kationtů. Tak může komplex DNA/PEI dále interagovat se záporně nabitými fosfolipidovými dvouvrstvami v buněčné membráně.[22]

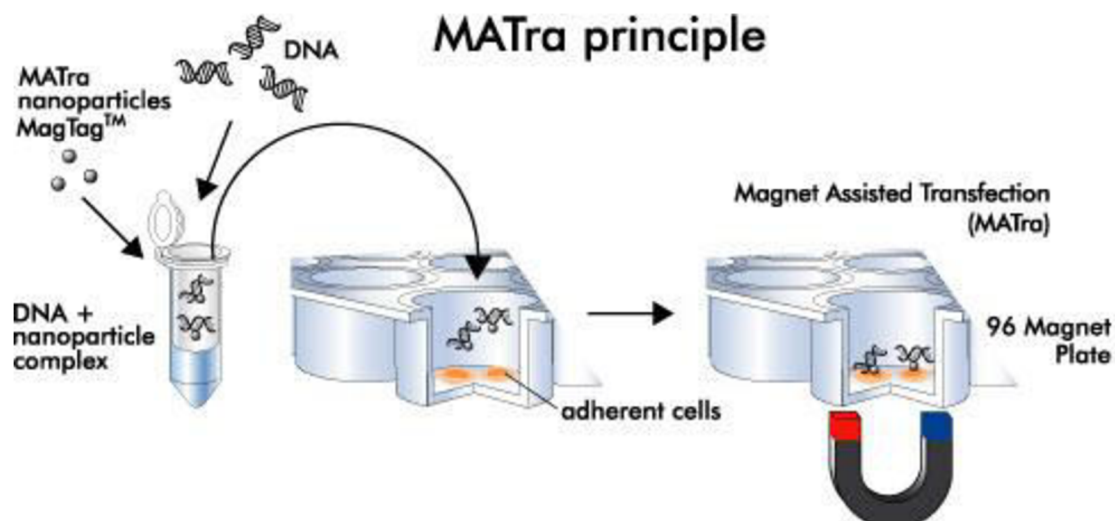
3. TRANSFEKCE POMOCÍ MAGNETICKÝCH NANOČÁSTIC

Důležitým aspektem transfekčních částic je jejich velikost. Na cizí tělesa v organismu přirozeně reaguje imunitní systém. Aby k něčemu takovému nedocházelo, je potřeba zajistit vhodnou velikost těchto částic a obejít tak mechanismy, které imunitní reakci vyvolávají. Optimální velikost se pohybuje v rozmezí jednotek až desítek nanometrů.[8] Tuto podmínku splňují magnetické nanočástice při *in vitro* transfekci. Jak již bylo popsáno výše, výhodou je snadné navádění, rychlost a také vysoká efektivita této metody, přičemž umožňuje využívat více typů nukleových kyselin, jako je plasmidová DNA, siRNA nebo oligonukleotidy.

Tato technika (MATra, z angl. Magnet-Assisted Transfection, viz Obr. 4) využívá magnetického pole k přenosu nukleové kyseliny do buňky. V prvním kroku jsou nukleové kyseliny spojeny s magnetickými nanočásticemi. Vazba záporně nabitých nukleových kyselin s kladně nabitými částicemi železa probíhá poměrně rychle. S využitím silného magnetu se tyto komplexy přivedou k povrchu buňky. Výsledkem je tedy velmi těsný kontakt mezi buněčnou membránou a magnetickými nanočásticemi s navázanými nukleovými kyselinami, které jsou nakonec endocytovány. Přitom nedochází k narušení membránové struktury ani k poškození chromozomů. Nukleová kyselina se uvolní do cytoplazmy a magnetické nanočástice jsou metabolizovány organismem jako přebytek železa.

Pro transfekci lze využít také neadherentní buňky rozptýlené v suspenzi. Nicméně ty se nejprve musí imobilizovat na dno více-jamkového pole. Vše je realizováno kultivací s reagentem, který buňky imobilizuje. Jsou to specificky potažené magnetické nanočástice, které na sebe váží volně plovoucí buňky. Aplikace silné magnetické síly (umístění silné magnetické desky pod kultivační více-jamkové pole) způsobí pokles buněk ke dnu. Tím se buňky stávají dočasně adherentní a lze využít transfekční postup pro adherentní buňky.[15]

Pokud srovnáme transfekci pomocí magnetických nanočástic s dalšími transfekčními metodami, sledujeme mnoho výhod. Patří mezi ně vyšší efektivita, téměř žádná toxicita, neporušenost membrány, nepřítomnost nežádoucích účinků, snadné provedení experimentu, úspěšné použití na mnoha buněčných liniích (dosud bylo pozitivně transfekováno téměř 200 druhů buněk) nebo správná funkce pro různé typy nukleových kyselin.[14]



Obr. 4: Princip MATra reagentu [15]

3.1. Využití

V různých studiích se můžeme dočíst o regulačních procesech pomocí transfekce založené na magnetických nanočásticích, které ovlivňují migraci buněk nebo axonový růst. Transfekce může potenciálně umožnit rychlou změnu buněčné adheze mezi buňkami navzájem. Využití nalzáme pro neuronové buňky v CNS (centrální nervová soustava). Úspěšně byly transferovány např. neurony hipokampu. Výhodou je, že pomocí této metody je možné regulovat exprese proteinů ve vysoce citlivých neuronech bez jakékoli toxicity.

Další využití bylo pro transfekci buněk hepatocelulárního karcinomu. Tato transfekce byla porovnána s lipofekcí. MATra po ukončení vykazovala mnohem vyšší efektivitu než lipofekční činidlo.

Využívá se také k optimalizaci nadměrné exprese konkrétních proteinů (např. proteinů rakovinných buněk hlavy a krku). Léčba karcinomu probíhá díky specifické siRNA, která způsobí jasnou inhibici exprese proteinu karcinomu. I po této transfekci byla lipofekce až osmkrát méně účinná.[14]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. PRÁCE S BUŇKAMI

Součástí transfekce je vždy práce s buněčnými liniemi. Pro účely této bakalářské práce byly použity buňky 3T3. Jsou to buněčné linie myších embryonálních fibroblastů. Během buněčného dělení docházelo k přenosu linií (T, „transfer“) každé 3 dny, přičemž na misku bylo nasazeno 3×10^5 buněk. 3T3 linie jsou v současnosti díky svým vhodným vlastnostem velmi používanými buněčnými liniemi ve výzkumu.[10][11]

4.1. Kultivace a pasážování

Buňky jsou kultivovány v kultivačních lahvích, kde jsou vyživovány kultivačním médiem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), které má podobné složení, jako přirozené prostředí buňky. Obsahuje anorganické soli, aminokyseliny, mastné kyseliny a lipidy, vitamíny, glukózu, proteiny a peptidy podporující buněčné dělení a sérum, které udržuje také stálé pH.[12]

Buňky, nasazené v kultivační lahvi, jsou zpočátku rozptýleny v živném médiu. Aby bylo jejich prostředí co nejpřirozenější, kultivujeme v buněčném inkubátoru při teplotě 37°C při vysoké relativní vlhkosti. Uvnitř je udržována stálá atmosféra CO₂ na hodnotě kolem 5%. [13]

Fibroblasty jsou buňky adherentní, proto postupně přilnou ke dnu lahve, kde se dělí. Při dosažení 100% konfluency buňky nemají další prostor k dělení, proto je nutné buňky uvolnit působením trávicího enzymu trypsin a centrifugací je oddělit od supernatantu. Část buněk se odebere a nasadí do nové kultivační lahve, případně lze část použít pro daný experiment. Tento proces se nazývá pasážování a je nutné jej neustále opakovat pro zachování buněčné linie.

5. POPIS EXPERIMENTU

Velikost použitých nanočástic se pohybovala kolem 8 nm. Postup experimentů bylo vždy potřeba optimalizovat tak, abychom dosáhli co nejvyšší transfekční efektivity. Proto se jednotlivé postupy od sebe nepatrně liší v závislosti na zvolených optimalizačních podmínkách. Z pohledu nasazování buněk byl experiment proveden dvojím způsobem.

Při prvním byly buňky nasazeny do osmi-jamkového pole 72 hodin před samotnou transfekcí a inkubovány v buněčném inkubátoru. Nasazení buněk probíhalo vždy po pasáži, kdy byly k dispozici centrifugované buňky. Nejdříve byla připravena zkumavka s 1,6 ml DMEM a 60 μ l buněk 3T3. Do každé jamky ve více-jamkovém poli bylo přidáno asi 207,5 μ l tohoto roztoku.

Druhý způsob byl realizován jako transfekce při pasáži. Buňky nebyly před samotnou transfekcí inkubovány. Byly nasazeny a ihned transferovány. Podrobnější postup je popsán v kapitolách Transfekce V – IX a Transfekce X – XII.

5.1. Použitý materiál

- DMEM/bezsérové medium
- 3T3 buněčné linie
- PBS (fosfátový pufr)
- Trypsin
- Magnetické nanočástice (SPIO)
- plazmidová DNA
- PEI
- Chitosan
- 4% formaldehyd
- Triton X-100
- barvivo DAPI
- Mounting medium
- NaCl

5.2. Transfekce I – IV

První čtyři experimenty byly provedeny stejným způsobem – po dosažení asi 70% konfluencie buněk byla provedena transfekce. Použit byl MATra Short Prototol pro adherentní buňky. V prvním kroku byl vytvořen roztok 392 μ l bezsérového média a 17,5 μ l MNPs. Po důkladném vortexování bylo do sedmi zkumavek odebráno 58,5 μ l tohoto roztoku. Poté bylo přidáno PEI do 2. až 4. zkumavky a chitosan do 6. až 8. zkumavky podle požadovaného množství. Takto vytvořený komplex byl inkubován

po dobu dvaceti minut při pokojové teplotě. V prvních dvou experimentech byly použity menší koncentrace PEI a chitosanu, v následujících dvou byly koncentrace zvýšeny na dvojnásobek. Zkumavky byly očíslovány tak, aby obsah souhlasil s výsledným komplexem ve více-jamkovém poli. V následujících tabulkách je uvedeno přesné množství PEI a chitosanu společně s MNPs v jednotlivých zkumavkách (viz Tabulka 1, Tabulka 2).

| | | | |
|-----------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1 - | 2 MNPs PEI 0,87 μ l | 3 MNPs PEI 1,74 μ l | 4 MNPs PEI 2,61 μ l |
| 5 MNPs | 6 MNPs Chit 5,62 μ l | 7 MNPs Chit 11,24 μ l | 8 MNPs Chit 16,86 μ l |

Tabulka 1: Koncentrace PEI a chitosanu pro I. a II. experiment

| | | | |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1 - | 2 MNPs PEI 1,74 μ l | 3 MNPs PEI 3,48 μ l | 4 MNPs PEI 5,22 μ l |
| 5 MNPs | 6 MNPs Chit 11,24 μ l | 7 MNPs Chit 22,48 μ l | 8 MNPs Chit 33,72 μ l |

Tabulka 2: Koncentrace PEI a chitosanu pro III. a IV. experiment

Do všech zkumavek, kromě páté, bylo přidáno 2,246 μ l DNA a poté 500 μ l DMEM. Takto připravené roztoky byly přidány k buňkám do více-jamkového pole a inkubovány dalších dvacet minut na silném magnetu v inkubátoru.

