

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



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

**MONITOROVÁNÍ MITOCHONDRIÍ V ŽIVÝCH BUŇKÁCH S
VYUŽITÍM FLUORESCENČNÍCH METOD**

MONITORING OF MITOCHONDRIA IN LIVING CELLS USING FLUORESCENCE METHODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eliška Taliánová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

BRNO 2021

Bakalářská práce

bakalářský studijní program **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Eliška Taliánová

ID: 211491

Ročník: 3

Akademický rok: 2020/21

NÁZEV TÉMATU:

Monitorování mitochondrií v živých buňkách s využitím fluorescenčních metod

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se se strukturou a funkcí buněčných mitochondrií. 2) Seznamte se s metodami zobrazování mitochondrií a mitochondriální aktivity v živých buňkách a proveďte rešerši v této oblasti. 3) Navrhněte vhodný postup fluorescenčního značení buněk a zobrazování jejich mitochondrií. 4) Navrhněte protokol pro měření a hodnocení mitochondriální aktivity s využitím vybrané fluorescenční barvy. 5) Realizujte laboratorní experimenty zahrnující kultivace, přípravu buněk a akvizice buněčných obrazů mitochondrií s využitím fluorescenční konfokální mikroskopie za stanovených podmínek ovlivňující jejich aktivitu. Implementujte navržený protokol. 6) Proveďte hodnocení získaných dat. Lokalizujte mitochondrie a vyvoďte míru jejich aktivity. 7) Proveďte diskusi nad získanými výsledky. Výsledky porovnejte s teoretickými předpoklady.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Tools to Study Mitochondrial Morphology and Function. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/newsletters-and-journals/bioprobess-journal-of-cell-biology-applications/bioprobess-72/bioprobess-72-mitochondrial-morphology-function.html>

[2] MITRA, K., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches. Curr Protoc Cell Biol. 2010. Chapter 4:Unit-4.25.21. doi:10.1002/0471143030.cb0425s46

Termín zadání: 8.2.2021

Termín odevzdání: 28.5.2021

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

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

UPOZORNĚNÍ:

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

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se věnuje tématu monitorování mitochondrií a hodnocení jejich aktivity. Je zde stručně rozebrána stavba a funkce buněčných mitochondrií. Obsahuje výčet běžně dostupných fluorescenčních barviv. Zkoumá možnosti ovlivnění mitochondrií in vitro. Věnuje se ovlivnění mitochondriálního membránového potenciálu pomocí různých koncentrací glukózy a následně hodnotí mitochondriální aktivitu s využitím barviva JC-10.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mitochondrie, membránový potenciál, fluorescenční značení, barvivo JC-10, mitochondriální aktivita

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the topic of monitoring mitochondria and evaluating their activity. The structure and function of cellular mitochondria are briefly discussed. Contains a list of commonly available fluorescent dyes. It investigates the possibilities of influencing mitochondria in vitro. It deals with the influence of mitochondrial membrane potential by means of various concentrations of glucose and subsequently evaluates mitochondrial activity using the dye JC-10.

KEYWORDS

Mitochondria, membrane potential, fluorescent labeling, JC-10 dye, mitochondrial activity

TALIÁNOVÁ, Eliška. *Monitorování mitochondrií v živých buňkách s využitím fluorescenčních metod*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2021, 45 s. Bakalářská práce. Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

Prohlášení autora o původnosti díla

Jméno a příjmení autora: Eliška Taliánová
VUT ID autora: 211491
Typ práce: Bakalářská práce
Akademický rok: 2020/21
Téma závěrečné práce: Monitorování mitochondrií v živých buňkách s využitím fluorescenčních metod

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

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

Brno

.....

podpis autorky*

*Autor podepisuje pouze v tištěné verzi.

Obsah

Úvod	9
1 Mitochondrie	10
1.1 Stavba	10
1.2 Funkce	12
1.3 Mitochondriální membránový potenciál	13
2 Ovlivnění mitochondrií in vitro	15
2.1 Vliv kyslíku	15
2.2 Vliv vápníku	16
2.3 Vliv glutamátu	16
2.4 Vliv glukózy	17
3 Fluorescenční značení	18
3.1 Barviva	18
3.2 Úprava preparátu po barvení	19
3.3 Měření mitochondriální aktivity	20
4 Fluorescenční mikroskopie	22
4.1 Fluorescenční mikroskop	22
4.2 Konfokální mikroskop	23
5 Kultivace buněk in vitro	25
5.1 Základní pojmy	25
5.2 Buněčné linie	26
5.3 Postup kultivace	26
5.4 Používané roztoky	27
6 Praktická část	29
6.1 Příprava buněk	29
6.2 Barvení	29
6.3 Nastavení měření	30
6.4 Hodnocení výsledků	31
Závěr	37
Literatura	38
Seznam symbolů a zkratk	42

Seznam obrázků

1.1	Stavba mitochondrie	11
3.1	Zobrazení HeLa buněk s využitím barviva CellLight	19
3.2	Spektrum barviva JC-10	20
4.1	Schéma fluorescenčního mikroskopu	22
4.2	Schéma konfokálního mikroskopu	23
6.1	Zobrazení buněk v optickém kanálu	31
6.2	Příklad zobrazení mitochondrií	32
6.3	Výsledek sloučení fluorescenčních kanálů	33
6.4	Buňky s fluorescenčním značením	33
6.5	Blokové schéma zpracování	34
6.6	Průměry a mediány rozdílů	34
6.7	Rozsahy rozdílů	35
6.8	Příklad apoptických buněk	36
A.1	Ukázka z Microsoft Excel	45

Úvod

Mitochondrie jsou semiautonorní organely, které se nacházejí v eukaryotických buňkách. Jsou nezbytné pro správnou buněčnou funkci a zajišťují množství procesů. Jde hlavně o buněčné dýchání a s ním spojenou produkci energie (ve formě ATP), o produkci tepla (zajišťování termoregulace), část metabolismu tuků a steroidních látek, ukládání vápníku (stejně jako endoplasmatické retikulum – udržování homeostázy buňky) a apoptózu (mechanismy s ní spojené).

Velikosti i množství mitochondrií v buňce jsou značně různorodé. Odvíjí se především od energetické náročnosti buňky, od druhu organismu, druhu tkáně, popřípadě stádia buněčného cyklu. Zatímco erythrocyty nemají žádné mitochondrie, jaterní buňka jich může mít až 2000.

Mitochondrie jsou organely s dvojitou membránou, které mají většinou tvar tyčinek. Obvykle nejsou pod mikroskopem viditelné, takže je třeba je obarvit vhodnými barvivy. K barvení používáme fluorescenční barviva, která po ozáření světlem o určité vlnové délce vyzáří světlo o jiné vlnové délce. Vhodné barvivo volíme v závislosti na druhu experimentu. Existuje jich celá řada, některá jsou vhodná pro sledování mitochondrií ve fixovaných buňkách, některá se dají použít, pokud chceme kromě mitochondrií sledovat i jiné organely. Některá nám umožňují pozorovat změny v membránovém potenciálu mitochondrií. Takto značené mitochondrie jde zobrazit pomocí fluorescenčních optických metod. Konkrétně se jedná o fluorescenční a konfokální mikroskopii, obě metody nám umožňují zobrazit obecně jakékoli fluorescenčně značené buněčné struktury.

Sledováním mitochondrií lze získat množství informací o jejich morfologii a o stavu buňky. V této práci budu popisovat možnosti detekce mitochondrií pomocí fluorescenčního značení a sledování konfokálním mikroskopem. Využiji barvivo, které umožňuje sledovat změnu v mitochondriálním membránovém potenciálu a tím určovat mitochondriální aktivitu.

Zaměřím se na ovlivnění mitochondrií pomocí různých látek. Zhodnotím aktivitu mitochondrií v rakovinných buňkách PB-3 po jejich ovlivnění různými koncentracemi glukózy.

1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonorní organely eukaryotických buněk. Zajišťují větší část buněčného dýchání (Krebsův cyklus – v matrixu, dýchací řetězec – na kristách) a výroby energie (ATP). Kromě toho se podílejí na produkci tepla, jsou součástí metabolismů tuků a steroidních látek. Ukládají vápník, čímž se podílejí na buněčné iontové homeostáze. Hrají významnou roli při buněčném dělení a při apoptóze (buněčné smrti).

1.1 Stavba

Jedná se o tyčinkovité útvary s dvojitou membránou. Vnější membrána se nijak neliší od membrán ostatních organel, má podobný poměr bílkovin a fosfolipidů jako buněčná membrána (1:1). Je jednoduchá, bez zvrásnění, obsahuje velké množství integrálních membránových proteinů (porinů).[1] Hlavním transportním proteinem je napěťově závislý aniontový kanál (VDAC). Tento kanál je primární transportér nukleotidů, iontů a metabolitů mezi cytosolem a intermembránovým (= mezimembránovým) prostorem. Vnější membrána obsahuje množství enzymů, které se podílejí například na prodlužování mastných kyselin, oxidaci adrenalinu a degradaci tryptofanu. Narušení vnější membrány umožňuje proteinům v intermembránovém prostoru prosakovat do cytosolu, což vede k apoptóze.

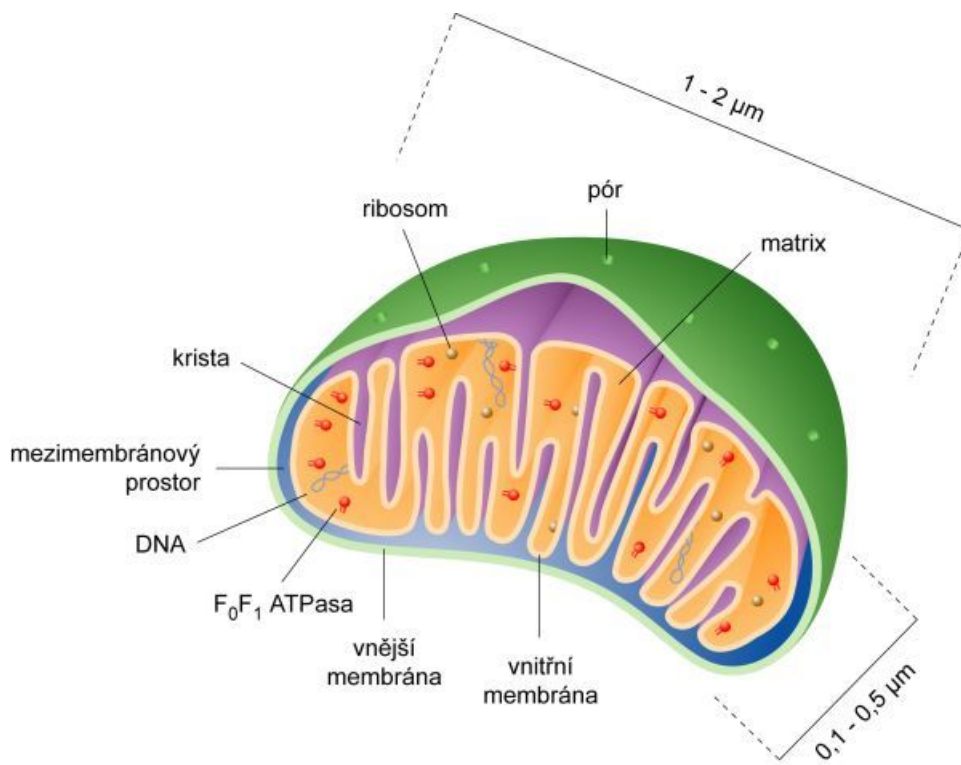
Mezi vnější a vnitřní membránou se nachází mezimembránový prostor. Díky tomu, že je vnější membrána dobře propustná pro malé molekuly (ionty, cukry) jsou jejich koncentrace v mezimembránovém prostoru stejné jako v cytosolu (mimo mitochondrii). Na rozdíl od nich musí mít velké proteiny specifickou signální sekvenci, aby mohly být transportovány přes vnější membránu. (Takovýmto způsobem se do mezimembránového prostoru dostává třeba cytochrom c.) Proto je proteinové složení intermembránového prostoru odlišné od proteinového složení zbytku buňky. Vnitřní membrána obsahuje proteiny se třemi typy funkcí:

- Proteiny, které provádějí redoxní reakce dýchacího (elektron transportního) řetězce
- ATP syntáza, která vyrábí ATP a uvolňuje ho do mitochondriální matrix
- Specifické transportní proteiny, které regulují průchod látek do a z mitochondriální matrix

Vnitřní membrána obsahuje více než 150 různých polypeptidů a má velmi vysoký poměr bílkovin k fosfolipidům (více než 3:1). Na rozdíl od vnější membrány neobsahuje poriny a je vysoce nepropustná pro všechny molekuly. Proto téměř všechny ionty a molekuly vyžadují speciální membránové transportéry (transportní kanály – TIM nebo OXA1L), aby mohly vstoupit do matrix. [1, 2]

Vnitřní membrána je zvrásněná do výběžků, kterým se říká kristy. Tyto výběžky mnohonásobně zvětšují povrch vnitřní membrány a zvyšují tím produkci ATP. Jejich počet se odvíjí opět od metabolické náročnosti buňky, ve které se mitochondrie nacházejí (mitochondrie ve svalových buňkách, které mají vysokou poptávku po ATP, jich budou mít víc). [2, 3]

Mitochondrie je vyplněna zrnitou látkou nazývanou mitochondriální matrix (mitochondriální cytoplasma). Ve které se nachází cirkulární chromosom mtDNA, který kóduje proteiny pro Krebsův cyklus a dýchací řetězec (neobsahuje všechny geny – některé jsou lokalizovány v buněčném jádře). Díky tomu jsou mitochondrie na rozdíl od jiných buněčných organel schopny se samostatně dělit nezávisle na buňce (semiautonomní organely). Kromě toho matrix obsahuje intramitochondriální granuly složené z fosfolipidů a anorganických materiálů. (Jako jsou například vápník, hořčík, stroncium, fosfor, atd.)



Obr. 1.1: Stavba mitochondrie [30]

Velikost i tvar mitochondrií jsou značně různorodé a jejich počet v buňce se odvíjí od druhu buňky a její metabolické aktivity. Čím více energie buňka potřebuje tím více má mitochondrií. Množství mitochondrií se může dále odvíjet od stáří nebo typu buňky, fázi buněčného cyklu případně buněčného zdraví. [2]

1.2 Funkce

Hlavní zdroj energie pro heterotrofní organismy představují sacharidy, především glukóza. Postupným rozkladem (oxidací) glukózy na vodu a CO_2 se získá energie ve formě ATP. Jedná se o náročný proces, který probíhá v různých částech buňky, nicméně část z něj (Krebsův cyklus a dýchací řetězec) probíhá v buněčných mitochondriích.

Po glykolýze, při které dochází ke štěpení glukózy na pyruvát a která probíhá v cytoplasmě buňky, dojde (pokud má buňka dostatek kyslíku) k transportu pyruvátu do mitochondrie. V mitochondriální matrix dojde k dalšímu štěpení a pyruvát je oxidován na Acetylkoenzym A (reakce pyruvátu s koenzymem A).

Krebsův cyklus (= citrátový cyklus) probíhá v mitochondriální matrix (většina enzymů volně v matrix pár je navázáno na vnitřní membráně). V podstatě jde o přeměnu Acetylkoenzymu A na CO_2 a H_2O za současného vzniku ATP a redukovaných koenzymů (NADH a FADH₂), které se dále zpracovávají v dýchacím řetězci. [2]

Dýchací (elektron-transportní) řetězec je zprostředkován enzymy ukotvenými ve vnitřní membráně (na kristách). To znamená, že metabolity přecházejí z matrix do intermembránového prostoru a zpět. Díky tomu je zajištěn přísun redukovaných koenzymů z Krebsova cyklu (a z glykolýzy probíhající v buněčné cytoplasmě). Podstatou dýchacího řetězce je přenos vodíků z redukovaných koenzymů na elementární kyslík za pomoci několika přenašečů. Přenosem dochází k uvolnění energie, která je dále využita k fosforylaci ADP na ATP (= oxidační fosforylace).

Díky procesům oxidační fosforylace a především díky protonovým pumpám (komplexy I, III a IV) vzniká mitochondriální membránový potenciál (důležitý pro uchování energie během oxidační fosforylace). Díky němu dochází k transportu iontů a proteinů, udržuje pohyb elektronů v elektronovém transportním řetězci a udržuje optimální elektrochemický gradient. Jeho pokles může vyvolat různé patologie. Hlavní úloha membránového potenciálu spočívá v řízení syntézy ATP (právě pomocí oxidační fosforylace) a jeho velikost je určena rovnováhou mezi produkcí a spotřebou ATP. [4]

Další možností, jak zpracovat protony navázané na redukované koenzymy je produkce tepla pomocí proteinu Termogeninu, který může být navázán na vnitřní mitochondriální membránu. K tomuto ději, který se jinak nazývá netřesová termoregulace, dochází především u adipocytů hnědé tukové tkáně (novorozenci, hibernující zvířata).

Kromě tohoto fungují mitochondrie jako zásobníky vápníkových iontů, podobně jako endoplasmatické retikulum. Pomáhají tím udržovat homeostázu buňky. [2] Navíc mají v matrixu přítomny enzymy potřebné pro beta-oxidaci mastných kyselin

(aerobní odbourávání). Tento děj produkuje acetylkoenzym-A (potřebný pro Krebsův cyklus) a redukované koenzymy, které se mohou dále uplatnit v dýchacím řetězci nebo při tvorbě tepla.

Mitochondrie se dále podílejí na apoptóze (řízeném zániku buňky). Ve vnější membráně mají vázány proapoptické a protiapoptické faktory, které jsou v normálním stavu buňky v rovnováze. Pokud dojde ke spuštění apoptózy (porušení DNA, radiace, atd.) jsou protiapoptické faktory inhibovány a proapoptické faktory vytvoří kanály v membráně. Těmito kanály uniká cytochrom C, který se dalšími procesy mění až na apoptozom. Tímto způsobem je řízena vnitřní apoptóza.

Aby byly mitochondrie schopny zajistit správný chod všech těchto procesů musí docházet k fúzím, které zajišťují výměnu mitochondriálních obsahů a udržují integritu mitochondriálního genomu. Navíc se mitochondrie musí štěpit (dělit) v závislosti na potřebě ATP. Poruchy těchto dvou funkcí mají za následek, krom jiného i periferní neuripatii, optické atrofie a novorozeneckou letalitu.

1.3 Mitochondriální membránový potenciál

Potenciál mitochondriální membrány ($\Delta\Psi_m$) je důsledkem redoxních reakcí spojených s Krebsovým cyklem a slouží jako způsob dočasné úschovy energie, kterou ATP syntáza využívá k tvorbě ATP. Tyto procesy generují kromě elektrického potenciálu i protonový gradient a společně tvoří transmembránový potenciál vodíkových iontů.

Pro normální funkci buněk je důležité aby byl $\Delta\Psi_m$ stabilní. V důsledku fyziologické aktivity může docházet ke změnám, ale je důležité aby byly jen přechodné, protože narušení mitochondriálního potenciálu může vést k ohrožení životaschopnosti buněk. Směr membránového potenciálu v buňce a mitochondriích určuje, že jsou kationty lépe transportovány dovnitř a anionty ven. Tato vlastnost umožňuje akumulaci kationtů kovu v mitochondriích.

Je obtížné určit optimální hodnoty $\Delta\Psi_m$. Čím vyšší je membránový potenciál tím vyšší je energetická kapacita vnitřní mitochondriální membrány a díky tomu i vyšší syntéza ATP, ale na druhou stranu je těžké vytvořit a udržet vysoké elektrické pole, vzhledem k přítomnosti různých membránových transportních proteinů, které tvoří převážnou část membrány a umožňují procházení různých látek skrz membránu. Iontové úniky z vnitřní membrány mohou výrazně ovlivňovat velikost $\Delta\Psi_m$, přičemž únik těchto iontů je exponenciálně závislý právě na membránovém potenciálu.

Kromě toho se mitochondriální dýchací řetězec při vysokých hodnotách membránového potenciálu stává významným producentem reaktivních forem kyslíku (jejich tvorba exponenciálně závisí na hodnotách $\Delta\Psi_m$), které způsobují oxidační stres a mohou vést k různým patologiím. Z toho důvodu je udržování příliš vysokého membránového potenciálu potenciálně škodlivé pro buňku. Na druhou stranu jsou

příliš nízké hodnoty také nevhodné z toho důvodu, že mitochondrie není schopna produkovat dostatečné množství ATP. A potenciálně také kvůli nízké produkci redukovaného kyslíku (ROS), což by mohlo vést k opačnému stavu k oxidačnímu stresu – takzvanému redukčnímu stresu, který je pro homeostázu buňky stejně škodlivý.

Jak už bylo zmíněno membránový potenciál pohání syntézu ATP. Tato syntéza vede ke snižování potenciálu. Ale funguje to i naopak – hydrolýza ATP zvyšuje hodnoty membránového potenciálu. Dá se říct, že čím je vyšší koncentrace intracelulárního ATP tím je $\Delta\Psi_m$ stabilnější. Protože mají mitochondrie dostatek prostředků si ho hydrolýzou ATP udržovat.

Nestabilita v hodnotách $\Delta\Psi_m$ nemusí vést k významným změnám mitochondriálních funkcí. V důsledku depolarizace mohou mitochondrie během krátké doby uvolnit nahromaděné nežádoucí látky, včetně kationtů. Důležitá je však doba, po kterou zůstává mitochondrie ve stavu depolarizace. dlouhodobá depolarizace může vést k vyřazení mitochondrie (mitochondriální smrt). Toto vede k uvolňování cytochromu C a jiných faktorů do buňky. Samozřejmě k vyvolání apoptózy je třeba překročit určitý práh v koncentracích těchto faktorů – úmrtí jedné mitochondrie nevede k buněčné smrti.

Dlouhodobá mitochondriální depolarizace je monitorována systémem, který hodnotí kvalitu mitochondrií a který spouští procesy makroautofagie (mitofagie), což vede ke zlikvidování nefunkční mitochondrie bez vyvolání apoptózy. Systém sekundárně monitoruje i hyperpolarizaci mitochondrií, která jak už bylo zmíněno vede k produkci reaktivních forem kyslíku. K eliminaci takových mitochondrií však dochází až při dlouhodobé hyperpolarizaci, protože krátkodobé zvýšení produkce ROS může buňkám sloužit jako signalizace. [21]

2 Ovlivnění mitochondrií in vitro

Působení různých látek způsobuje změny v mitochondriální aktivitě (v membránovém potenciálu). Například po přidání paracetamolu ke kultivovaným hepatocytům (myši) dojde po překročení určité dávky k poklesu membránového potenciálu (a útlumu dýchací kapacity). Při vyšších koncentracích (a delším působení přidané látky) navíc dochází k apoptóze. [12]

V rámci mé semestrální práce byl proveden jednoduchý pokus s buňkami SAOS-2. Tyto buňky byly kultivovány s odlišnou koncentrací glukózy v kultivačním médiu. Následně pak bylo pozorováno vychýlení mitochondriálního membránového potenciálu. Pro tento pokus bylo využito barvivo JC-10, které nám pomohlo k vyhodnocení mitochondriální aktivity.

V bakalářské práci jsem se zaměřila na měření a hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu jako znaku funkčnosti mitochondrií. Byla provedena krátká rešerše v oblasti ovlivňování membránového potenciálu.

