

VYUŽITÍ NANOTECHNOLOGIÍ V MEDICÍNĚ

Autor: David Klepárník

Školitel: Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.

Ústav lékařské biofyziky, LF UP v Olomouci

Úvod:

Nanočástice jsou látky a sloučeniny jejichž rozměry jsou menší než 100 nm. Nanotechnologie mohou být využity v mnoha odvětvích medicíny. Při posuzování nanočástic je důležité sledovat jaký je jejich přínos, ale také jejich cytotoxicitu a vliv na zdravé buňky obecně.

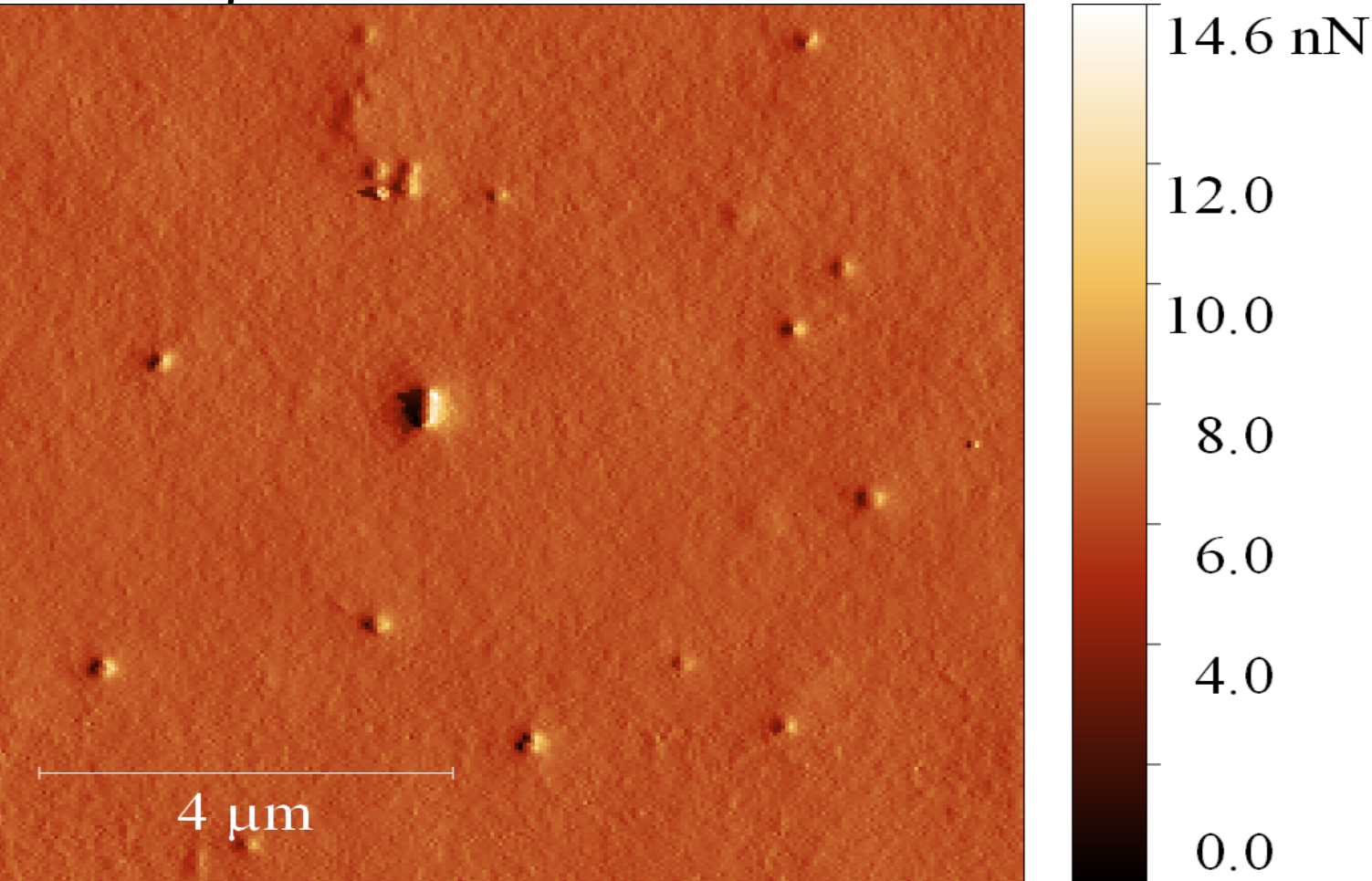
Prezentace výsledků z minulých prací

Základní vlastnosti nanočástic stříbra (Ag) a jejich vliv na nenádorovou buněčnou linii NIH3T3 (myši fibroblasty) byly předmětem minulých prací.