Do první jamky byly vždy nasazeny jen samotné buňky jako kontrolní vzorek, v páté byly jen buňky a MNPs. Výsledný obsah každé jamky je znázorněn v následujících tabulkách (viz Tabulka 3, Tabulka 4).

| | | | |
|--------------------|--|---|---|
| 1 Buňky | 2 Buňky MNPs DNA PEI 0,87 μ l | 3 Buňky MNPs DNA PEI 1,74 μ l | 4 Buňky MNPs DNA PEI 2,61 μ l |
| 5 Buňky MNPs | 6 Buňky MNPs DNA Chit 5,62 μ l | 7 Buňky MNPs DNA Chit 11,24 μ l | 8 Buňky MNPs DNA Chit 16,86 μ l |

Tabulka 3: Obsah více-jamkového pole v I. a II. experimentu

| | | | |
|--------------------|---|---|---|
| 1 Buňky | 2 Buňky MNPs DNA PEI 1,74 μ l | 3 Buňky MNPs DNA PEI 3,48 μ l | 4 Buňky MNPs DNA PEI 5,22 μ l |
| 5 Buňky MNPs | 6 Buňky MNPs DNA Chit 11,24 μ l | 7 Buňky MNPs DNA Chit 22,48 μ l | 8 Buňky MNPs DNA Chit 33,72 μ l |

Tabulka 4: Obsah více-jamkového pole ve III. a IV. experimentu

5.3. Transfekce V – IX

Tyto experimenty byly od předchozích pozměněny. Do první jamky byly přidány k buňkám jen MNPs, pátá jamka obsahovala buňky, MNPs a DNA – byla tak kontrolou transfekce. Pátý experiment proběhl s buňkami, které byly nasazeny 72 hodin předem. Následující experimenty (VI – IX) se lišily tím, že buňky byly transferovány při pasáži. Jednotlivé postupy byly následovné.

V pomocné zkumavce bylo připraveno 448 μ l bezsérového média a 20 μ l MNPs. Po důkladném vortexování bylo do osmi zkumavek odebráno 58,5 μ l tohoto připraveného roztoku. Následně bylo přidáno stejné množství PEI a chitosanu, jako v předešlých experimentech. Po dvaceti minutách bylo přidáno 2,246 μ l DNA a 500 μ l média. Obsah všech zkumavek byl přemístěn do osmi-jamkového pole. V experimentech, kde byla provedena transfekce při pasáži (VI – IX), bylo nutné do více-jamkového pole přidat 7,5 μ l buněk. Tyto vzorky byly ihned přemístěny na silný magnet a inkubovány v inkubátoru po dobu dvaceti minut.

Kvůli nedostatečným výsledkům byly u některých experimentů použity nové materiály. Při transfekci VIII bylo aplikováno nové PEI i DNA. Kvůli vyšší koncentraci připravené DNA muselo být následně upraveno množství na 0,989 μ l. V dalších experimentech bylo aplikováno staré PEI a nová DNA. Přesný obsah každé jamky je opět v následující tabulce.

| | | | |
|---------------------------|---|---|---|
| 1 Buňky MNPs | 2 Buňky MNPs DNA PEI 1,74 μ l | 3 Buňky MNPs DNA PEI 3,48 μ l | 4 Buňky MNPs DNA PEI 5,22 μ l |
| 5 Buňky MNPs DNA | 6 Buňky MNPs DNA Chit 11,24 μ l | 7 Buňky MNPs DNA Chit 22,48 μ l | 8 Buňky MNPs DNA Chit 33,72 μ l |

Tabulka 5: Obsah více-jamkového pole v V. až IX. experimentu

5.4. Transfekce X – XII, negativní kontrola

Při těchto experimentech probíhala transfekce pomocí magnetických nanočástic pouze ve čtyřech spodních jamkách. Postup transfekce byl stejný jako v předchozích experimentech. V páté a šesté jamce byly MNPs optimalizovány pomocí PEI, v sedmé a osmé jamce pomocí chitosanu. Při transfekcích XI a XII bylo množství PEI sníženo na 0,5 a 1 μl .

V prvních čtyřech jamkách probíhala kontrolní transfekce. Do první jamky byly nasazeny jen buňky, abychom mohli sledovat jejich dělení a konfluenci bez vlivu dalších substancí. Do druhé jamky byly nasazeny buňky společně s MNPs pro kontrolu rozložení nanočástic. Třetí a čtvrtá jamka sloužily jako negativní kontrola transfekce při použití dvou různých PEI – staršího, u kterého by několikanásobné rozmrazování mohlo mít negativní vliv na jeho účinnost, a nového PEI aplikovaného při transfekci VIII. Kontrolní vzorky byly připraveny ve dvou pomocných zkumavkách. V experimentu X bylo smícháno 25 μl NaCl, 3 μl PEI a 0,989 μl DNA, po deseti minutách bylo přidáno 500 μl DMEM a takto připravené roztoky byly přeneseny do více-jamkového pole. Poté bylo přidáno 7,5 μl buněk.

Při negativní kontrole v experimentu XI a XII bylo množství PEI a buněk upraveno. Koncentraci PEI bylo nutné snížit, kvůli vysoké úmrtnosti buněk, na 0,5 μl . Množství buněk bylo naopak zvýšeno a to na 10 μl , následně na 12,5 μl na jednu jamku. Výsledný obsah celého více-jamkového pole je v Tabulka 6 a Tabulka 7.

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 Buňky | 2 Buňky MNPs | 3 Buňky DNA Staré PEI 3 μl | 4 Buňky DNA Nové PEI 3 μl |
| 5 Buňky MNPs DNA PEI 1,74 μl | 6 Buňky MNPs DNA PEI 3,48 μl | 7 Buňky MNPs DNA Chit 22,48 μl | 8 Buňky MNPs DNA Chit 33,72 μl |

Tabulka 6: Obsah více-jamkového pole v X. experimentu

| | | | |
|--|--|---|---|
| 1 Buňky | 2 Buňky MNPs | 3 Buňky DNA Staré PEI 0,5 μl | 4 Buňky DNA Nové PEI 0,5 μl |
| 5 Buňky MNPs DNA PEI 0,5 μl | 6 Buňky MNPs DNA PEI 1 μl | 7 Buňky MNPs DNA Chit 22,48 μl | 8 Buňky MNPs DNA Chit 33,72 μl |

Tabulka 7: Obsah více-jamkového pole v XI. a XII. experimentu

5.5. Fixace buněk

Po transfekci bylo důležité pravidelně měnit živné medium, aby měly buňky dostatečnou výživu a mohl tak probíhat buněčný cyklus. Transfekce v těchto experimentech je přechodná, proto exprese požadovaného proteinu po určité době vymizí. Bylo potřeba kontrolovat proliferaci buněk a zvolit vhodnou dobu pro jejich zafixování, kdy ještě k expresi tohoto proteinu docházelo. Fixace probíhala třetí až pátý den po transfekci. Tím byla způsobena rychlá smrt buněk, aniž by došlo k denaturaci bílkovin.[18]

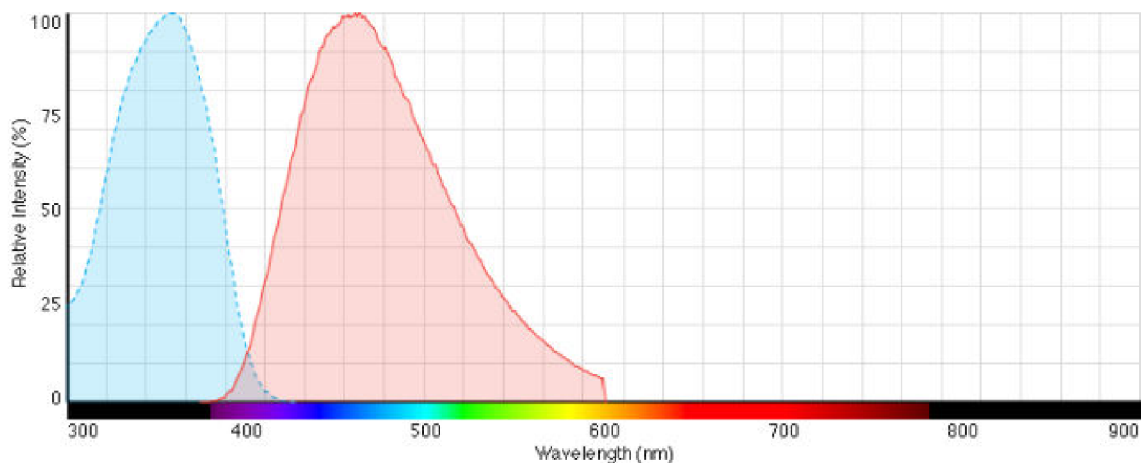
Fixace byla realizována působením 4% formaldehydu, který byl ve vodní lázni ohřán na teplotu 37°C. Z více-jamkového pole bylo odebráno medium a do každé jamky se přidalo 200 µl formaldehydu. Po 30 minutách byl odebrán a buňky se dvakrát propláchly 200 µl PBS. Tím byla fixace dokončena.

V experimentech I – VII bylo po zafixování obarveno jádro barvivem DAPI. Do každé jamky byl přidán Triton X-100 (8 x 200 µl), což je chemická sloučenina, která naleptá membránu. Po pěti minutách působení byl rychle odstraněn a buňky opět dvakrát propláchnuty 200 µl PBS. V pomocné zkumavce byl připraven roztok 10 µl barviva DAPI a 1990 µl PBS. Po důkladném vortexování bylo do každé jamky přidáno 200 µl tohoto roztoku. Více-jamkové pole bylo zabaleno do alobalu, aby nedocházelo k degradaci barviva na světle, a nechalo se 30 minut působit při pokojové teplotě. Poté se buňky opláchly 200 µl PBS a zakáply 2 kapkami mounting mediumem. Takto fixované buňky byly nachystány pro skenování pod konfokálním mikroskopem.