2.1 Vliv kyslíku

Mitochondrie tvoří vysoce dynamickou tubulární síť, která je modulována častým štěpením a fúzí. Tyto procesy modulace jsou odpovědí na změny metabolických podmínek buňky. Tímto způsobem tedy hypoxie ovlivňuje mitochondrie. Dostupnost kyslíku v buňce snižuje oxidaci glukózy, zatímco jeho nedostatek způsobuje rychlejší odbourávání, které má zajistit dostatečnou produkci ATP prostřednictvím méně účinné anaerobní glykolýzy.

Za těchto podmínek trpí mitochondrie nedostatkem substrátů (acetyl-CoA a O_2), což vyvolává změny v jejich struktuře, funkci i dynamice. Vlivem poškození mitochondriální fúze navíc dochází k mitochondriální depolarizaci a ke ztrátě mtDNA, která má za následek změnu rychlosti dýchání a zhoršenou distribuci mitochondrií v buňkách. [15] Toto všechno ovšem platí pro velmi nízké hladiny kyslíku.

V další studii, provedené na lidských nervových progenitorových buňkách (NPC) získaných z kmenových buněk, je uvedeno, že při pěstování v 3% O_2 (=fyziemie) došlo ke změně mitochondrií a byla zlepšena produkce ATP.

Vystavíme-li buňky vyšší koncentraci kyslíku, než 21% (tak jak je obvyklé v atmosféře – normoxie), dojde v závislosti na koncentraci k usmrcení buněk. Dalším faktorem, který také hraje roli je čas, po který byly buňky hyperoxii vystaveny (například při 95% hladině O_2 dojde k poškození už po 6 hodinách).[16]

Hyperoxie indukuje v buňkách mitochondriální fragmentaci, která může být spojena s mitochondriální depolarizací. Toto vede ke snížení mitochondriální funkce a následnému usmrcení buňky.

2.2 Vliv vápníku

Ionty vápníku hrají v organismu důležitou roli. Vápník se podílí na účinku hormonů, humorálních látek, cytokininů a jiných mediátorů na metabolismus buněk. U člověka vytváří strukturu kostí a zubů (99%) a je nutný k procesu srážení krve (vápenaté ionty). Dále se uplatňuje při tvorbě kininů a regulaci enzymů. V kosterních svalech uvolňuje troponin, čímž aktivuje aktin a dochází ke svalové kontrakci (v hladkém svalu se váže na kalmodulin). V rámci buněk se vápenaté ionty podílejí na akčním potenciálu, motilitě (pohybu) a buněčném dělení.

Příjem iontů vápníku mitochondriemi má významný funkční dopad na buňky. Ionty vápníku se v mitochondriích podílejí na výrobě energie, přenosu regulačních signálů, propustnosti mitochondriálních pórů, a navíc hrají roli při apoptóze.

Mitochondrie mají navíc schopnost se chovat jako pufr pro Ca^{2+} ionty. V excitovatelných buňkách se mitochondrie, které jsou lokalizovány poblíž napětově řízených Ca^{2+} kanálů snaží vychytávat vápníkové ionty vstupující do buňky a tím snižují místní koncentraci Ca^{2+} kolem otevřených kanálů, což vede ke snížení exocytózy. Tyto účinky se mohou projevat různě v závislosti na uspořádání mitochondrií uvnitř buňky.

Kromě ovlivňování buněčných signálů má absorpce Ca^{2+} iontů mitochondriemi vliv i na samotné mitochondrie. Zvýšení koncentrace volných Ca^{2+} iontů v mitochondriální matrix vede k vyšší aktivitě dehydrogenáz a nosičů, což vede ke zvýšení produkce ATP. Tento mechanismus umožňuje mitochondriím sledovat signály Ca^{2+} a přizpůsobit produkci energie požadavkům buňky. Dlouhodobé zvyšování koncentrace Ca^{2+} iontů však může vyvolat procesy, které vedou k buněčné smrti. [17]

2.3 Vliv glutamátu

Toxicita glutamátu významně přispívá k smrti neuronových buněk při mozkové příhodě a dalších neurodegenerativních onemocněních (včetně Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby).[18]

Glutamát v rámci buněk způsobuje cytotoxicitu, která nakonec vede k buněčné smrti. Toto je spojeno s hyperpolarizací mitochondriální membrány a zvýšenou spotřebou kyslíku. Krom toho způsobuje zvýšenou mitochondriální fragmentaci. Ze studie provedené na myších neuronálních buňkách HT22 vyplývá, že se tomu dá zabránit současným podáním 100 nm seleničitanu sodného.[19]

2.4 Vliv glukózy

Hyperglykémie je charakteristický symptom diabetu. Zvýšená koncentrace glukózy vede k poškození mitochondrií, které pak nejsou schopny glukózu využít. Obecně vede hyperglykémie k mitochondriální fragmentaci (v závislosti na koncentraci). Tato fragmentace nemusí být trvalá, pokud jsou buňky vystaveny vysoké koncentraci glukózy pouze po určitou dobu. Po překročení této hranice dojde k trvalému poškození mitochondrií. [25] Dlouhodobé působení hyperglykémie následně způsobuje mitochondriální depolarizaci.

Diabetes mellitus je metabolické onemocnění, které postihuje téměř všechny orgány. Vysoká koncentrace krevní glukózy vede k nadměrné produkci ROS (redukováný kyslík), což pak sekundárně vede k intracelulárnímu oxidačnímu stresu a následnému oxidačnímu poškození buněk. [27]

Zajímavé je studium účinků hyperglykémie na rakovinné buňky. Buňky rakoviny prostaty byly kultivovány při zvýšené koncentraci glukózy (220 mg/dl) nebo se zvýšenou koncentrací mastných kyselin. Obojí vedlo ke zvýšení proliferace (= hojně množení umožněné vysokou mitotickou aktivitou), což souvisí se změnou mitochondriální aktivity. [28]

V další studii se věnovali efektu hyperglykémie na mesenchymální buňky (MSC). Tyto buňky jsou zajímavé pro budoucí klinické aplikace, protože jsou výhodné pro buněčnou terapii (hojení ran, diferenciaci různých buněk). Hyperglykémie u těchto buněk vede ke stárnutí a změnám telomer. Navíc vyšší koncentrace glukózy u těchto buněk zpomaluje proliferaci. [26]

Nadprodukce redukováných forem kyslíku (ROS) je ale spojená i s nízkými koncentracemi glukózy. Tato zvýšená tvorba vede k dysfunkci v endotelu, což hraje významnou roli v počátku aterosklerózy a dalších vaskulárních komplikací souvisejících s diabetem. [29]

3 Fluorescenční značení

Mitochondrie se dají zobrazit pomocí navázání fluorescenčního barviva na některou část a následném zobrazení pomocí fluorescenčního mikroskopu.

3.1 Barviva

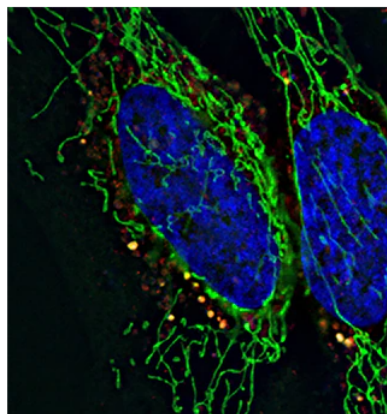
Obecně barviva fungují na navázání fluorescenčního komplexu na nějakou mitochondriální strukturu – například podjednotka VIII cytochrom c oxidázy, která je lokalizována v mitochondriální matrix, nebo některý z proteinů vnější (případně vnitřní) membrány. Existuje celá řada komerčně vyráběných barviv, takže v dnešní době nepředstavuje problém vybrat to správné, které nám umožní zobrazit naši oblast zájmu.

Barviva MitoTracker (red, deep red, green) jsou zachytávána funkčními mitochondriemi. Pokud po obarvení dojde k narušení mitochondriální funkčnosti, případně pokud jsou buňky fixovány, fluorescenční značení přetrvává. Díky tomu se tato barviva používají ke značení buněk, se kterými se dále pracuje (a už nezáleží na funkčnosti mitochondrií). Jedná se o kationtová barviva, která jsou mitochondriemi zachytávána díky jejich náboji. U těchto barviv záleží na mitochondriálním membránovém potenciálu. Jsou dostupné různé vlnové délky, které se dají použít nejen pro značení mitochondrií (současné značení několika buněčných orgánů pomocí různých trackerů). Co se týče času potřebného k obarvení jsou rychlejší než CellLight barviva (k obarvení dojde do hodiny), ale je u nich třeba dávat větší pozor na koncentraci. Protože příliš vysoká koncentrace vede k zpomalení buněčného cyklu, případně k usmrcení buněk. [10]

Barviva CellLight (CellLight Mitochondria – RFP/GDP, BACMAM) barví mitochondrie nezávisle na funkčnosti, takže jsou využívány, pokud nám jde o označení všech mitochondrií v buňce. K obarvení dochází nezávisle na membránovém potenciálu. Po obarvení mohou být mitochondrie zobrazeny v živých nebo fixovaných buňkách. Proteiny CellLight se využívají nejen k barvení mitochondrií, ale i k označení tubulárního systému, lysozomů a dalších organel. Fungují na základě hmyzího baculoviru, do kterého je vložen savčí promoter. Jsou jednoduše použitelné a dobře se vážou, ale k obarvení je třeba počkat 24 hodin. [10]

Barvení za pomoci protilátek se používá především u fixovaných buněk. Protilátka se naváže na specifický antigen přítomný u mitochondrií a obarví ji (nezávisle na aktivitě). Protilátky jsou namířeny proti mitochondriálním proteinům. K označení mitochondrií u člověka, skotu nebo potkanů se používá například antikomplex v (myší d-podjednotka monoklonární protilátky). Komplex v (jinak také ATP syntáza) je zodpovědný za tvorbu ATP v oxidační fosforylaci a je vázán především na

vnitřní membráně mitochondrií.



Obr. 3.1: Zobrazení HeLa buněk s využitím barviva CellLight (zelené mitochondrie)[10]

Barviva jsou dost často nějakým způsobem toxická pro buňku, takže je třeba dávat pozor, aby nedošlo k otravě buněk, které by vedlo ke smrti. K tomuto dochází při příliš vysoké koncentraci barvicího roztoku, nebo moc dlouhé době kultivace buněk s barvivem. Zobrazování živých buněk je poměrně pracné a časově náročné, takže hodně záleží na tom, aby byly buňky pokud možno zdravé a barviva, která použijeme, je příliš nezatěžovala.

3.2 Úprava preparátu po barvení

Po obarvení buněk barvivem (klidně i sadou barviv) je třeba pokud možno zajistit, aby nedocházelo k vymývání barviva z buněk. A tím také nedocházelo ke ztrátě informace (značení) a krom jiného zatěžování pozadí, které by pro nás znamenalo nepřehledné obrázky (s nízkým kontrastem). Dojde-li totiž k unikání barviva ven z buněk je pozadí (proti kterému pozorujeme buňky) zatíženo fluorescencí a znesnadňuje nám další práci.