V prvním roce jsme se zaměřili na stanovení velikosti nanočástic stříbra pomocí mikroskopie atomárních sil, spektrofotometricky určili absorpční vlastnosti a stanovili cytotoxicitu s využitím MTT testu ($IC_{50}=0,0025$ mg/ml). V dalším roce jsme stanovili produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v závislosti na koncentraci nanočástic stříbra a míru poškození DNA pomocí kometové analýzy.

Obr. č. 1: 2D snímek Ag nanočástic získaný pomocí AFM (*peak force error*)

Zdroj: vlastní



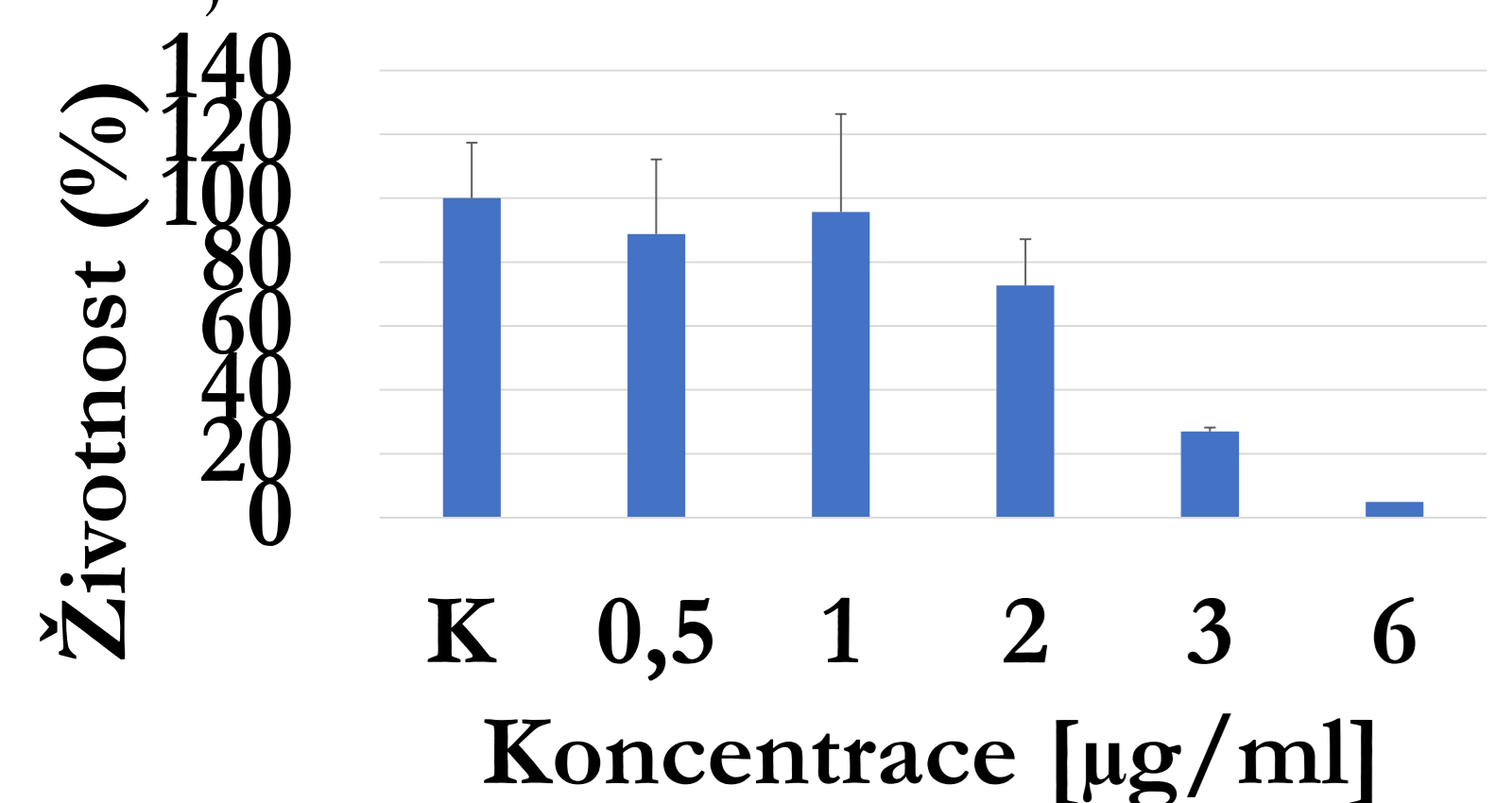
Tabulka č. 1: Hodnoty velikosti Ag nanočástic získané AFM analýzou.