5.6. Vizualizace

Pro vizualizaci jednotlivých struktur a tedy pro určení transfekční efektivity je potřebné některé komplexy obarvit fluorescenčními barvivy. V těchto experimentech nás zajímají jádra buněk, lokalizace nanočástic a samotná exprese požadovaného proteinu.

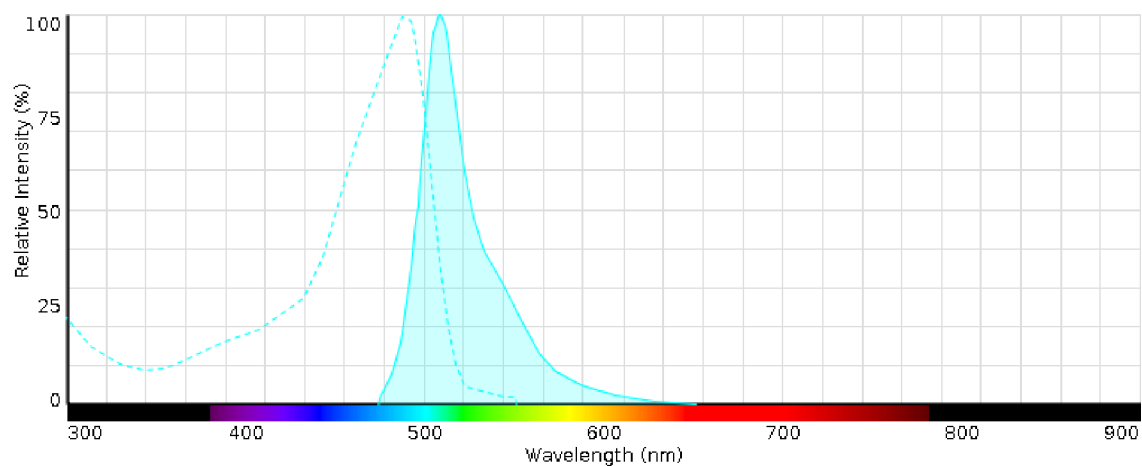
Pro vizualizaci jader prvních sedmi experimentů bylo použito barvivo DAPI, což je fluorescenční barvivo, které bylo aplikováno až po fixaci. Do jádra se dostalo díky narušení membrány působením 0,02% Tritonu X. Maximální excitace pro DAPI je při vlnové délce 358 nm, což odpovídá UV záření. Maximální emise je při hodnotě 461 nm. DAPI tedy vidíme jako modré fluorescenční barvivo. Celé fluorescenční spektrum barviva DAPI je na Obr. 5.[19]



Obr. 5: Fluorescenční spektrum barviva DAPI Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.

Vzhledem k tomu, že nanočástice jsou velmi malých rozměrů, nelze je pozorovat ani pod konfokálním mikroskopem, a proto je nutné obarvit je také fluorescenčním barvivem. Zde se využívá fluorescenční barvivo Rhodamine B s maximální excitací 560 nm a maximální emisí 627 nm. Nanočástice vidíme jako červené oblasti.

Nejdůležitější vizualizace je sledování genové exprese a lokalizace proteinů, čímž lze určit efektivitu transfekce. Pro tento účel bylo použito barvivo GFP. Je to fluorescenční protein, který pohlcuje modré světlo (maximum emise 475 nm) a vyzařuje světlo zelené (maximum excitace 508 nm). Celé jeho spektrum je na Obr. 6. [19]



Obr. 6: Fluorescenční spektrum proteinu GFP [19]

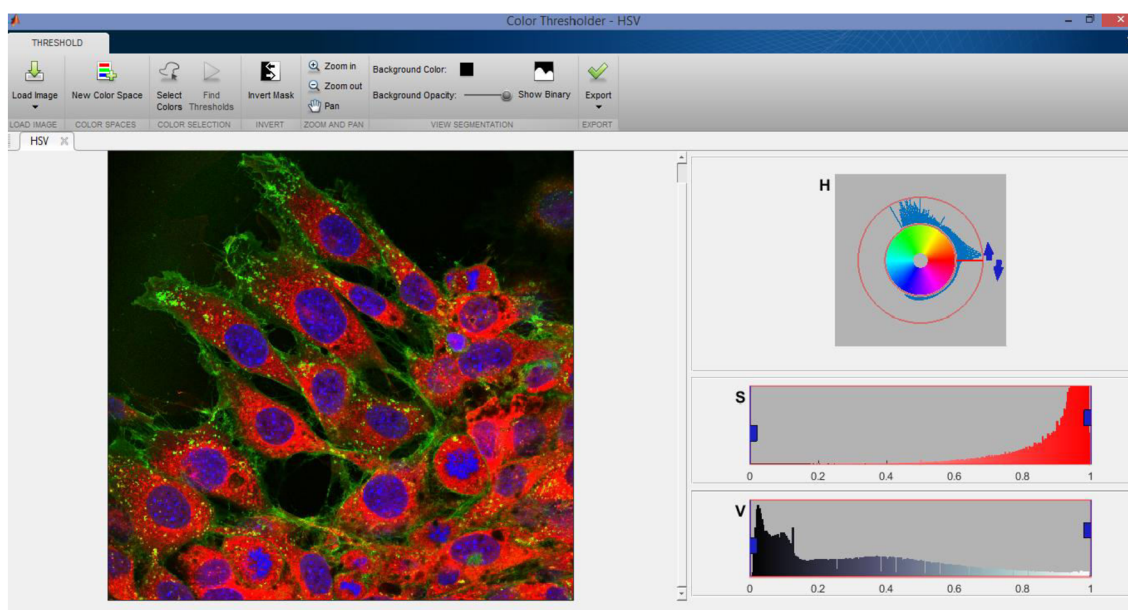
6. ZPRACOVÁNÍ OBRAZŮ

Pro statistické vyhodnocení a zpracování nasnímaných dat bylo použito programovací prostředí Matlab R2016a. Získaná data byla zpracována dvojím způsobem v závislosti na vlastnostech obrazu. Barevné (RGB) obrazy jsou nejprve zpracovány pomocí aplikace Color Thresholder, kde prahováním získáme binární obraz.

6.1. RGB obrazy

RGB obrazy jsou zpracovány pomocí Image Processing Toolbox™, který poskytuje řadu algoritmů a aplikací pro zpracování a analýzu dat. Lze provádět segmentaci obrazu, zlepšení kvality, redukci šumu, zpracování 3D obrazu a další. Dostupné aplikace umožňují práci prostřednictvím interaktivního prostředí – je možné manuálně nastavit vlastnosti obrazu, vytvářet histogramy a manipulovat s oblastmi zájmu.

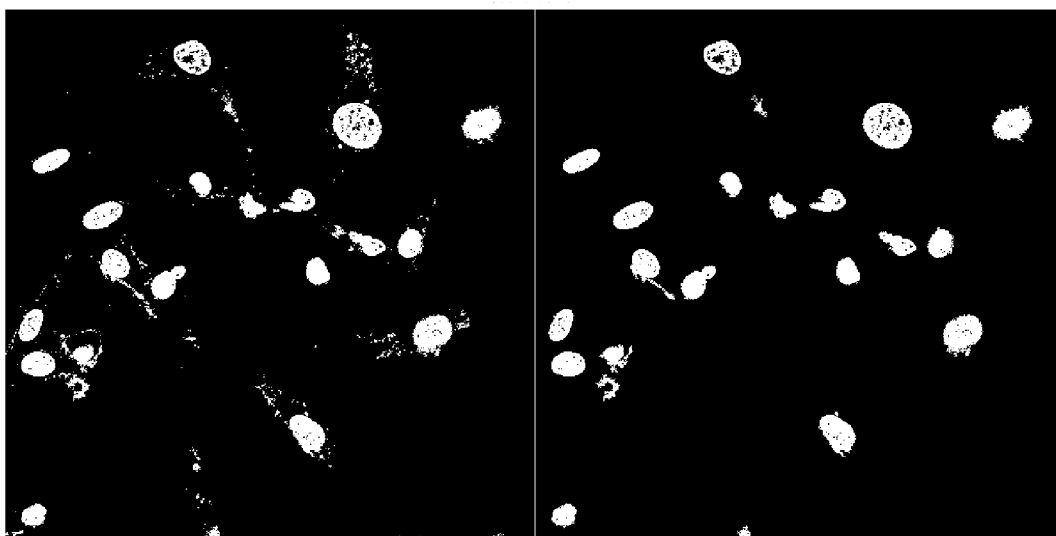
Pomocí aplikace Color Thresholder lze vytvořit binární masku RGB obrazu, kterou požadujeme pro následné vyhodnocení dat. Po načtení RGB obrazu je nejdříve nutné vybrat vhodné prostředí, ve kterém chceme dále pracovat. Pro nasnímaná data bylo použito prostředí HSV – barevný model, který pracuje se třemi parametry. Parametr H (Hue) určuje odstín. Pomocí této komponenty volíme požadovanou barvu. S (Saturation) určuje sytost a V (Value) jas barvy. Sytost a jas se volí v rozmezí [0, 1] nastavováním histogramů. Na Obr. 7 vidíme možnou manipulaci s komponentou H pro výběr barev a případné nastavení dalších vlastností pomocí histogramů S a V. Po tom, co byla vybrána požadovaná oblast, je možné zobrazit binární masku. Segmentované obrazy lze exportovat do workspace. [25][26]