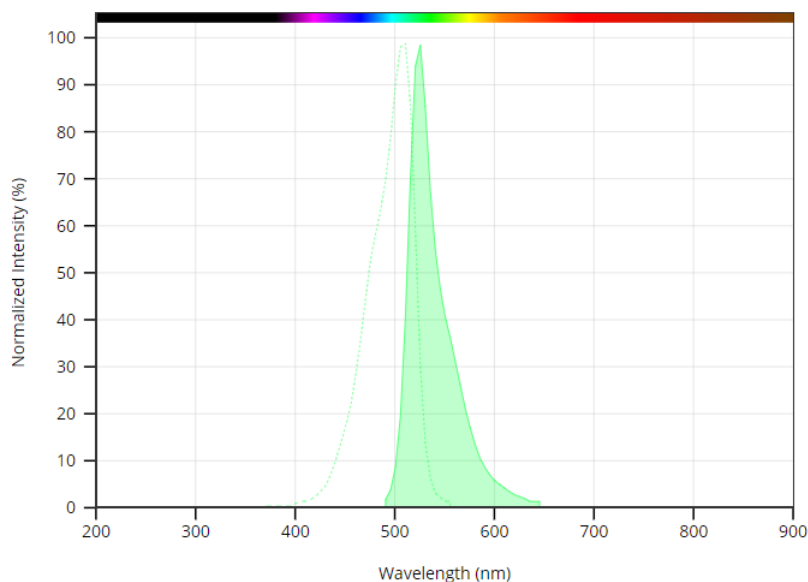
Způsobů, kterými se tomuto jevu dá zabránit je několik. Jednak lze použít povrchově aktivní alkoholy: Pluronic F-127 nebo PowerLoad, které zvyšují návaznost barviv. Nebo se dají blokovat buněčné kanály (efflux pumpy) pomocí inhibitorů a tím dojde k zadržení barviva v buňce, ale to může na druhou stranu způsobit smrt buňky [5]. Další možností je přidání látek, které zamezují rozpad fluorescenčního barviva v důsledku působení vysoké intenzity světla jako je například ProLong Live Reagent.

Problémy nám, ale nemusí dělat jen unikající barvivo. Pozadí může být zatíženo i jinými způsoby. Například rozptyl světla na buňkách preparátu – špatné zaostření, autofluorescence preparátu nebo média ve kterém jsou buňky pozorovány, případně samotná detekce může vyvolávat šum na pozadí. [10]

3.3 Měření mitochondriální aktivity

Některá barviva nám umožňují sledovat potenciál mitochondriální membrány (v reálném čase). U zdravých buněk s normálně fungujícími aktivními mitochondriemi je barvivo rychle zachytáváno mitochondrií a v závislosti na potenciálu membrány mění barvu fluorescence (například od oranžové do červené). Příkladem takového barviva je například Rhodamin-123.

Dalším takovým barvivem je JC-10, což je barvivo, které bylo navrženo pro detekci mitochondrií ve zdravých a apoptických buňkách. Jedná se o barvivo na kationovém základě, které se ve zdravých a normálně fungujících buňkách shlukuje v mitochondriích a vytváří agregáty, které se vyznačují červenou fluorescenční odezvou. V nekrotických (apoptických) buňkách ve své monomerní formě vyzařuje zeleně. Od hojně používaného barviva JC-1 se liší vlastně jen lepší rozpustností ve vodě. [14]



Obr. 3.2: Spektrum barviva JC-10 [33]

Celková fluorescence barviv akumulovaných v mitochondriích je určena množstvím faktorů. Za prvé jsou tyto přípravky dost často hydrofobní látky, takže může

docházet k nescifickému navázání na fosfolipidové membrány – především na mitochondriální membrány. Výhodu mají méně hydrofobní přípravky, u kterých by měl být výskyt takovýchto artefaktů nižší.

Za druhé fluorescence daného barviva v mitochondrii může být ovlivněna potenciálem buněčné membrány a pH mitochondrií.

Za třetí může docházet k aktivnímu čerpání barviva (absorbce a distribuce v rámci buněk), což je způsobeno aktivitou pump. Jejich aktivita se inhibuje pomocí verapamilu nebo progesteronu, ale tyto látky jsou buď příliš toxické nebo vedou k nepříznivému ovlivnění funkce buněk. Kvůli tomuto jevu těžké objektivně posoudit membránový potenciál.

Za čtvrté je třeba uvážit možnost, že se barvivo uvnitř mitochondrie změní a tím pádem dojde ke změně fluorescence. K tomuto jevu dochází například u lipofilních kationtových derivátů rhodaminu. Tyto barviva se často vyskytují ve formě esterů a vlivem intermitochondriálních esteráz dochází k jejich přeměně. Příkladem je přeměna Rhodaminu 123 (který proniká membránou) na Rhodamin 110 (pro který je mitochondriální membrána méně propustná). Fluorescenční vlastnosti obou látek jsou podobné, díky čemuž dojde ke zvýšení fluorescence mitochondrií. Protože Rhodamin 110 k fluorescenci přispívá nezávisle na $\Delta\Psi_m$ zatímco Rhodamin 123 se na mitochondrie váže v závislosti na membránovém potenciálu. [21]

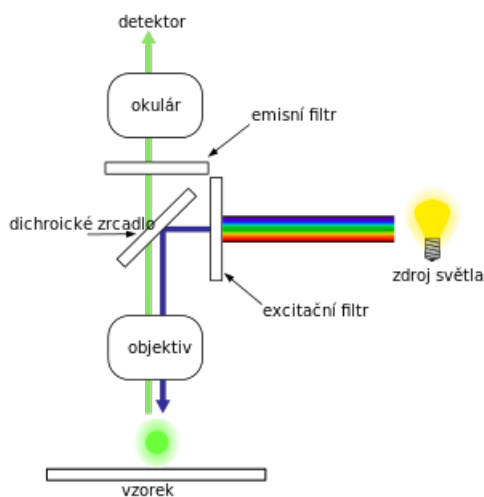
4 Fluorescenční mikroskopie

Optické zobrazení mitochondrií v živých buňkách funguje na základě detekce (sekundární) fluorescence (barviva, kterým byly mitochondrie označeny). Což je schopnost látky vyzářit energii po dodání energie. Ve svém principu funguje na základě pohlcení dopadajícího záření (fotonů nebo elektronů) atomem a tím způsobené excitaci elektronů do vyšších (od jádra vzdálenějších) orbitalů. Vyšší energetický stav atomu je nestabilní, takže dochází k návratu do původního stavu, přičemž je vyzářena energie (foton nebo elektron s nižší energií, než byla původní).

Tímto způsobem označené buňky se dají sledovat pomocí fluorescenčního nebo konfokálního mikroskopu.

4.1 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop je druhem optického mikroskopu, který funguje na principu detekce fluorescence barviva. Excitace je způsobena ozářením preparátu světlem o určité vlnové délce, které je přímo určená pro excitaci barviva. Zdrojem tohoto záření je většinou vysokotlaká rtuťová výbojka. Výsledkem je emise záření o vyšší vlnové délce, které se šíří všemi směry. Aby nedocházelo k nežádoucím jevům na pozadí jsou zde zařazeny filtry. Jeden pro excitující paprsek a jeden pro emisní. Průchod excitačního paprsku jen jedním směrem (k preparátu) je zajištěn dichroickým zrcadlem, které excitační paprsek lomí a emisní nechá volně projít (k detektoru).



Obr. 4.1: Schéma fluorescenčního mikroskopu [31]

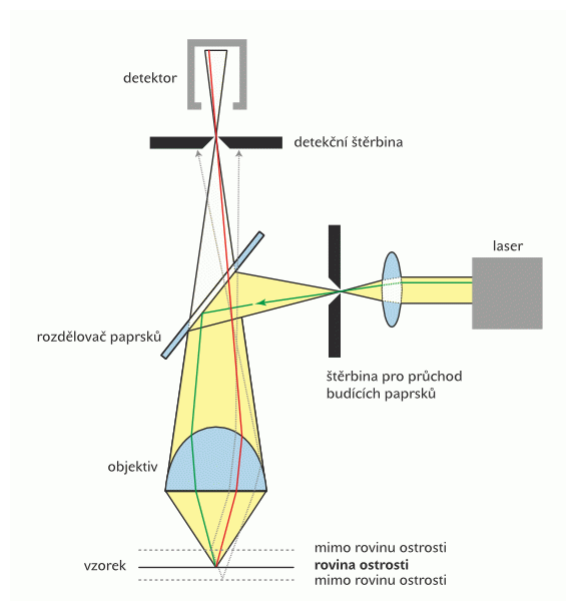
Nevýhodou této metody je to, že je preparát pozorován najednou a je ovlivňován tloušťkou preparátu (paprsky vycházejí ze všech vrstev a dochází k jejich sumaci),

takže má nízké rozlišení. Díky tomu se tímto způsobem nedají dobře pozorovat jednotlivé orgány (značené různými barvivy). [7]

4.2 Konfokální mikroskop

Pro lepší zobrazení s vyšším rozlišením se využívá konfokální mikroskopie, která funguje na jemně pozměněném principu. Zdrojem světla je zde laserový paprsek, který prochází přes clonu, objektiv a osvětluje preparát. Emitované světlo prochází přes objektiv a je lomeno dichronickým zrcadlem k další cloně, která zajišťuje odfiltrování nadbytečného světla z jiných rovin, než je ta námi zaostřená, a nakonec k detektoru. Při každém kroku dostáváme informaci pouze z jednoho bodu preparátu, takže pro získání celkového obrazu musíme provést sérii kroků. V každém dalším kroku dojde k posunu dopadu laseru, většinou pomocí clony.

Informace z detektoru zpracovává počítač a skládá jednotlivé body do celkového obrazu. Pokud barvíme více organel najednou je třeba každou snímat zvlášť (především proto že jsou barveny odlišnými barvivy, která pro svou excitaci potřebují speciální vlnovou délku) a výsledný obraz získat jejich složením. Detektory konfokálních mikroskopů jsou navíc černobílé a výsledný obraz je dobarvován počítačově. [6]



Obr. 4.2: Schéma konfokálního mikroskopu [32]

Hlavní výhodou konfokálního mikroskopu představuje možnost nasnímat několik rovin (postupně zaostřovat čím dál hlouběji) a z nich pak sestavit 3D obraz, který

dává lepší představu o prostorovém uspořádání mitochondrií v rámci buňky a jejich vztahu vzhledem k dalším organelám. [8]

Navíc je u něj dobré rozlišení (buněk oproti pozadí), protože je většina paprsků, které by nepříznivě ovlivnily detekci, vycytáno clonou ještě před dopadem na detektor, což vlastně usnadňuje přípravu preparátu (odpadá nutnost zajistit nekontaminované pozadí). To že výsledný obraz zpracovává počítač ho navíc umožňuje dále upravovat (například dekonvolucí a jinými způsoby zpracování obrazů).

Nicméně takovéto skenování preparátu je poměrně časově náročné a pokud je žádoucí vysoké rozlišení může docházet ke zkreslení z důvodu pohybu živých buněk (to při snímání fixovaných preparátů odpadá). Takže je třeba zvolit správný poměr mezi rozlišením a rychlostí snímání.

5 Kultivace buněk in vitro

Kultivace buněk in vitro (z latinského ve skle) spočívá v kultivaci prokaryotických nebo eukaryotických buněk mimo tělo – v umělých podmínkách. Pro úspěšnou kultivaci je nutné zajistit vhodné podmínky. Buňky jsou pěstovány v živném roztoku, který má svými vlastnostmi pokud možno co nejvíce připomínat původní prostředí buněk. Při kultivaci se hlídá množství faktorů (které mohou mít vliv na zdraví buněk) jako jsou například pH prostředí, množství solí v roztoku, teplota prostředí a samozřejmě koncentrace živin.

Kultivovat lze nejen buňky měkkých tkání, ale i leukoplasty nebo třeba buňky plodové vody. Při dlouhodobé in vitro kultivaci však musíme počítat s tím, že se buňky někdy liší od buněk původních (v důsledku jiného prostředí). Nehledě na to, že při takovéto kultivaci skoro všechny typy buněk stárnou a ztrácejí schopnost se dále dělit.