Zdroj: vlastní

AFM	Průměr (nm)
Střední hodnota	43,5
Medián	42,7

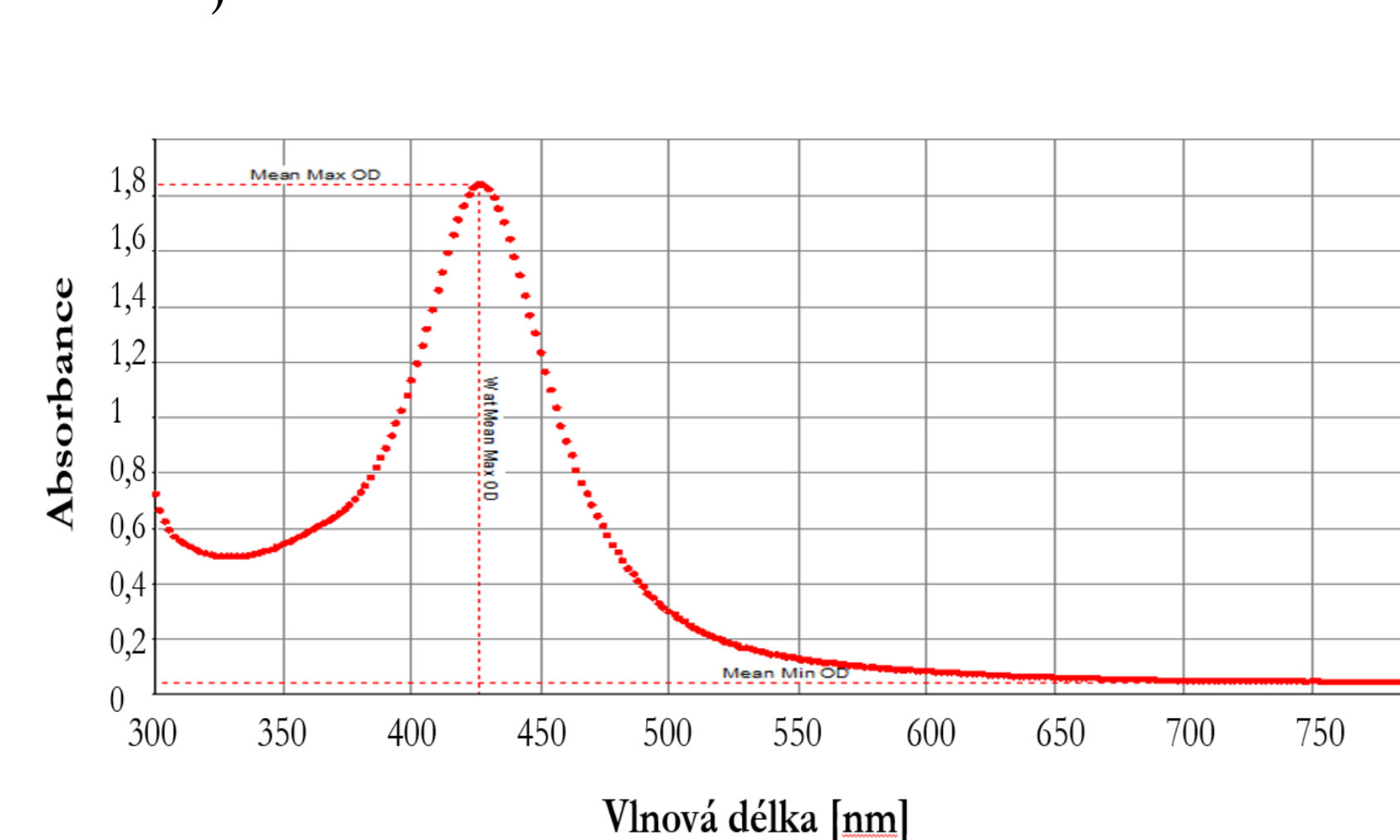
Graf č. 1: Závislost životnosti NIH3T3 buněk na koncentraci Ag nanočástic.