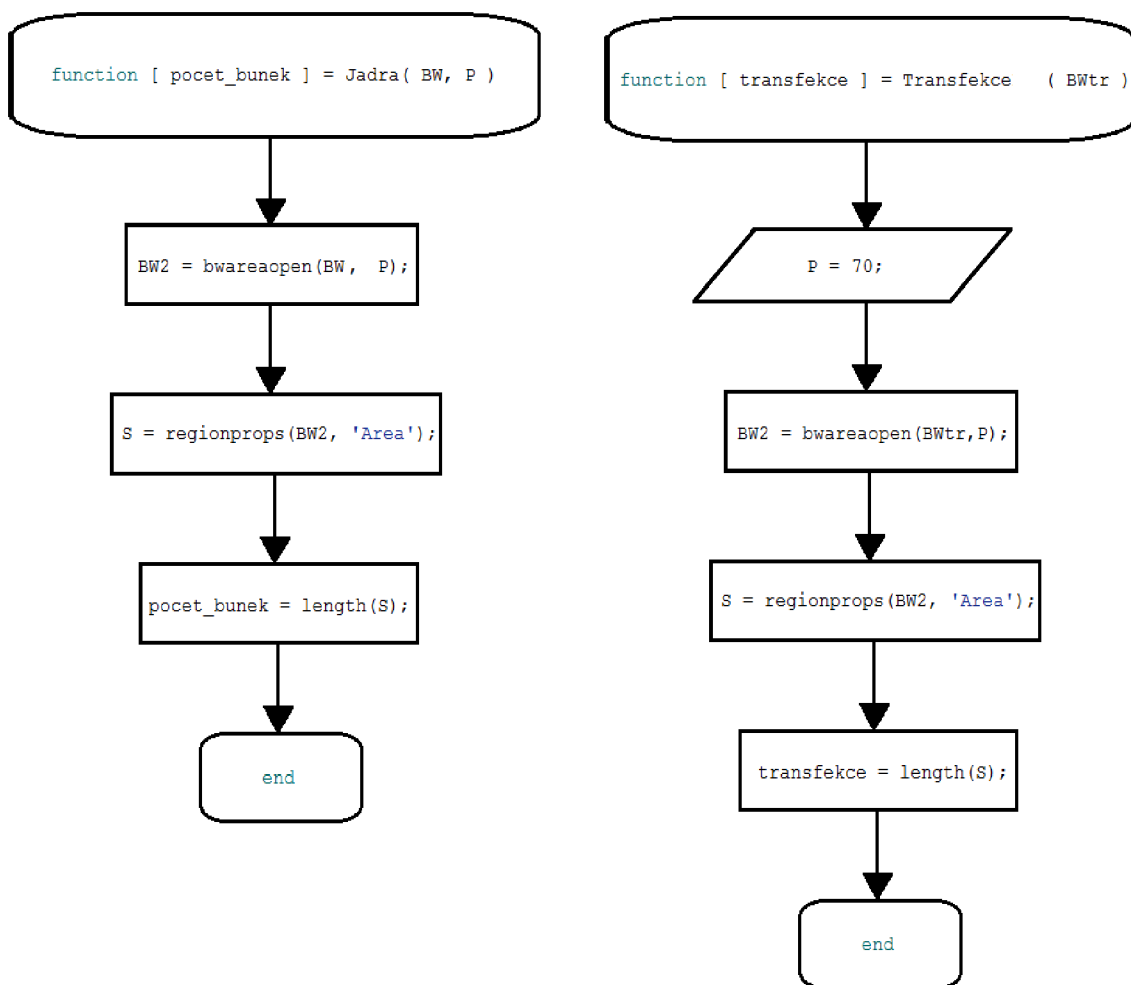
Obr. 7: Aplikace Color Tresholder – HSV

Pro statistické vyhodnocení nasnímaných dat byly získány binární masky dvou hlavních oblastí zájmu – jader a transfekovaných oblastí. Po spuštění programu je nejprve nutné tato data načíst do workspace. Dál byly vytvořeny funkce s názvem Jadra a Transfekce, které pomocí příkazu *bwareaopen* upraví binární obraz tak, aby byly odstraněny objekty menší než zvolený práh P. Ten je pro funkci Jadra nastaven na hodnotu 100, ve funkci Transfekce na hodnotu 70 pixelů. Příklad zpracování jader buněk pomocí tohoto příkazu je na Obr. 8. Poté je příkazem *regionprops* vytvořena struktura udávající počet pixelů každého objektu.[25][26] Délka struktury tedy udává počet nalezených objektů. Jednotlivé vývojové diagramy pro obě použité funkce jsou na Obr. 9.

Tímto způsobem je nalezen celkový počet buněk v obraze a počet buněk s úspěšnou transfekcí. Funkce jsou volány ze skriptu *transfekcni_efektivitaRGB*. Výsledná transfekční efektivita je vypočítána jako podíl počtu transfekovaných buněk a celkového počtu buněk. Výsledek je převeden na procenta a zapsán do tabulky pro konkrétní experiment. Při zpracování dat, u kterých transfekce nemohla nastat (jamka obsahovala pouze buňky nebo buňky a MNPs), je volána jen funkce pro počítání jader buněk. Transfekční efektivita zde není počítána a do tabulky je zapsána jen informace o počtu buněk.



Obr. 8: Binární obraz jader bez upravení (vlevo), binární obraz jader po úpravě (vpravo)



Obr. 9: Vývojový diagram funkcí Jadra (vlevo) a Transfekce (vpravo)

6.2. BW obrazy

Některé původní obrazy byly naskenovány jako jednotlivé kanály – modrý pro jádra buněk, zelený pro transfekované buňky a červený pro magnetické nanočástice. Kanály jsou naskenovány jednotlivě kvůli lepšímu rozlišení a zobrazení pouze vybrané oblasti. Získané obrazy jsou dvourozměrné ve formátu *uint8*.

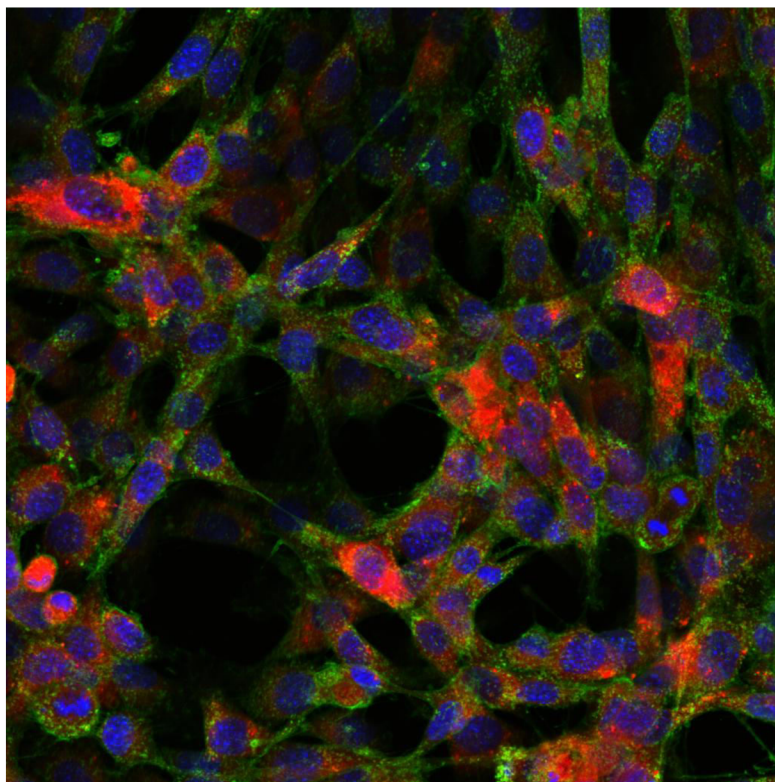
Ve skriptu *transfekcni_ektivitaBW* a *negativni_kontrola* jsou obrazy po načtení převedeny do binárního datového typu pomocí příkazu *im2bw*. K převodu se využívá nastavený práh v rozmezí [0, 1].[25] Poté jsou již data zpracována stejně, jako u RGB obrazů. Jsou volány funkce *Jadra* a *Transfekce* pro získání počtu požadovaných oblastí. Pro funkci *Jadra* je nastaven práh na hodnotu 150 pixelů, pro funkci *Transfekce* práh zůstává nezměněn, tedy na hodnotě 70 pixelů. Dále je vypočítána transfekční efektivita jako podíl výsledků obou funkcí a konečný výsledek je zapsán do předem definované tabulky.

7. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Buňky byly naskenované konfokálním mikroskopem. Takto byly získány obrazy z dvanácti experimentů. Vždy byl spočítán počet buněk v jednom obraze jako počet modře svítících jader. Poté bylo spočítáno množství buněk ve stejném obraze, které svítily zeleně díky barvivu GFP. Transfekční efektivita byla určena jako podíl transfekovaných buněk a celkového počtu buněk. Nicméně transfekce nebyla pozorována u všech experimentů. V následujícím textu jsou popsány jednotlivě pouze ty, které dopadly úspěšně. Výsledky experimentu I jsou pouze ilustrativní.

7.1. Výsledky experimentu I

Výsledkem prvního experimentu jsou obrazy, které bychom chtěli získat v dalších experimentech. Není zde použit fluorescenční protein GFP, ale WGA, který zviditelní vnitřní strukturu buňky. Nanočástice nejsou rozptýleny zcela rovnoměrně. Vidíme v některých buňkách větší množství nanočástic, v některých naopak menší. To pochopitelně také ovlivňuje výslednou transfekci.



Obr. 10: Výsledek experimentu I

7.2. Výsledky experimentu II

U druhého experimentu byly buňky naskenovány po 72 hodinové a 120 hodinové inkubaci. Při prvním skenování po 72 hodinách inkubace nebyla pozorována žádná

transfekce. Až po 120 hodinách bylo možné u některých obrazů určit transfekční efektivitu. Největší hodnotu pozorujeme při optimalizaci chitosanem o koncentraci 16,86 μl , a to až 95,87%. Další transfekce, ale s mnohem menší efektivitou, je pozorována u buněk s modifikací PEI a také s modifikací chitosanu o koncentraci 11,24 μl . V Tabulka 8 jsou výsledky tohoto experimentu ze všech jamek, získané zpracováním obrazů v programovacím prostředí Matlab. V 1. a 5. jamce jsme žádnou transfekci neočekávali, protože k těmto buňkám nebyla přidána DNA, v případě 1. jamky ani MNPs. Tabulka 9 byla vytvořena manuálním počítáním buněk.