5.1 Základní pojmy

Rozlišujeme tkáňové a buněčné kultury. Tkáňové kultury jsou tvořeny buňkami, které se mohou navzájem ovlivňovat (tak jak tomu bylo v původní tkáni). Zatímco buněčné kultury jsou tvořeny izolovanými buňkami. V závislosti na životnosti (dalo by se říct) odlišujeme:

- primokultury, což jsou kultury buněk čerstvě získaných z organismu, které mají pouze krátkou životnost (v rádech dní) načež je třeba provést pasážování (přenesení buněk do nového média)
- buněčné kmeny – kultura diploidních buněk (těch které se i v in vitro podmínkách začaly dělit) s životností cca 50 dělení (k odumření dojde v důsledku zkracování telomer), které byly už alespoň jednou pasážovány
- buněčné linie, což jsou buňky nádorového charakteru, které nestárnou a dobře se dělí. Tento typ vzniká z buněčných kmenů transformací, případně mohou být odebrány z organismu (nádorové buňky u kterých dochází ke poruše regulace buněčného dělení – např. HeLa).

Dále se buněčné kultury liší v závislosti na způsobu kultivace, některé buňky rostou na povrchu kultivačních nádob – v tom případě mluvíme o adherovaných kulturách (to je způsobeno sekrecí určitých látek – luminin, fibronectin, kolagen). A některé kultivujeme ve formě suspenze (buňky jsou volně dispergované v médiu – např. leukocyty).

Adherentní buňky vyžadují pro svou kultivaci vhodný povrch, který může být potažen právě lumininem nebo kolagenem, aby se zvýšily adhezní vlastnosti. Většina buněk odvozených z pevných tkání je adherentní. Adherentní je i tzv. organotypová

kultura (tkáňová), která spočívá v pěstování buněk v trojrozměrném prostředí (3D) na rozdíl od dvourozměrných kultivačních misek. [11]

5.2 Buněčné linie

Nejznámější buněčnou linií je pravděpodobně linie HeLa (suspenzní linie). Jedná se o lidské epitelové buňky, které byly roku 1951 izolovány z maligního karcinomu děložního čípku paní Henriettě Lacksonové (zkratka z prvních dvou písmen jména a přímení). Jedná se o nesmrtelnou buněčnou linii, která se neustále dělí a je hojně využívána v laboratořích po celém světě. Karyotyp HeLa buněk se liší od normálních somatických buněk, protože má 55 chromozomů (má navíc chromozomy 6, 8, 17 a dva 12). Neustále množení těchto buněk umožňuje enzym telomeráza, který před každou replikací prodlužuje telomerické sekvence DNA a tím kompenzuje jejich zkracování při replikaci (odpadá problém, který se projevuje u buněčných kmenů).

Dalšími příklady používaných buněčných kultur jsou například: Vero (kočkodan – epitelové), DU145 (člověk – rakovina prostaty), MCF-7 (člověk – rakovina prsu), MDCK (pes – epitel), KBM-7 (člověk – leukemie)

Pokus k semestrální práci byl prováděn na buněčné kultuře SAOS-2. Což je buněčná kultura rakovinných buněk (osteosarkom). Zdrojem této buněčné kultury byla jedenáctiletá žena. Buněčná linie SAOS-2 má většinou kolem 56 chromozomů (rakovina), je adherentní a byla například použita ke studiu cyklinu D1 pro aktivitu LCAHA nebo pro studium vlivu DLC (uhlíkové vrstvy) na adhezi buněk. Běžně se používá jako model pro výzkum rakoviny kostí (testování nových terapií). Kromě celosvětové dostupnosti je jejich největší výhodou to, že je dobře zdokumentována a umožňuje nám získat poměrně velké množství buněk v krátkém čase. [11, 9]

V rámci bakalářské práce byly použity buňky PC-3. Což je buněčná kultura buněk rakoviny prostaty, která byla roku 1979 odebrána z kostních metastáz dvaadesátiletého muže. Tyto buňky nereagují na androgeny, glukokortikoidy nebo růstové faktory. Používají se k výzkumu rakoviny prostaty a vývoji léků, jsou užitečné při zkoumání biochemických změn v pokročilém stádiu rakoviny prostaty. Jedná se o adherentní buněčnou linii. [20]

5.3 Postup kultivace

Buňky se kultivují ve skleněných nebo plastových lahvích (miskách). Zde byly také použity speciální konfokální misky, které mají uprostřed tenčí sklo. To usnadňuje použití konfokálního mikroskopu (miska s preparátem se vkládá přímo do mikroskopu a preparát se nemusí dále upravovat).

Kultivační médium poskytuje buňkám optimální prostředí a slouží jako zdroj živin pro jejich růst. Takováto média obsahují předem určený poměr solí, glukózy, vitamínů, aminokyselin a dalších látek, které jsou pro buňky nezbytné – například růstové faktory, které jsou často odvozené ze séra zvířecí krve (FBS – fetální bovinní sérum, které bylo použito v našem případě; používají se i koňská nebo prasečí séra). Navíc se do nich přidávají antibiotika, aby se předcházelo kontaminaci vzorku bakteriemi.

Médium je potřeba pravidelně měnit, aby nedocházelo k vyčerpání živin (popřípadě přílišnému zahlcení metabolity). U suspenzních buněk je potřeba nejprve oddělit buňky od média odstředěním, zatímco u adherentních kultur stačí medium pouze odsát. [11]

Při kultivaci je nezbytné udržovat konstantní pH – doporučuje se 7,4 – pokles zastaví růst, případně buňky usmrtí. Proto se do média přidává fenolová červen, jako indikátor pH. Při správné hladině je medium červené, při poklesu pH (což může být způsobeno spotřebováním živin → příliš vysokou hladinou metabolitů) se barva mění do žluta a signalizuje nám, že je potřeba medium vyměnit. Dále je potřeba zajistit konstantní teplotu (37 °C), která buňkám stimuluje jejich původní prostředí. A při dlouhodobější kultivaci i 5% CO_2 .

V průběhu kultivace je nutné zajistit sterilitu prostředí a dodržovat pravidla při manipulaci s buňkami (výměna média). Buňky rostou podle tzv. křivky růstu, většinou až do doby, než dosáhnou konfluence (buňky zaplní povrch nádoby a vzájemně se dotýkají) kdy dojde ke kontaktní inhibici. Tehdy je nutné přenést (pasažovat) část buněk do nové kultivační nádoby (kde mohou dále pokračovat v růstu). U adherentních buněk se pasažování provádí za pomoci proteázy (trypsin), která způsobí uvolnění buněk od dna kultivační misky.

5.4 Používané roztoky

PBS (fosfátový pufr) je jedním z nejpoužívanějších pufrů. Jedná se o solný roztok používaný pro manipulaci a kultivaci savčích buněk. Používá se k udržování vhodného pH a zabraňuje osmotickému šoku. Obsahuje poměr NaCl, KCl a dalších solí rozpuštěných ve vodě. Je vhodný k oplachu buněk. [24]

HBSS (Hank's balanced salt solution) slouží převážně k udržení správného pH a osmotické rovnováhy. Dále buňkám poskytuje vodu a základní anorganické ionty. Obsahuje glukózu a hydrogenuhličitan sodný, které jsou vhodné pro krátkodobé kultivace buněk mimo kultivační médium. Používá se k minimalizaci buněčné agregace. [24]

HEPES (pufrovací činidlo kyseliny sulfonové) se používá ke kultivaci buněk hlavně kvůli jeho schopnosti vyrovnávat pH i při změnách koncentrace oxidu uhličitého (vznikajícího vlivem aerobního dýchání). Je také známý tím, že vlivem okol-

ního světla produkuje peroxid vodíku, což ale není problém v pufrech založených na hydrogenuhličitanech. Nicméně je doporučeno skladovat ho (a roztoky které ho obsahují) ve tmě, aby se zabránilo oxidaci.[23]

HHBS (Hank's buffer with Hepes) je pufr, který kombinuje stabilitu HBSS s dobrou pufrovací schopností HEPES. Používá se pro buněčné kultury a je díky obsahu HEPES citlivý na světlo. Je vhodný k mytí buněk, transportu buněk nebo vzorků tkání a pro přípravu reagensů (například barviv). Na jeden ml pufru je třeba 980 μ l HBSS a 20 μ l HEPES. [22]

6 Praktická část

V bakalářské práci jsem se zaměřila na měření a hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu jako znaku funkčnosti mitochondrií. Pro experimenty byly použity buňky PC-3, které byly kultivovány při různých hodnotách glukózy 24 a 48 hodin.

6.1 Příprava buněk

Bylo provedeno jednoduché pasážování buněk do konfokálních misek. Z kultivační lahvičky bylo odebráno kultivační médium a buňky byly opláchnuty 2 ml sterilního PBS pufru. Následně k nim byl přidán 1 ml nahřátého trypsinu (37 °C) a buňky byly vloženy na dvě minuty do inkubátoru. Poté byly jemně mechanicky sklepany ze dna kultivační lahvičky a zkontrolovány pod mikroskopem – zakulacené buňky plovoucí v médiu. Dále byly buňky resuspendovány opakovaným nasáváním do pipety, což mělo za následek rozbití případných shluků buněk. Takto promíchaná buněčná suspenze byla ve zkumavce vložena do centrifugy (800 rpm na 5 minut). Ze zkumavky se sedimentovanými buňkami byl odsát supernatant a následně k nim bylo přidáno 800 μ l média. Po resuspendování byly buňky nasazeny do konfokálních misek (45 μ l do 2 ml média). Tyto buňky budou dále označovány jako kultivace 17.

V rámci pasážování bylo spočítáno množství buněk ($B = 3156250$) na 1 ml pomocí Bürkerovy komůrky. Výsledné množství bylo pomocí známé velikosti konfokálních misek ($d=35$ mm) převedeno na množství buněk v konfokální misce – odhadem 136649.

Druhý den bylo buňkám vyměněno médium. K obvykle používanému médiu pro tento druh buněk (Biosera Ham's F12) byla přidána glukóza a roztok byl následně důkladně promíchán ve vortexu. Část buněk byla kultivována v médiu s normální koncentrací (1802 mg/l) část se střední koncentrací (2200 mg/l) a část s vysokou (4000 mg/l). Byly použity buňky z minulého dne (kultivace 17) a buňky nasazené před týdnem (kultivace 16).

6.2 Barvení

Buňky byly barveny pomocí barviva JC-10. Dle návodu bylo 3,4 μ l barviva rozpuštěno v 1 ml HHBS, který vznikl smícháním 980 μ l HBSS s 20 μ l HEPES a 1 μ l Pluronic F-127. Následně byla směs důkladně promíchána pomocí vortexu. Z kultivovaných buněk bylo odsáto kultivační médium a buňky byly opláchnuty PBS. Následně bylo do každé kultivační misky přidáno 100 μ l barvicího roztoku. Poté byly buňky vráceny zpět do inkubátoru a kultivovaly se s barvivem po dobu 30

minut. Potom bylo barvivo odčerpáno a k buňkám byl přidán HHBS. Takto na-barvené buňky byly postupně skenovány. Buňky, které zatím nepřišly na řadu byly uchovávány v inkubátoru. Oskenované buňky byly vyhozeny. Vše bylo prováděno ve sterilním prostředí.

Většina látek byla skladována v nižších teplotách – například barvivo JC-10 bylo uchováváno v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ – proto bylo nutné vše (krom barviva, které bylo zahřáno přidáním ohřátého HHBS) před použitím ohřát v lázniče na teplotu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, která je vhodná pro buňky.

Před skenováním bylo nutné konfokální misku zespoda důkladně očistit a utřít do sucha. Ke skenování byl použit imerzní objektiv, takže bylo nutné na něj kápnout imerzní olej před každým nasazením nové misky.