Zdroj: vlastní



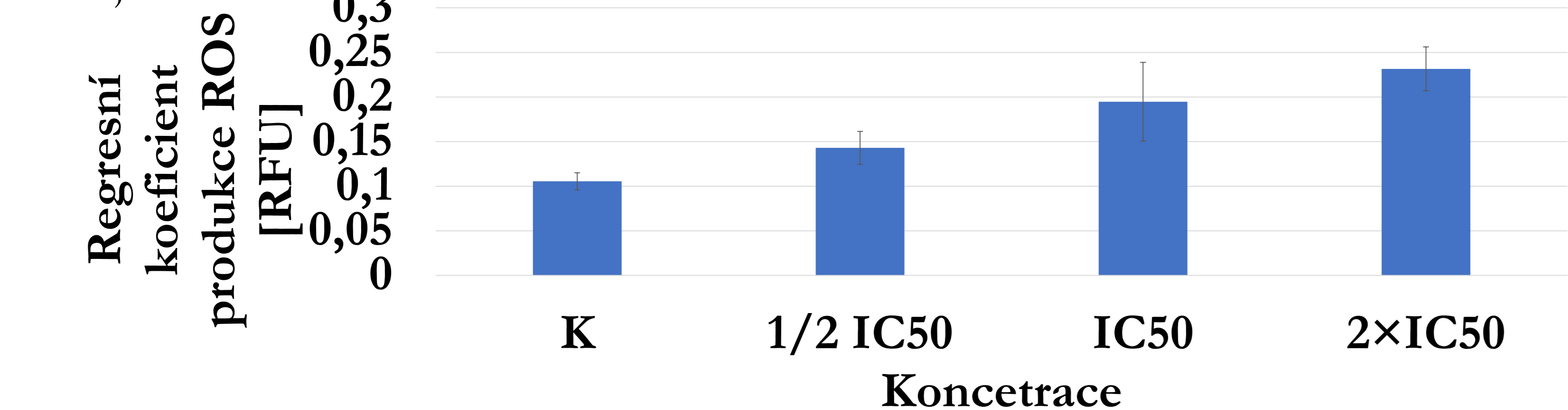
Graf 2: Absorpční křivka Ag nanočástic.