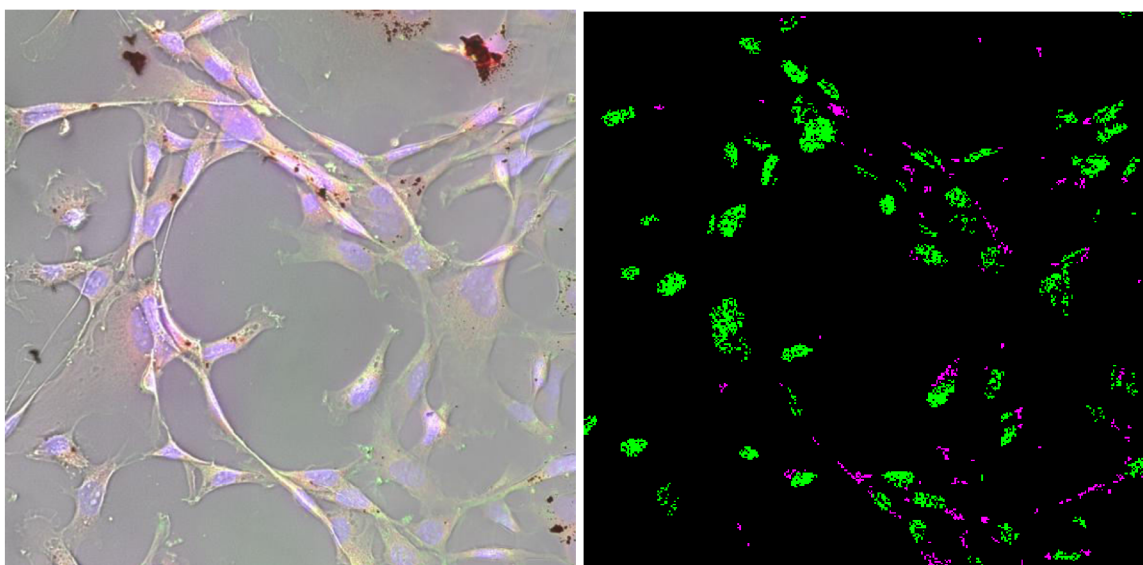
| | Modifikace | Počet buněk | Počet transfe- kovaných bu- něk | Transfekční efektivita [%] |
|----|------------------------------|--------------------|--|---------------------------------------|
| 1. | - | 99 | 0 | 0 |
| 2. | PEI 0,87 μl | 31 | 1 | 3,23 |
| 3. | PEI 1,74 μl | 247 | 11 | 4,45 |
| 4. | PEI 2,61 μl | 151 | 13 | 8,61 |
| 5. | - | 422 | 0 | 0 |
| 6. | Chitosan 5,62 μl | 193 | 0 | 0 |
| 7. | Chitosan 11,24 μl | 119 | 5 | 4,20 |
| 8. | Chitosan 16,86 μl | 121 | 116 | 95,87 |

Tabulka 8: Transfekční efektivita experimentu II

| | Modifikace | Poměry buněk | Transfekční efektivita [%] |
|----|------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| 1. | - | 0/71 | 0,00 |
| 2. | PEI 0,87 μl | 6/19 | 31,58 |
| 3. | PEI 1,74 μl | 43/95 | 45,26 |
| 4. | PEI 2,61 μl | 2/45 | 4,44 |
| 5. | - | 0/332 | 0,00 |
| 6. | Chitosan 5,62 μl | 0/219 | 0,00 |
| 7. | Chitosan 11,24 μl | 3/86 | 3,49 |
| 8. | Chitosan 16,86 μl | 47/68 | 69,12 |

Tabulka 9: Transfekční efektivita v experimentu II – manuální výpočet

Po srovnání těchto metod vidíme rozdíly nejen ve výsledné transfekční efektivitě, ale také v počtech nalezených objektů. Musíme brát v úvahu, že algoritmus pro zpracování obrazů hledá oblasti s nastaveným minimálním počtem pixelů. Při úpravě obrazu ale mohlo dojít k rozdělení jádra, například pokud barvivo nebylo v jádře dostatečně symetricky rozloženo. Systém tak vyhodnotil více objektů, nezávisle na tom, zda se jedná o to stejné jádro. Manuálním výpočtem se této chyby snadno vyvarujeme, protože lidské oko vidí objekt jako celek. Nicméně tato metoda je zdoluhavá a časově náročná. Také zde může dojít k chybě způsobené nepřesným počítáním, zejména v obrazech s velkým počtem buněk. Na Obr. 11 vlevo je původní obraz z osmé jamky, tedy jamky s nejlepším výsledkem tohoto experimentu. Vpravo je zpracovaný obraz s viditelnými jádry buněk (zeleně) a transfekovanými oblastmi (fialově).



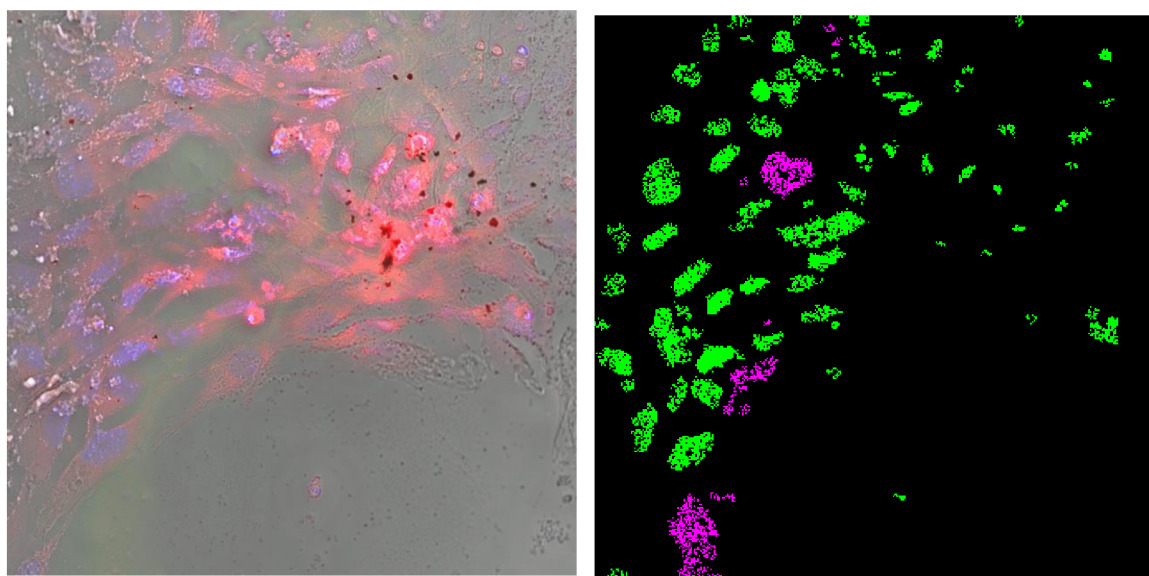
Obr. 11: Exp II - původní obraz (vlevo), zpracovaný obraz – jádra a oblast transfekce (vpravo)

7.3. Výsledky experimentu V

Všechna data z tohoto experimentu byla vyhodnocena pomocí algoritmu pro zpracování RGB obrazů. V Tabulka 10 jsou výsledky ze všech polí. Nejvyšší transfekční efektivita (16,67 %) je při modifikaci PEI s množstvím 5,22 μ l. Výsledek z této jamky je na Obr. 12, kde vlevo vidíme původní obraz a vpravo zpracovaný obraz. Jako na předchozím obrázku, i zde jsou dvě segmentované oblasti – jádra jsou znázorněna zelenou barvou a transfekované oblasti barvou fialovou.

| | Modifikace | Počet buněk | Počet transfe- kovaných bu- něk | Transfekční efektivita [%] |
|----|------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 1. | - | 83 | 0 | 0 |
| 2. | PEI 1,74 μ l | 9 | 0 | 0 |
| 3. | PEI 3,48 μ l | 153 | 2 | 1,31 |
| 4. | PEI 5,22 μ l | 78 | 13 | 16,67 |
| 5. | - | 139 | 0 | 0 |
| 6. | Chitosan 11,24 μ l | 121 | 0 | 0 |
| 7. | Chitosan 22,48 μ l | 84 | 3 | 3,57 |
| 8. | Chitosan 33,72 μ l | 0 | 0 | 0 |

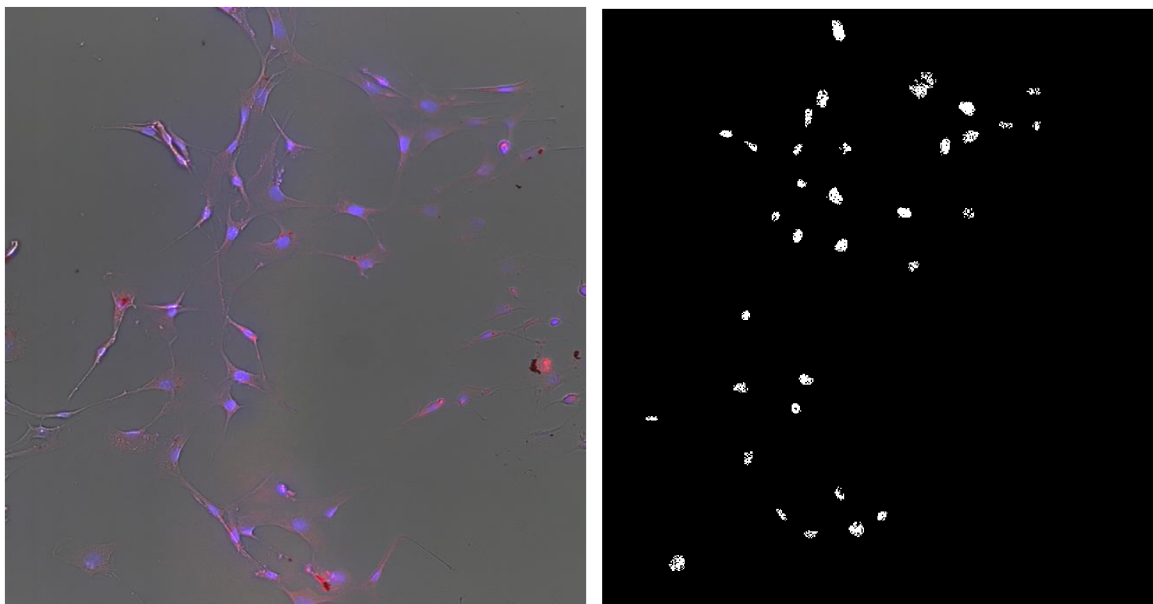
Tabulka 10: Transfekční efektivita experimentu V



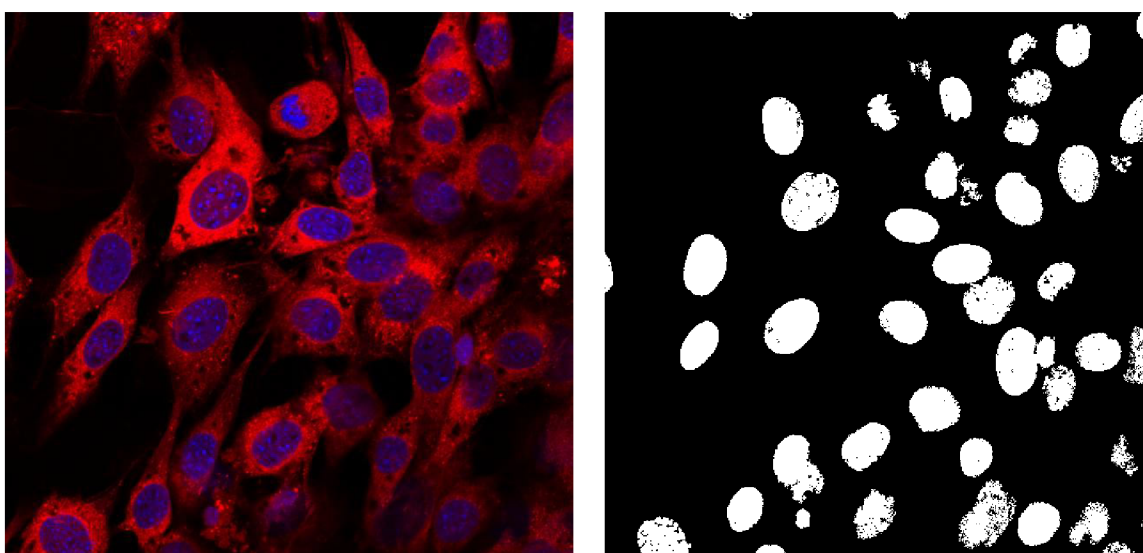
Obr. 12: Exp V - původní obraz (vlevo), zpracovaná jádra a oblast transfekce (vpravo)