6.3 Nastavení měření

Po upevnění misky do mikroskopu, byl konfokální mikroskop přepnut na optický režim, pomocí kterého byl preparát zaostřen. Následně bylo provedeno nastavení konfokálního mikroskopu. Excitace laserem byla nastavena na 490 nm podle protokolu k barvivu. Detekce emise byla nastavena na dvě pásma. Jedno pro monomerní formu barviva (pro neaktivní mitochondrie) – 500 nm až 540 nm (hlavní detekce podle protokolu na 520 nm). A druhé pro J agregáty (pro mitochondrie aktivní) – 560 nm až 610 nm. Intenzita laseru byla nastavena na 4% u obou kanálů – nastavení bylo provedeno dodatečně dle expozice, aby výsledné obrazy nebyly přesvícené.

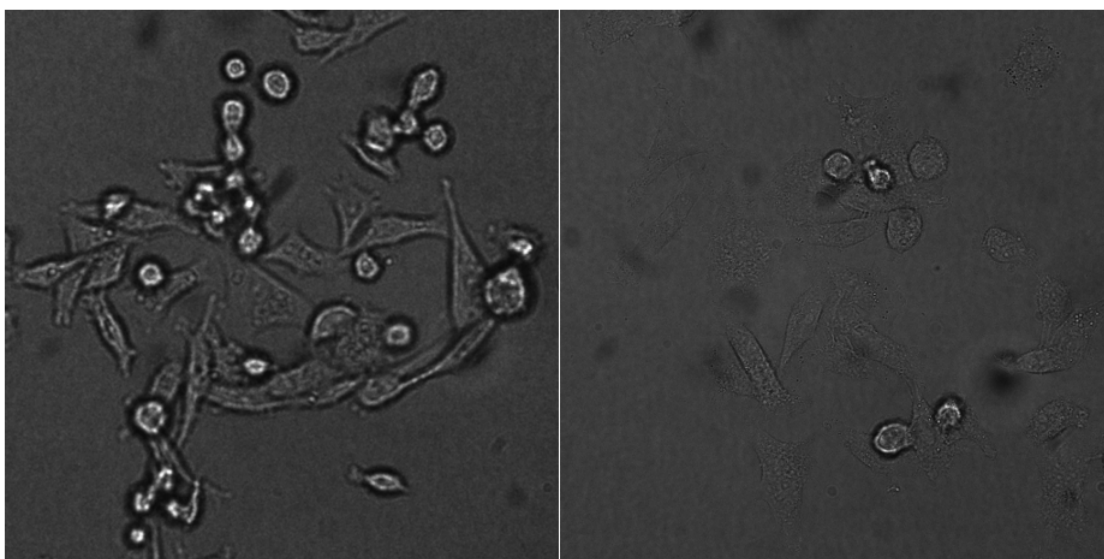
K dohledávání vhodných obrazů bylo použito nízké rozlišení – 520x520 a rychlejší skenování (400). Toto nastavení bylo použito v režimu live, které umožňuje s preparátem pohybovat a zároveň sledovat fluorescenci v jednom kanálu. Následně se dalo využít zoomu, který umožňoval buňky vhodně oříznout a přiblížit.

Po vyhledání vhodného obrazu byl režim live zastaven a bylo nastaveno vyšší rozlišení 1024x1024 při pomalejším skenování (100). V tomto nastavení byla naskenována sekvence obrazů – z obou kanálů + optické zobrazení buněk. Sekvence bylo třeba ukládat a vhodně pojmenovat, aby nedošlo k záměně.

Při každé výměně vzorku bylo nutné nejprve zkontrolovat, jestli je laser vypnutý – zda došlo skenování sekvence, popřípadě jestli není zapnutý režim live. Poté se odklopila věž a vzorek byl vyjmut. Před upevněním nového vzorku bylo třeba přidat olej na objektiv a misku řádně očistit.

6.4 Hodnocení výsledků

Jak již bylo řečeno buňky byly kultivovány při různých koncentracích glukózy po dobu jednoho či dvou dnů, obarveny a následně zobrazeny pomocí konfokálního mikroskopu. Práce s ním byla docela složitá především z toho důvodu, že je obtížné zaostřit na buňky tak, aby byla vidět fluorescence. Pro příklad je přiložen obrázek porovnání zobrazení v optickém kanálu. Obrázek vlevo zobrazuje dobře zaostřené buňky u kterých ale není v ostatních (fluorescenčních) kanálech viditelná fluorescence. Zatímco obrázek napravo zobrazuje buňky zaostřené na fluorescenci (jedná se o ty skoro neviditelné adherované buňky na pozadí).



Obr. 6.1: Zobrazení buněk v optickém kanálu

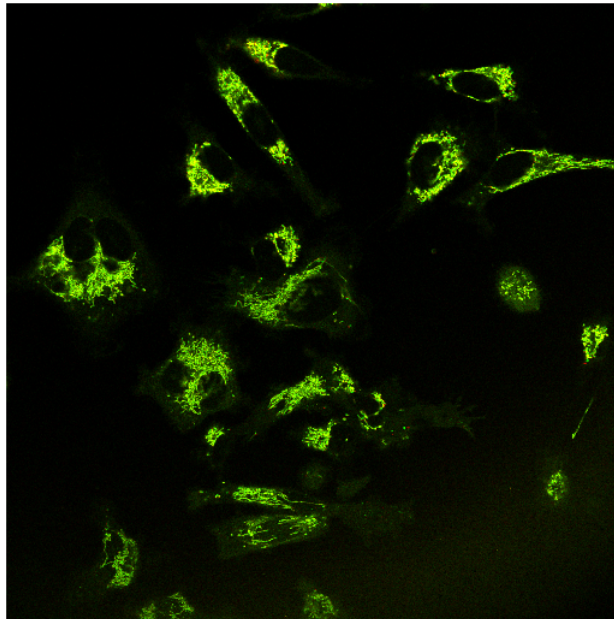
Toto jemné doladování v ose z představovalo hlavně ze začátku problém, protože se buňky vyskytovaly, v závislosti na tom zda byly adherované nebo plavaly v médiu, v různé hloubce. Zaostřování se pohybovalo na ose z zhruba od 45 μm do -230 μm - takže v poměrně širokém pásmu.

Obecně se v preparátech vyskytovaly dva typy buněk:

- Adherované buňky byly podélné s dlouhými výběžky a vyskytovaly se často ve shlucích. Takové buňky byly převážně v kontrolních vzorcích a ve vzorcích, které se kultivovaly déle (dříve pasážované - kultivace 16), protože měly čas lépe přilnout k misce.
- Volné buňky měly kulatý tvar a volně plavaly v médiu. Tyto buňky se buď ještě nestihly přichytit k misce, nebo u nich probíhala apoptóza.

Na obrázku 6.2 je příklad zobrazení fluorescence v obou kanálech zároveň. Jsou na něm jasně viditelné mitochondrie (žlutozelené tyčinky) v adherentních buňkách.

Tmavé mezery kulatého tvaru představují jádra buněk kolem kterých je množství mitochondrií vyšší. V pravém dolním rohu je jemně patrný fluorescenční stín, který byl většinou následkem špatného zaostření v ose z. Barva je výsledkem počítačového zpracování – u každého kanálu konfokálního mikroskopu byla nastavena jiná barva. Zelená symbolizuje neaktivní mitochondrie zatímco červená mitochondrie aktivní. Na tomto konkrétním obrázku převládají neaktivní mitochondrie proto se výsledný obraz zdá zelený.

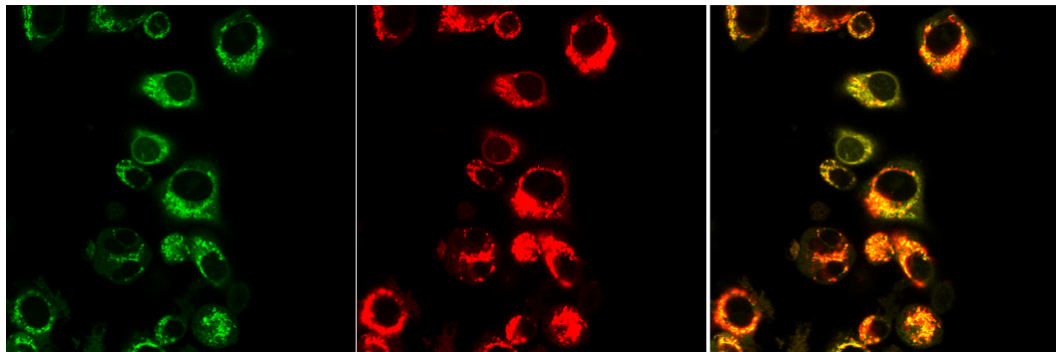


Obr. 6.2: Příklad zobrazení mitochondrií

Software konfokálního mikroskopu ukládal snímky ze všech kánálů ve formátu tiff což je formát určený pro ukládání rastrové grafiky a je výhodný především díky možnosti bezztrátové komprese a vyššímu stupni barevné hloubky. Tyto soubory byly naimportovány do interaktivního prostředí MATLAB. Které je vhodné nejen pro výpočty a vývoj různých algoritmů, ale i pro zobrazování a analýzu obrazových dat. Snímky se načetly jako tři matice velikosti 1024x1024 (dáno nastavením rozlišení). Každá matice pro jednu barvu dle systému RGB (jednotlivé hodnoty představují hodnoty pixelů). Obraz z červeného pásma fluorescence obsahuje informace jen v první matici, zatímco obraz ze zeleného kanálu má hodnoty jen ve druhé matici (zbylé matice obsahují nuly). Pro sloučení obou fluorescenčních pásem stačilo uložit první matici červeného pásma do první matice pásma zeleného (nahradit prázdnou matici). Tímto způsobem byl vytvořen například obraz 6.2 .

Na obrázku 6.3 lze vidět oba barevné kanály (vlevo a uprostřed) a výsledný složený obraz (vpravo). Na prostředním obrázku pro červený kanál fluorescence (aktivní

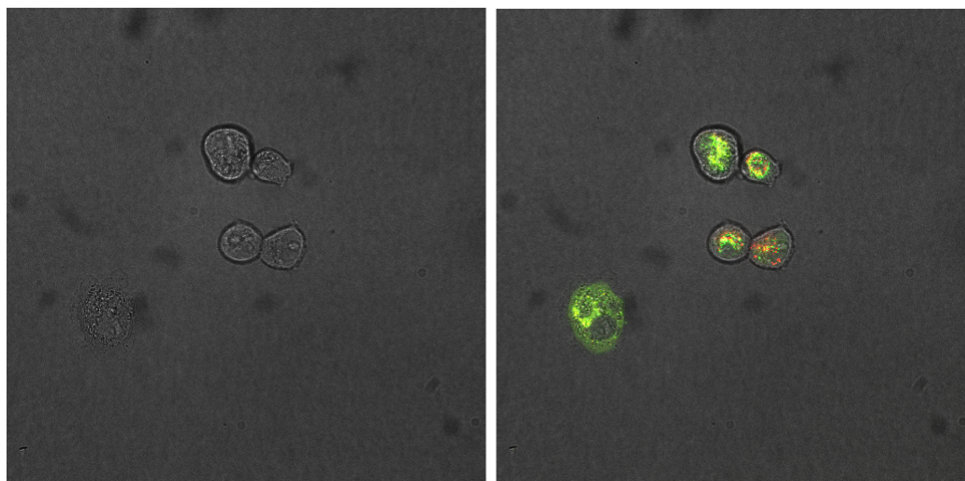
mitochondrie) jsou patrné známky přesvětlení (intenzita laseru měla být nižší) jedná se hlavně o buňku ve středu obrazu kde vyzařování mitochondrií dosáhlo maxima (hodnota 255) a výsledný obraz pak vypadá jako červená skvrna.