Zdroj: vlastní



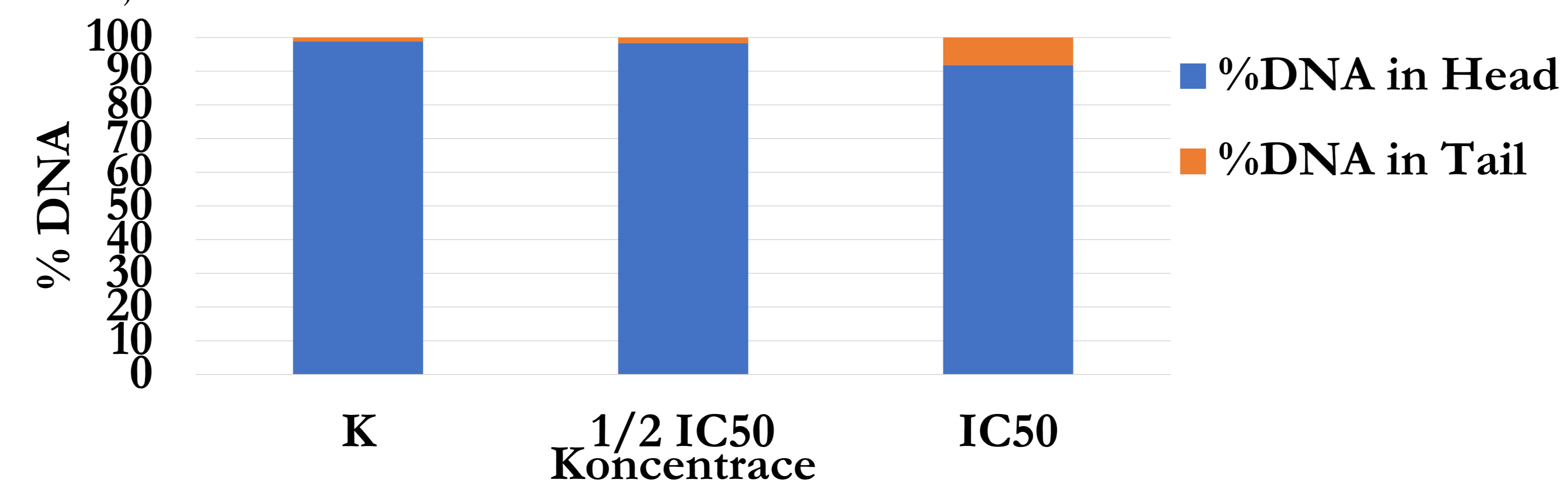
Graf č. 3: Závislost produkce ROS na koncentraci stříbrných nanočástic.

Zdroj: vlastní



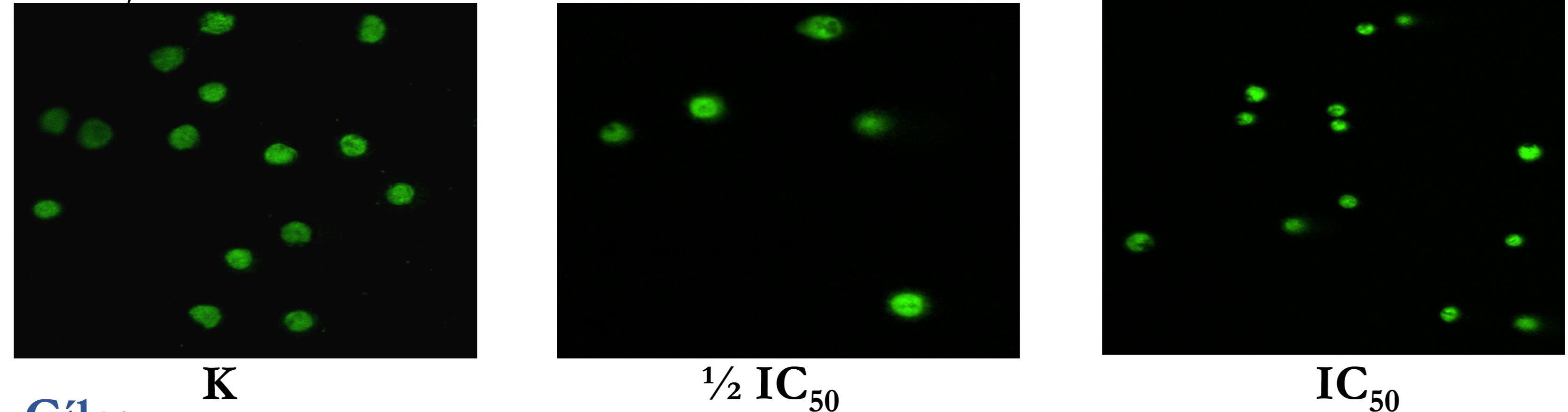
Graf č. 4: Míra poškození DNA.

Zdroj: vlastní



Obr. č. 2: Snímek buněk NIH3T3 získaný pomocí kometové analýzy.

Zdroj: vlastní



Cíle:

1. Určit působení stříbrných nanočástic na mitochondriální membránový potenciál NIH3T3 buněk *in vitro*.
2. Charakterizovat morfologické změny na buněčné linii NIH3T3 *in vitro* vlivem nanočástic stříbra pomocí mikroskopie atomárních sil.