7.4. Experimenty III, IV, VII, IX

V těchto experimentech nebyla pozorována žádná transfekce. Proto musíme konstatovat, že dopadly neúspěšně. Na některých obrazech lze pozorovat nanočástice v buňkách, avšak transfekci zde nevidíme žádnou. Na Obr. 13 je výsledek ze třetího experimentu, při modifikaci chitosanem s koncentrací 11,24 μ l a na Obr. 14 je výsledek z experimentu IX. Na obou obrázcích vlevo vidíme původní obraz buněk, kde jsou jasně viditelná jádra i oblasti s magnetickými nanočásticemi. Vpravo je binární obraz, na kterém jsou viditelná pouze jádra buněk.



Obr. 13: Exp III - původní obraz (vlevo), zpracovaný obraz - oblast jader buněk (vpravo)



Obr. 14: Exp IX - původní obraz (vlevo), zpracovaný obraz - oblast jader buněk (vpravo)

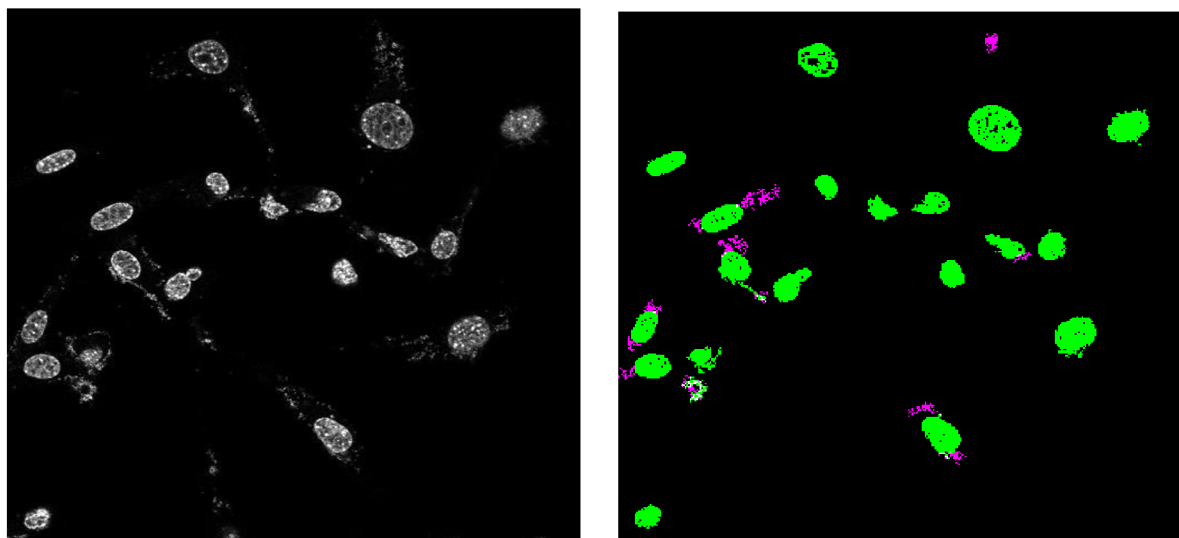
7.5. Výsledky negativní kontroly

Tyto kontroly slouží pro srovnání s uskutečněnými experimenty, ve kterých jsou použity dva různé roztoky PEI a DNA. Přesná aplikace je popsána v kapitole 5. Negativní kontrola byla realizována dvakrát – se staršími a s novějšími roztoky. Transfekce zde není provedena pomocí magnetických nanočástic, ale pouze aplikací PEI a DNA k buňkám. Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 11. Lepší výsledek pozorujeme u transfekce, kde bylo použito staré PEI a DNA. Efektivita je zde 78,13 %. U transfekce s aplikovaným novým PEI a DNA je efektivita 40 %. Na Obr. 15 jsou obrázky negativní kontroly s novějšími roztoky, na Obr. 16 se staršími. V obou přípa-

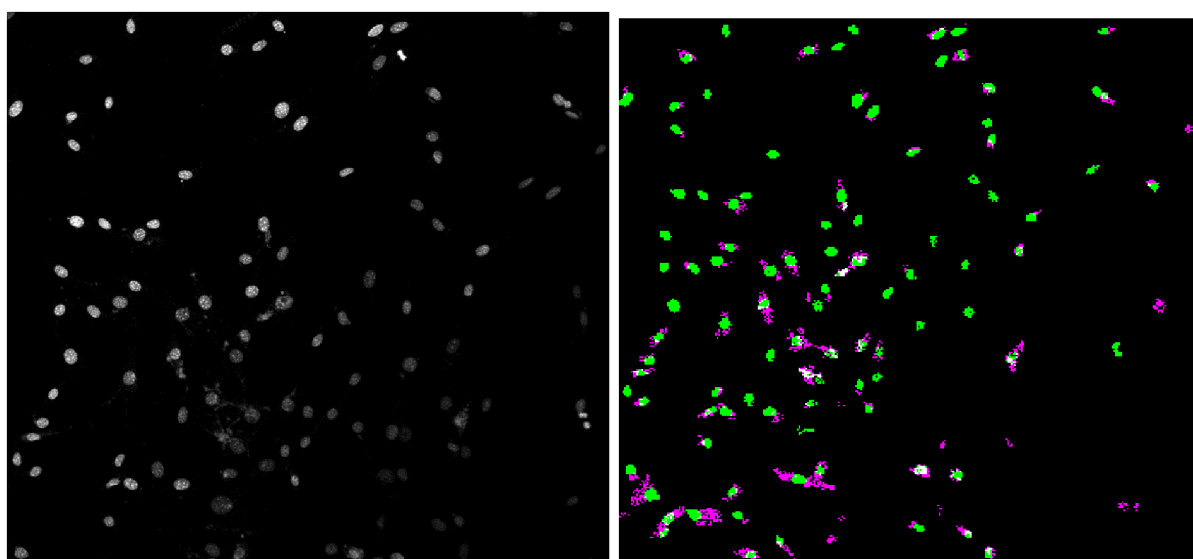
dech je vlevo originální obraz, získaný skenováním buněk konfokálním mikroskopem, a vpravo segmentovaný obraz jader (zelené oblasti) a transfekce (fialové oblasti).

| | Počet buněk | Počet transfekovaných buněk | Transfekční efektivita [%] |
|-----------------|-------------|-----------------------------|----------------------------|
| Nové DNA i PEI | 20 | 8 | 40 |
| Staré DNA i PEI | 96 | 75 | 78,13 |

Tabulka 11: Transfekční efektivita negativní kontroly



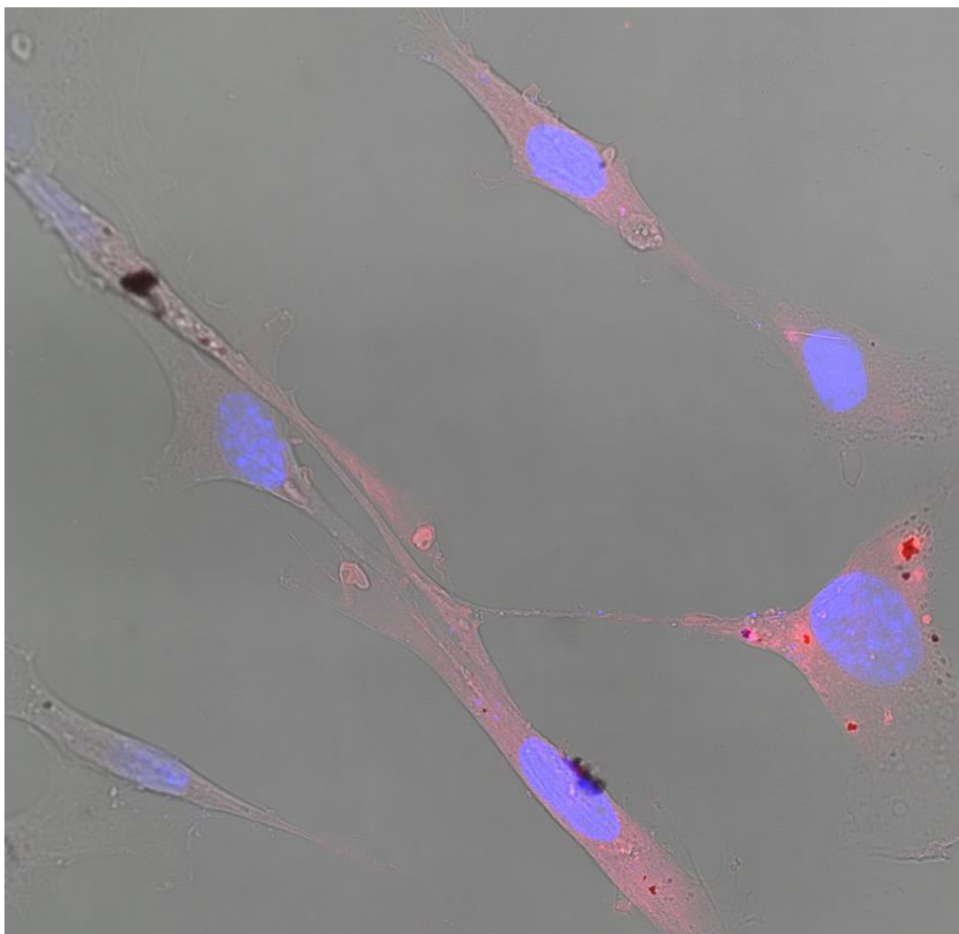
Obr. 15: Kontrola s novým PEI a DNA - původní obraz (vlevo), zpracovaný obraz (vpravo)



Obr. 16: Kontrola se starým PEI a DNA - originální obraz (vlevo), zpracovaný obraz (vpravo)

7.6. Post-transfekční lokalizace MNPs

Jak bylo popsáno v kapitole 3, při transfekci jsou nejprve magnetické nanočástice s navázanou DNA endocytovány. Nukleová kyselina je poté uvolněna a dostává se do buněčného jádra. Na Obr. 17 vidíme rozložení nanočástic v buňkách (červené oblasti). Jádra (modré oblasti) mají na povrchu jadernou membránu, přes kterou magnetické nanočástice neprostupují, ale jsou distribuovány v cytoplasmě, dokud nejsou organismem metabolizovány.