Obr. 6.3: Výsledek sloučení fluorescenčních kanálů

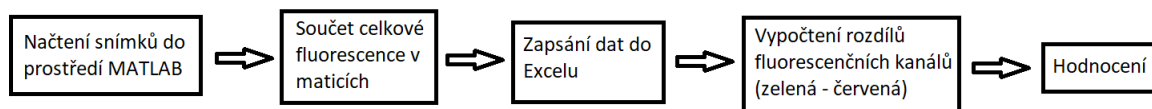
Na složeném obrázku vpravo jsou pak dobře viditelné neaktivní oblasti některých buněk ve kterých převládá zelená barva. Tyto konkrétní buňky jsou z kultivace při střední koncentraci glukózy (2200 mg/l) a jedná se o dříve pasážované buňky (kultivace 16).

Obrázek 6.4 je přiložen pro ukázkou sloučení všech tří kanálů. Vlevo je původní obraz z optického kanálu. Vpravo jsou k němu přidány oba fluorescenční kanály. Zajímavá je buňka v levém dolním rohu, která je na obrázku z optického kanálu sotva viditelná. Zde se jedná opět o buňky se střední koncentrací glukózy, ale tentokrát s kratší dobou kultivace (kultivace 17).



Obr. 6.4: Buňky s fluorescenčním značením

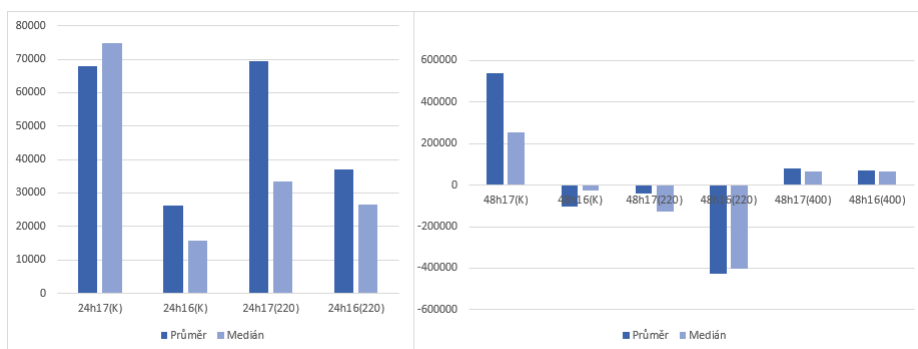
Při hodnocení buněk pod optickým mikroskopem (ještě před barvením) si šlo všimnout výrazného nárůstu buněk u kontrolního vzorku (kultivace 17) oproti předchozímu dni. Také se zvýšil počet adherovaných buněk. Kontrolní vzorek buněk s delší kultivací (kultivace 16) vykazoval kontaktní inhibici. Buňky rostly ve shlucích a dále se nemnožily.



Obr. 6.5: Blokové schéma zpracování

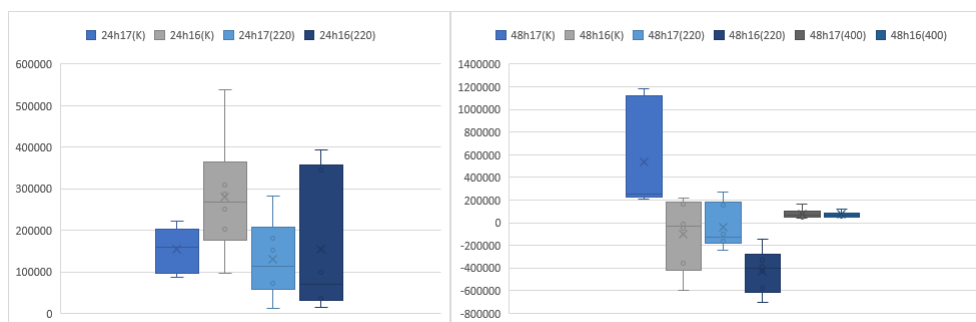
Dalším krokem bylo zhodnocení mitochondriální aktivity u jednotlivých vzorků. To probíhalo v prostředí MATLAB jednoduchým sečtením v jednotlivých fluorescenčních kanálech (byly sečteny hodnoty pixelů v matici pro danou barvu, hodnoty se pohybovaly od 0 do 255 což bylo dáno 8bitovou barevnou hloubkou). Výsledky byly zaznamenány do tabulek v Microsoft Excel. Stejně bylo zaznamenáno množství buněk v daném vzorku (obrázku). Ze součtů byl vypočten rozdíl - součet v červeném kanálu byl odečten od sumy v zeleném kanálu.

Na obrázku 6.6 jsou grafy znázorňující průměr a medián rozdílů ve fluorescenčních kanálech. Na levém grafu je vidět jemné zvýšení aktivity u vzorku se střední koncentrací (kultivace 17) oproti kontrole. Zato u kultivace 16 došlo oproti kontrole k snížení aktivity. Na pravém grafu je viditelný nárůst aktivity u obou vzorků se střední koncentrací glukózy. Ale také je zde viditelný rozdíl mezi oběma kontrolními vzorky, který je pravděpodobně způsoben právě přesevětlením vzorku.



Obr. 6.6: Průměry a mediány rozdílů

Krabicové grafy na obrázku 6.7 zobrazují rozptyl v datech. Rozsahy v rozdílech byly poměrně variabilní v důsledku různého množství buněk, které se v jednotlivých vzorcích (tiff souborech) nacházelo. Fluorescence se také odvíjela od způsobu zaostření v ose z - lépe zaostřené vzorky prokazovaly vyšší stupeň fluorescence. Kvůli velkému rozptylu v datech měl u grafů 6.6 větší význam medián.



Obr. 6.7: Rozsahy rozdílů

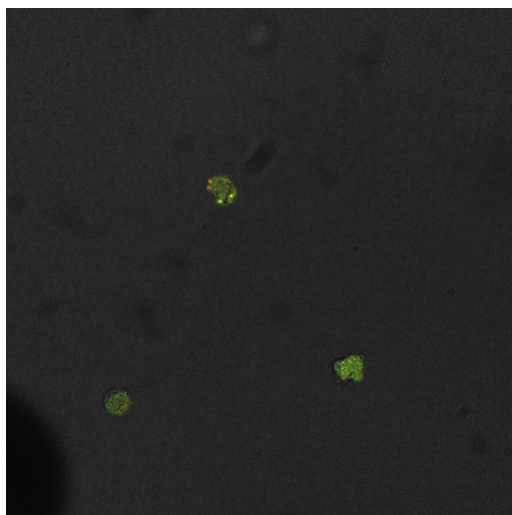
Na základě zpracovaných dat a s přihlédnutím ke grafům byly zhodnoceny výsledky experimentu.

U kultivací po dobu 24h vyšla většina mitochondrií jako neaktivní. Vzorek s kratší dobou kultivace (kultivace 17) projevoval jemné zvýšení mitochondriální aktivity u střední koncentrace glukózy (v grafu 6.6 lze pozorovat pokles). Vzorky s vysokou koncentrací glukózy byly špatně zaostřeny v ose z, takže nebyly hodnoceny - neobsahovaly skoro žádnou fluorescence. Ale při pohledu v optickém kanálu se buňky zdály apoptické.

Vzorky s delší 48h kultivací to pak potvrdily. Vysoká koncentrace glukózy (4000 mg/l) způsobila apoptózu u převážné většiny buněk. Buňky byly kulaté bez viditelného jádra a mitochondriální aktivita chyběla (nebo byla minimální). To bylo zřejmé i na získaných datech - počet neaktivních mitochondrií převládal.

Na obrázku 6.8 jsou vidět právě takové buňky. Mitochondriální aktivitu projevuje jen buňka nahoře. Šedý stín v levém dolním rohu je pravděpodobně bublina. Dále je zde jemně patrná další buňka v jiné hloubce preparátu u které tudíž nelze pozorovat fluorescence (kulatý útvar nahoře uprostřed).

Důležitým zjištěním bylo zvýšení mitochondriální aktivity u obou kultivací (16 i 17) se střední glukózou. Toto zvýšení je patrné právě i na obrázku 6.3 kde lze ve sloučeném obrázku pozorovat převládající červenou barvu. Důsledkem tohoto zvýšení bylo přesvícení. Což vedlo k znehodnocení výsledků - fluorescence dosáhla maxima a nedala se správně hodnotit. Nicméně, protože bylo nastavení po celou



Obr. 6.8: Příklad apoptických buněk (48h, vysoká glukóza, delší kultivace)

dobu měření stejné, tyto výsledky stále ukazují na zvýšení mitochondriální aktivity. Dokonce i u kultivace 16 kde lze na grafu 6.6 pozorovat nárůst mediánu (do záporných čísel z důvodu odečítání červeného fluorescenčního kanálu od zeleného).

Toto zjištění odpovídá původní myšlence experimentu. Ten vycházel ze článku, který je zmíněn již v kapitole 2.4 kde je řečeno, že tato koncentrace glukózy (2200 mg/l) při kultivaci po dobu 48h vede ke zvýšení proliferace. Což odpovídá změně v mitochondriální aktivitě.

Výsledky experimentu nebyly ideální, na práci s konfokálním mikroskopem by bylo třeba více času, aby nedocházelo k přesvícení a aby byly buňky správně zaostřeny v ose z. Experimenty by bylo vhodné zopakovat, ale z důvodu uzavření škol kvůli Covid-19 to nebylo možné.

Závěr

Práce se zabývá strukturou a funkcí buněčných mitochondrií. Jsou to jedny z nejdůležitějších organel eukaryotických buněk. Představují hlavní zdroj energie pro buňku a zajišťují další procesy včetně apoptózy - řízené buněčné smrti. Pro správnou funkci mitochondrií je nezbytně nutný mitochondriální membránový potenciál, který souvisí s Krebsovým cyklem a který je důležitým znakem mitochondriální aktivity. Některé látky vedou k výkyvům v membránovém potenciálu.

Tyto tyčinkovité útvary je možné zobrazit pomocí fluorescenčních metod. Práce se věnuje rozboru fluorescenčních barviv, představuje možnosti fluorescenčního značení. Věnuje se kationtovému barvivu JC-10 lépe rozpustné variantě známého barviva JC-1 a jeho využití při hodnocení mitochondriální aktivity.

Práce dále navrhuje postup pro značení mitochondrií (v kapitole 6.2) tímto barvivem a následné zobrazení buněk s obarvenými mitochondriemi pomocí konfokálního mikroskopu.

V rámci praktické části práce byly buňky PC-3 kultivovány s různými koncentracemi glukózy po různě dlouhý čas a následně byla hodnocena mitochondriální aktivita. Postup hodnocení je rozebrán v kapitole 6.4.

Na základě naměřených dat a výsledků statistiky bylo stanoveno, že různé koncentrace glukózy mají vliv na mitochondriální membránový potenciál a v důsledku i na mitochondriální aktivitu. Koncentrace 2200 mg/l vede k zvýšení mitochondriální aktivity. Zatímco koncentrace 4000 mg/l vede k buněčné apoptóze. Tento závěr odpovídá původní myšlence experimentu.

Nicméně výsledky experimentu nebyly ideální. Práce s konfokálním mikroskopem by vyžadovala více času, aby nedocházelo k přesvícení a aby byly buňky správně zaostřeny v ose z. Experimenty by bylo vhodné zopakovat, ale z důvodu uzavření škol kvůli Covid-19 to nebylo možné.