Obr. 17: Rozložení MNPs v cytoplasmě

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla rozdělena na dvě části. Nejdříve jsme se zabývali teoretickými znalostmi z oblasti nanočástic, zejména magnetickými, a jejich využitím v medicíně. Byly popsány změny vlastností při nanesení funkční vrstvy a jejich funkcionalizace. Následně bylo rozebráno téma transfekce, tedy vnesení dodatečné genetické informace do intracelulárního prostředí buňky a následný vliv na buňku a její genetickou expresi. Byly také popsány známé metody transfekce a vyhodnocení její efektivity. Jedna kapitola byla věnována konkrétní aplikaci magnetických nanočástic pro transfekci buněk. Zmíněny byly také výhody této metody ve srovnání s ostatními transfekčními metodami, mezi něž patří především vyšší transfekční efektivita. Proto byl v této bakalářské práci kladen důraz na experimentální část, která byla nosníkem práce. Cílem bylo dosáhnout co nejvyšší efektivity.

V experimentální části byla nejdříve popsána somatická buněčná linie 3T3, se kterou se při experimentech pracovalo, rovněž je diskutována práce s těmito buňkami, která vždy předcházela samotnému experimentu, jako je kultivace a pasážování. Následně byl popsán přesný postup experimentu. Nejprve transfekce, včetně modifikace nanočástic pomocí PEI nebo chitosanu, poté negativní kontrola, fixace buněk a použitá fluorescenční barviva. K obarvení buněčných jader bylo použito barvivo DAPI, takže jádra jsou vidět modře. Na nanočástice bylo navázáno červené barvivo rhodamine a úspěšnost transfekce byla sledována zeleným barvivem GFP, které reaguje na specifické genové exprese a přispívá tak k lokalizaci proteinů.

Zpracování získaných obrazů bylo realizováno v programovacím prostředí Matlab R2016a s využitím aplikace Color Thresholder. Vyhodnocení transfekční efektivity probíhalo na základě poměru počtu transfekovaných buněk a celkového počtu buněk v obraze. Transfekci bylo možné pozorovat ve druhém experimentu, ve kterém byla jako nejlepší výsledek určena osmá jamka, tedy modifikace chitosanem s koncentrací 16,86 μl , a to 95,87%. Transfekce byla pozorována také na dalších buňkách, nicméně s menší efektivitou.

I přes počáteční neúspěch přináší tato metoda transfekce mnoho výhod a uplatnění v medicíně. Např. při nádorových onemocněních lze optimalizovat nadměrnou expresi určitých proteinů a tím omezit nádorové bujení. I když je manipulace s lidskou DNA velmi často rozebírána v oblastech etiky, v budoucnu by mohla řešit řadu dosud neléčitelných nemocí.

Literatura

- [1] WANG, Edina C a Andrew Z WANG. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro [online]. 2014, roč. 6, č. 1, s. 9–26. ISSN 1757-9694.
- [2] *Nanotechnologie, nanočástice a nanomateriály*. [online]. 2013 [cit. 2017-12-08]. Dostupné z: <http://www.nanocastice.cz/>
- [3] Taniguchi N. On the Basic Concept of “Nano-Technology” // Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo. Part II. — Japan Society of Precision Engineering, 1974.
- [4] *Nano: National Nanotechnology Initiative* [online]. USA [cit. 2017-12-08]. Dostupné z: <https://www.nano.gov/>
- [5] DRBOHLAVOVÁ, Jana. *Nanomateriály pro biomedicínské aplikace: Nanomaterials for biomedical applications : zkrácená verze habilitační práce*. Brno: VUTIUM, 2015. ISBN 978-80-214-5285-5.
- [6] BÍLEK, O. *Využití magnetických nanočástic pro transfekci plasmidu do HEK293 buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 46 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D.
- [7] DRBOHLAVOVÁ, Jana a Jana CHOMOUCKÁ. *Elektronika a biosenzory: Magnetické nanočástice v diagnostice* [PowerPoint]. [cit. 2017-12-08].
- [8] KIM, Tae Kyung a James H. EBERWINE. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **397**(8), 3173-3178 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3821-6>
- [9] Transfection. *Transfection Products, In Vivo Transfection Reagents, 100+ Cell Line Optimized Transfection Kits* [online]. 2017 [cit. 2017-11-21]. Dostupné z: <http://transfection.ws/>
- [10] 3T3 Cells. *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2017-11-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68016475>

- [11] *NIH3T3 Cell Line Transfection, Expression and Culture* [online]. [cit. 2017-12-11]. Dostupné z: <http://www.nih3t3.com/>
- [12] *Mikroskopická technika: Kultivace buněk in vitro* [online]. Ústav patologické fyziologie LF MU, 18 [cit. 2017-12-11]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/patfyz/>
- [13] SKOPALÍK, Josef. *Základy izolace buněk a jejich kultivace in-vitro* [Microsoft Office PowerPoint]. , 51 [cit. 2017-12-11].
- [14] Magnet assisted transfection (MATra). *IBA Lifesciences* [online]. IBA Headquarters, 2017 [cit. 2017-12-11]. Dostupné z: <https://www.iba-lifesciences.com/magnet-assisted-transfection.html>
- [15] *MATra: Magnet-Assisted Transfection: Greatly improved transfection rates in just a few minutes* [online]. Nederland: Bio-Connect B.V., 2008 [cit. 2017-11-30]. Dostupné z: <https://www.bio-connect.nl/matra-magnet-assisted-transfection/cnt/page/2055>
- [16] Plasmid DNA Transfection. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham, MA U.S.A.: 2016 [cit. 2017-11-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/transfection/choosing-a-transfection-reagent.html>
- [17] *An Introduction to Transfection Methods: Technical Reference Guide* [online]. , 6 [cit. 2017-12-02]. Dostupné z: bio.lonza.com/go/literature/71.pdf
- [18] *Fixace tkáně - Histologický atlas* [online]. Univerzita Karlova: Klára Maratová, 2015 [cit. 2017-12-09]. Dostupné z: <http://biologie.pedf.cuni.cz/maratova/fixace-tkan-.html>
- [19] *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham, MA U.S.A. [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html>
- [20] Green fluorescent protein. *ScienceDirect* [online]. Elsevier, 2017 [cit. 2017-12-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/green-fluorescent-protein>
- [21] Magnetic Nanoparticles for Biomedicine. *Intracellular Delivery*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, 2011-4-27, , 363-372. Fundamental Biomedical

Technologies. DOI: 10.1007/978-94-007-1248-5_13. ISBN 978-94-007-1247-8. Dostupné také z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-007-1248-5_13

- [22] UMUT, Evrim. Surface Modification of Nanoparticles Used in Biomedical Applications. ALIOFKHAZRAEI, M., ed. *Modern Surface Engineering Treatments* [online]. InTech, 2013, 2013-05-22 [cit. 2018-04-08]. DOI: 10.5772/55746. ISBN 978-953-51-1149-8. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/modern-surface-engineering-treatments/surface-modification-of-nanoparticles-used-in-biomedical-applications>
- [23] SREEKUMAR, Sruthi, Francisco M. GOYCOOLEA, Bruno M. MOERSCHBACHER a Gustavo R. RIVERA-RODRIGUEZ. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1), - [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1038/s41598-018-23064-4. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-23064-4>
- [24] LIU, Gang, Run-Wei LI a Yu CHEN. Magnetic Nanoparticle for Biomedicine Applications. *Nanotechnology: Nanomedicine&Nanobiotechnology* [online]. 2015, **2**(1), 1-7 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.24966/NTMB-2044/100003. ISSN 23812044. Dostupné z: <http://www.heraldopenaccess.us/fulltext/Nanotechnology-Nanomedicine-&-Nanobiotechnology/Magnetic-Nanoparticle-for-Biomedicine-Applications.php>
- [25] *MathWorks* [online]. United States, c1994-2018 [cit. 2018-05-20]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/>
- [26] NOVOTNÝ, Martin. *Rozpoznávání objektů s využitím programu Matlab* [online]. Brno, 2012 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/zp/portal_zp.pl?prehled=vyhledavani;podrobnosti=48924. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně, Provozně ekonomická fakulta. Vedoucí práce Prof. RNDr. Ing. Jiří Šťastný, CSc.

Seznam zkratk

AFM: Mikroskop atomových sil, z angl. atomic force microscopy

BW: binární obraz (black-white)

CO₂: Oxid uhličitý

CNS: Centrální nervová soustava

DAPI: 4',6-diamidin-2-fenylindol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Kyselina deoxyribonukleová

Fe₃O₄: Magnetit

GFP: Green fluorescent protein

HSV: Barevný model (hue-saturation-value)

Chit: Chitosan

MATra: Magnet-Assisted Transfection

MNPs: Magnetické nanočástice, z angl. magnetic nanoparticles

MRI: Magnetická rezonance, angl. Magnetic Resonance Imaging

mRNA: Messenger RNA

NaCl: Chlorid sodný

nm: nanometr

PBS: Fosfátový pufr

PCR: Polymerázová řetězová reakce, z angl. Polymerase Chain Reaction

PEG: Polyethylenglykol

PEI: Polyethylenimin

PVA: Polyvinylalkohol

PVP: Polyvinylpyrolidon

RGB: Barevný model (red-green-blue)

RNA: Kyselina ribonukleová

siRNA: small interfering RNA

SPION: Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles

WGA: Wheat Germ Agglutinin

γ-Fe₂O₃: Maghemit

Seznam příloh

| | |
|--|----|
| Příloha A | 48 |
| Tabulky vyhodnocených experimentů | 48 |
| Příloha B | 51 |
| Obrazy nejvyšší transfekční efektivity | 51 |

Příloha A

Tabulky vyhodnocených experimentů

| | Modifikace | Počet buněk | Počet transfe- kovaných bu- něk | Transfekční efektivita [%] |
|----|------------------------|--------------------|--|---------------------------------------|
| 1. | - | 99 | 0 | 0 |
| 2. | PEI 0,87 μ l | 31 | 1 | 3,23 |
| 3. | PEI 1,74 μ l | 247 | 11 | 4,45 |
| 4. | PEI 2,61 μ l | 151 | 13 | 8,61 |
| 5. | - | 422 | 0 | 0 |
| 6. | Chitosan 5,62 μ l | 193 | 0 | 0 |
| 7. | Chitosan 11,24 μ l | 119 | 5 | 4,20 |
| 8. | Chitosan 16,86 μ l | 121 | 116 | 95,87 |

Tabulka 1: Experiment II

| | Modifikace | Počet buněk | Počet transfe- kovaných bu- něk | Transfekční efektivita [%] |
|----|------------------------|--------------------|--|---------------------------------------|
| 1. | - | 57 | 0 | 0 |
| 2. | PEI 1,74 μ l | 19 | 0 | 0 |
| 3. | PEI 3,48 μ l | 8 | 0 | 0 |
| 4. | PEI 5,22 μ l | 6 | 0 | 0 |
| 5. | - | 30 | 0 | 0 |
| 6. | Chitosan 11,24 μ l | 34 | 0 | 0 |
| 7. | Chitosan 22,48 μ l | 44 | 0 | 0 |
| 8. | Chitosan 33,72 μ l | 7 | 0 | 0 |

Tabulka 2: Experiment III

| | Modifikace | Počet buněk | Počet transfe- kovaných bu- něk | Transfekční efektivita [%] |
|----|------------------------|--------------------|--|---------------------------------------|
| 1. | - | 140 | 0 | 0 |
| 2. | PEI 1,74 μ l | 14 | 0 | 0 |
| 3. | PEI 3,48 μ l | 0 | 0 | 0 |
| 4. | PEI 5,22 μ l | 0 | 0 | 0 |
| 5. | - | 153 | 0 | 0 |
| 6. | Chitosan 11,24 μ l | 247 | 0 | 0 |
| 7. | Chitosan 22,48 μ l | 94 | 0 | 0 |
| 8. | Chitosan 33,72 μ l | 41 | 0 | 0 |

Tabulka 3: Experiment IV

| | Modifikace | Počet buněk | Počet transfe- kovaných bu- něk | Transfekční efektivita [%] |
|----|------------------------|--------------------|--|---------------------------------------|
| 1. | - | 83 | 0 | 0 |
| 2. | PEI 1,74 μ l | 9 | 0 | 0 |
| 3. | PEI 3,48 μ l | 153 | 2 | 1,31 |
| 4. | PEI 5,22 μ l | 78 | 13 | 16,67 |
| 5. | - | 139 | 0 | 0 |
| 6. | Chitosan 11,24 μ l | 121 | 0 | 0 |
| 7. | Chitosan 22,48 μ l | 84 | 3 | 3,57 |
| 8. | Chitosan 33,72 μ l | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 4: Experiment V

| | Modifikace | Počet buněk | Počet transfe- kovaných bu- něk | Transfekční efektivita [%] |
|----|------------------------|--------------------|--|---------------------------------------|
| 1. | - | 232 | 0 | 0 |
| 2. | PEI 1,74 μ l | 97 | 0 | 0 |
| 3. | PEI 3,48 μ l | 5 | 0 | 0 |
| 4. | PEI 5,22 μ l | 7 | 0 | 0 |
| 5. | - | 105 | 0 | 0 |
| 6. | Chitosan 11,24 μ l | 91 | 0 | 0 |
| 7. | Chitosan 22,48 μ l | 67 | 0 | 0 |
| 8. | Chitosan 33,72 μ l | 87 | 0 | 0 |

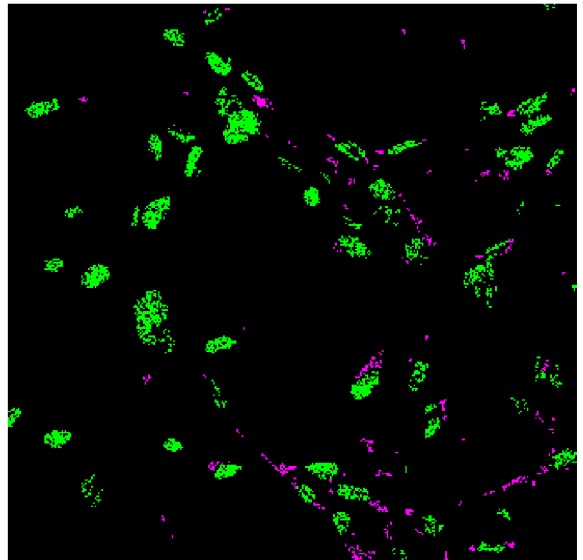
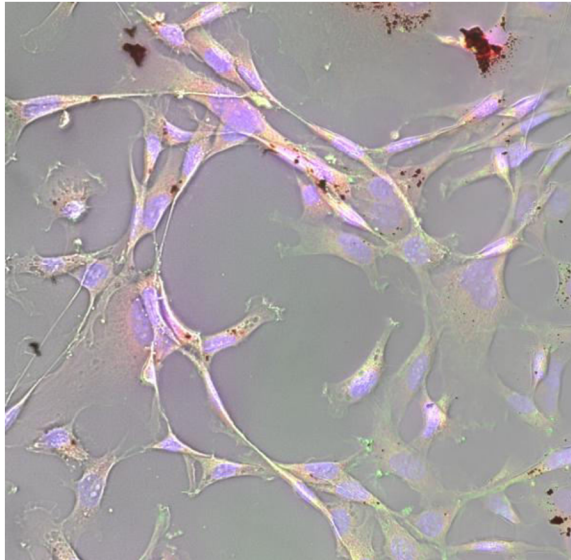
Tabulka 5: Experiment VII

| | Počet bu- něk | Počet transfe- kovaných bu- něk | Transfekč- ní efektiv- ita [%] |
|-----------------|--------------------------|--|---|
| Nové DNA i PEI | 20 | 8 | 40 |
| Staré DNA i PEI | 96 | 75 | 78,13 |

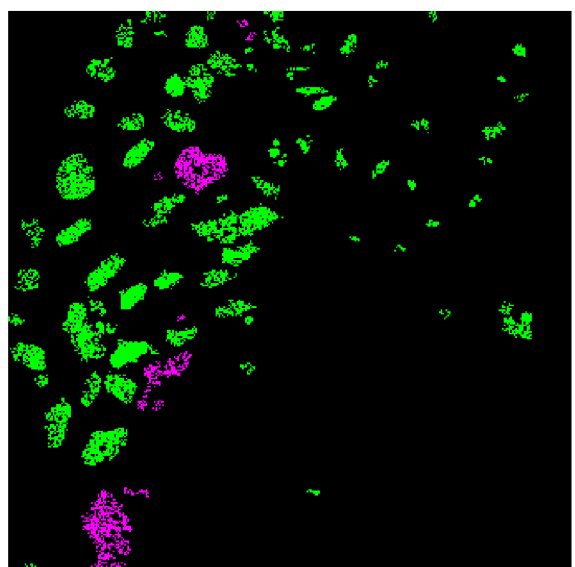
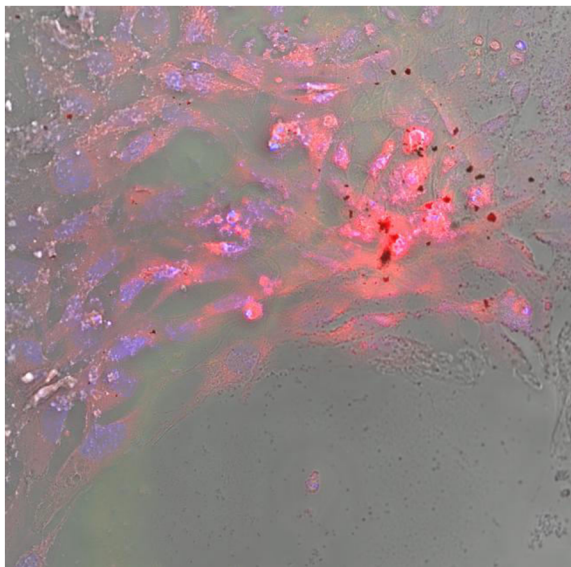
Tabulka 6: Negativní kontrola

Příloha B

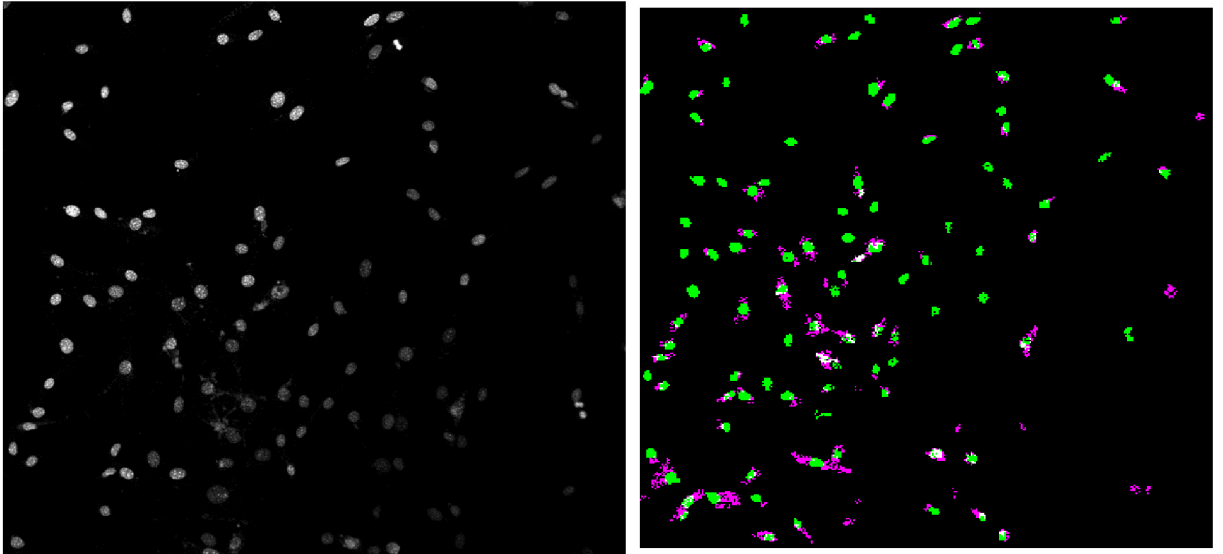
Obrazy nejvyšší transfekční efektivity



Obr. 1: Nejvyšší transfekční efektivity exp. II



Obr. 2: Nejvyšší transfekční efektivity exp. V



Obr. 3: Nejvyšší transfekční efektivita negativní kontroly