Literatura

- [1] Scenkel L.C., Bakovic M. (January 2014): *Formation and Regulation of Mitochondrial Membranes* [online]. [cit. 27. 11. 2020]. Dostupné z: <<https://www.hindawi.com/journals/ijcb/2014/709828/>>.
- [2] BD Editors.: *Mitochondria* [online]. [cit. 11. 10. 2020]. Dostupné z: <<https://biologydictionary.net/mitochondria/>>.
- [3] Rogers K. : *Mitochondrion* [online]. [cit. 11. 10. 2020]. Dostupné z: <<https://www.britannica.com/science/mitochondrion>>.
- [4] Sivandzade F., Bhalerao A., Cucullo L. : *Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe.* [online]. [cit. 3. 1. 2021]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6343665/>>.
- [5] Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. : *Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against Pseudomonas aeruginosa.* [online]. [cit. 12. 11. 2020]. Dostupné z: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21594004/>>.
- [6] The university of Queensland, Institute for molecular bioscience *Confocal Microscopes* [online]. [cit. 13. 11. 2020]. Dostupné z: <<https://imb.uq.edu.au/facilities/microscopy/hardware-software/confocal-microscopes>>.
- [7] Rice G : *Fluorescent Microscopy* [online]. [cit. 13. 11. 2020]. Dostupné z: <https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fluromic.html>.
- [8] Sedlářová M. : *Principy konfokální mikroskopie* [online]. [cit. 13. 11. 2020]. Dostupné z: <<http://www.botanika.upol.cz/atlas/y/confmicro/principles.php>>.
- [9] *Saos-2* [online]. [cit. 28. 12. 2020]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-85.aspx?geo_country=cz#characteristics>.
- [10] *Tools to Study Mitochondrial Morphology and Function* [online]. [cit. 3. 12. 2020]. Dostupné z: <<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/newsletters-and-journals/bioprobes-journal-of-cell-biology-applications/>>

- bioprobes-72/bioprobes-72-mitochondrial-morphology-function.html>.
- [11] Bátorová E. Biologie a genetika pro bakaláře. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat: *Buněčné a tkáňové kultury* [online]. [cit. 26. 11. 2020]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-bunecne_a_tkanove_kultury&lang=cz>.
- [12] Nazareth WM, Sethi JK, McLean AE.: . *Effect of paracetamol on mitochondrial membrane function in rat liver slices. Biochem Pharmacol* [online]. [cit. 26. 11. 2020]. Dostupné z: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1867647/>>.
- [13] Dassanayaka S, Readnower RD, Salabei JK, et al: *High glucose induces mitochondrial dysfunction independently of protein O-GlcNAcylation* [online]. [cit. 30. 12. 2020]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4408906/>>.
- [14] *JC-10 protocol* [online]. [cit. 1. 1. 2021]. Dostupné z: <<https://docs.aatbio.com/products/protocol/22204.pdf>>.
- [15] Chen H., Chomyn A., Chan D. C.: *Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction* [online]. [cit. 12. 5. 2021]. Dostupné z: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820568099>>.
- [16] Ma C., Beyer A.M., Durrand M., Clough A.V., Zhu D., Toro L.N., Terashvili M., Ebben J.D., Hill R.B., Audi S.H., Medhora M., Jacobs E.R.: *Hyperoxia Causes Mitochondrial Fragmentation in Pulmonary Endothelial Cells by Increasing Expression of Pro-Fission Proteins* [online]. [cit. 12. 5. 2021]. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.117.310605?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20200pubmed>.
- [17] J.Santo-Domingo, N.Demaurex: *Calcium uptake mechanisms of mitochondria.* [online]. [cit. 12. 5. 2021]. Dostupné z: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527281000006X>>.
- [18] Blandini F., Greenamyre J.T., Nappi G.: *The role of glutamate in the pathophysiology of Parkinson's disease* [online]. [cit. 22. 5. 2021]. Dostupné z: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8936453/>>.

- [19] Santosh Kumari, Suresh L. Mehta, P. Andy Li : *Glutamate Induces Mitochondrial Dynamic Imbalance and Autophagy Activation: Preventive Effects of Selenium* [online]. [cit. 22. 5. 2021]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3378533/#pone.0039382-Blandini1>.
- [20] *PC-3 Cell Line human* [online]. [cit. 22. 5. 2021]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_90112714?lang=en®ion=CZ&gclid=CjwKCAjwv_iEBhASEiwARoemvPKAd8oEfJYW1RkOnYgOSjs6SNrLq9saJhixs9MuIizKDBN05rs4CBoCzuQQAvD_BwE.
- [21] Ljubava D. Zorova, Vasily A. Popkov, Egor Y. Plotnikov, Denis N. Silachev, Irina B. Pevzner, Stanislovas S. Jankauskas, Valentina A. Babenko, Savva D. Zorov, Anastasia V. Balakireva, Magdalena Juhaszova, Steven J. Sollott, Dmitry B. Zorova,; *Mitochondrial membrane potential* [online]. [cit. 22. 5. 2021]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5792320/>.
- [22] *HHBS [Hanks' Buffer with 20 mM Hepes]* [online]. [cit. 22. 5. 2021]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/products/hhbs-hanks-buffer-with-20-mm-hepes>.
- [23] *HEPES* [online]. [cit. 22. 5. 2021]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/hepes.html?gclid=Cj0KCQjw16KFBhCgARIsALB0g8IUkIa-mQN8dkczVHST2CHlyGggQXzew9pFos2R0XALNFwwRbrHMwcB&s_kwid=AL!3652!3!345999995264!e!!g!!hepes&ef_id=Cj0KCQjw16KFBhCgARIsALB0g8IUkIa-mQN8dkczVHST2CHlyGggQXzew9pFos2R0XALNFwwRbrHMwcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!345999995264!e!!g!!hepes&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con.
- [24] *Balanced Salt Solutions* [online]. [cit. 22. 5. 2021]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/balanced-salt-solutions.html?gclid=CjwKCAjwJ2FBhAuEiwAIKu19qrjwzoPHGKICHX7MY-cF7cHAXcNPe75-ueqLB-ty18_8vDh7_07hhoCGnMQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAjwJ2FBhAuEiwAIKu19qrjwzoPHGKICHX7MY-cF7c8vDh7_07hhoCGnMQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!391186515799!e!!g!!hbss&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con.

- [25] Trudeau K., Molina A. J. A., Roy S. *High Glucose Induces Mitochondrial Morphology and Metabolic Changes in Retinal Pericytes* [online]. [cit. 24. 5. 2021]. Dostupné z: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3230288/>](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3230288/).
- [26] Zhang D., Lu H., Chen Z., Wang Y., Lin J., Xu S., Zhang C., Wang B., Yuan Z., Feng X., Jiang X., Pan J. *High glucose induces the aging of mesenchymal stem cells via Akt/mTOR signaling* [online]. [cit. 24. 5. 2021]. Dostupné z: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5562095/>](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5562095/).
- [27] Jiang Z., Lu W., Zeng Q., Li D., Ding L., Wu J. *High glucose-induced excessive reactive oxygen species promote apoptosis through mitochondrial damage in rat cartilage endplate cells* [online]. [cit. 24. 5. 2021]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jor.24016>.
- [28] Rezende L.P., Galheigo M.R.U., Landim B.C., Cruz A.R., Botelho F.V., Zanon R.G., Góes R.M., Ribeiro D.L. *Effect of glucose and palmitate environment on proliferation and migration of PC3-prostate cancer cells* [online]. [cit. 25. 5. 2021]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30353973/>.
- [29] Kajihara N., Kukidome D., Sada K., Motoshima H., Furukawa N., Matsumura T., Nishikawa T., Araki E. *Low glucose induces mitochondrial reactive oxygen species via fatty acid oxidation in bovine aortic endothelial cells* [online]. [cit. 25. 5. 2021]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5668512/>.
- [30] *Mitochondrie* [online]. [cit. 25. 5. 2021]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/mitochondrie.html.
- [31] *Fluorescenční mikroskopie* [online]. [cit. 25. 5. 2021]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Fluorescen%C4%8Dn%C3%AD_mikroskop#/media/Soubor:FluorescenceFilters_2008-09-28_cs.svg.
- [32] Rous Z. *Cesta optické mikroskopie k superrozlišení* [online]. [cit. 25. 5. 2021]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2015/cislo-3/cesta-opticke-mikroskopie-k-superrozliseni.html#&gid=1&pid=1>.
- [33] *JC-10 *Superior alternative to JC-1** [online]. [cit. 25. 5. 2021]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/products/jc-10-superior-alternative-to-jc-1>.

Seznam symbolů a zkratek

ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
mtDNA	mitochondriální DNA
Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A
HHBS	Hank's buffer with HEPES
HBSS	Hank's balanced salt solution
PBS	fosfátový pufr
48h	48 hodin
24h	24 hodin
$\Delta\Psi_m$	mitochondriální membránový potenciál
CO_2	oxid uhličitý
H_2O	voda
O_2	kyslík

A Ukázka dat

Tab. A.1: Data 24h

	červená	zelená	počet buněk	vzorek
17 kontrola (K)	589451	811128	3	p1
	1548301	1716224	9	p3
	350341	448683	1	p5
16 kontrola (K)	663950	971940	18	p1
	496849	747493	3	p3
	179103	274649	6	p5
17 střední koncentrace (2200)	914125	1195989	2	p2
	188115	260646	2	p4
	374426	526042	5	p6
16 střední koncentrace (2200)	85377	125765	2	p2
	185013	220710	2	p4
	214173	312827	3	p5
17 vysoká koncentrace (4000)	nehodnotitelné			
16 vysoká koncentrace (4000)	nehodnotitelné			

Obě tabulky obsahují část dat, která byla zaznamenána do Microsoft Excel. V první tabulce jsou data z prvního snímání - po 24 hodinách. Ve druhé jsou data z druhého snímání po 48 hodinách.

Tab. A.2: Data 48h

	červená	zelená	počet buněk	vzorek
17 kontrola (K)	2092127	3950355	7	p1
	6090384	11401622	22	p3
	2173869	2801240	3	p5
16 kontrola (K)	17522081	19022167	9	p1
	13180242	13161724	2	p3
	18960492	14285845	13	p5
17 střední koncentrace (2200)	1376998	2131798	5	p1
	1074436	587172	2	p4
	2472071	1972071	5	p6
16 střední koncentrace (2200)	6917836	3101505	10	p2
	7069909	2467854	2	p4
	7593557	3746957	9	p3
17 vysoká koncentrace (4000)	640473	1018508	6	p7
	186065	270723	1	p2
	402259	585540	4	p4
16 vysoká koncentrace (4000)	437620	681733	2	p1
	453139	679277	3	p3
	321825	467695	3	p5

	červená	zelená	počet buněk	vzorek	rozdíl	/počet buněk
24h 17. kontrola (K)	589451	811128	3	p1	221677	73892,33333
	1548301	1716224	9	p3	167923	18658,11111
	350341	448683	1	p5	98342	98342
	206035	293807	2	p7	87772	43886
	429302	624340	2	p2	195038	97519
24h 16. kontrola (K)	366461	518142	2	p4	151681	75840,5
	663950	971940	18	p1	307990	17110,55556
	496849	747493	3	p3	250644	83548
	179103	274649	6	p5	95546	15924,33333
	654330	940482	21	p7	286152	13626,28571
24h 17 střední koncentrace (220)	1036374	1574442	35	p2	538068	15373,37143
	486105	688640	16	p4	202535	12658,4375
	914125	1195989	2	p2	281864	140932
	188115	260646	2	p4	72531	36265,5
	374426	526042	5	p6	151616	30323,2
24h 16 střední koncentrace (220)	197799	273506	5	p7	75707	15141,4
	642624	824661	1	p1	182037	182037
	89900	101168	1	p3	11268	11268
	85377	125765	2	p2	40388	20194
	185013	220710	2	p4	35697	17848,5
24h 17 vysoká koncentrace (400)	214173	312827	3	p5	98654	32884,66667
	963047	1357406	4	p7	394359	98589,75
	48858	63867	1	p3	15009	15009
	1039815	1385558	9	p6	345743	38415,88889
	nehodnotitelné - špatně zaostřeno v z ose					
24h 17 vysoká koncentrace (400)						
	nehodnotitelné - špatně zaostřeno v z ose					

Obr. A.1: Ukázka z Microsoft Excel