Materiál a metody:

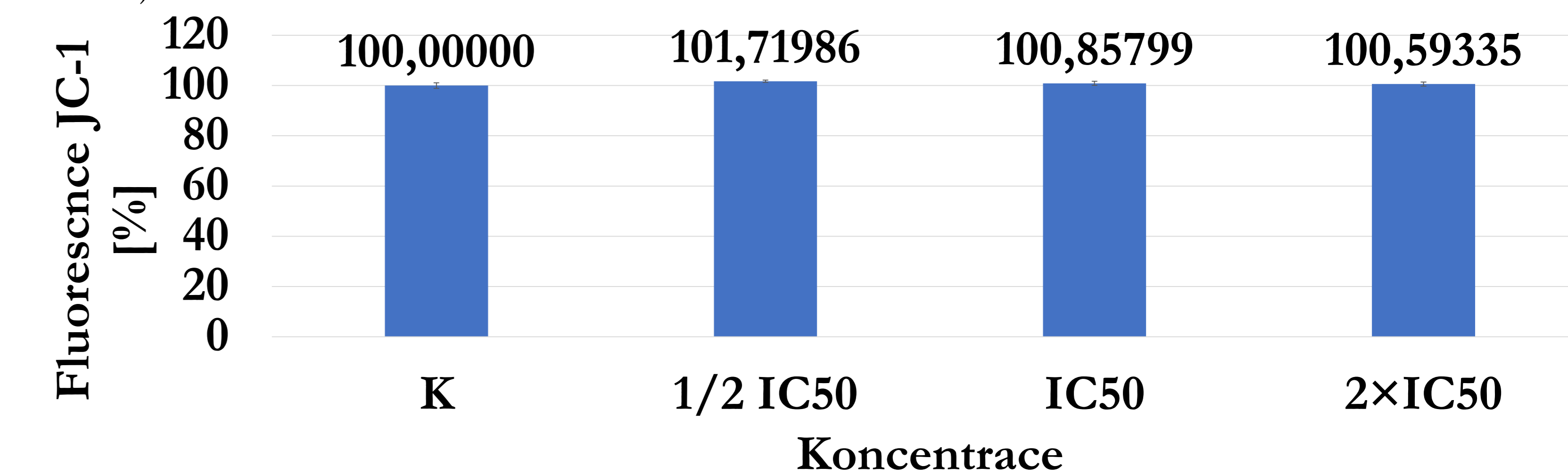
1. Membránový potenciál jsme stanovili na buněčné linii NIH3T3 (myši fibroblasty) v koncentracích IC_{50} (0,0025 mg/ml), $1/2IC_{50}$, $2\times IC_{50}$ a kontrola. Buňky jsme inkubovali s nanočásticemi po dobu 24 hodin při 37°C. Následně jsme buňky inkubovali po dobu 20 minut se sondou JC-1 v PBS $1\times$ (2 μg/l) ve tmě při 37 °C. Poté byla měřena fluorescence při 530 nm a 590 nm při excitační vlnové délce 490 nm a 525 nm pomocí fluorescenčního readeru Tecan Infinite 200pro. Celkem jsme provedli tři opakování.
2. Pro měření na AFM jsme použili 2×10^5 buněk linie NIH3T3 v Petriho misce. Skenovány byly kontrolní buňky a buňky, které byly inkubovány 24 hodin při 37 °C se stříbrnými nanočásticemi o koncentraci IC_{50} (0,0025 mg/ml). Velikost snímku byla 100×100 μm, rychlost skenu 0,1-0,25 Hz. Při měření jsme použili hrot DNP-10-B s konstantou pružnosti 0,12 N/m.

Výsledky:

1. Výsledky mitochondriálního membránového potenciálu neprokázaly statisticky významný rozdíl mezi kontrolními buňkami a buňkami inkubovanými s nanočásticemi stříbra. Tento poznatek naznačuje, že stříbrné nanočástice primárně nepoškozují mitochondrie a nenarušují tak jejich funkci.
2. Skenování povrchu buněk prokázalo viditelné změny v jejich morfologii, kdy vlivem stříbrných nanočástic došlo ke změně typické morfologie a povrchu buněk linie NIH3T3. Tyto změny také potvrdily výsledky z analýzy výškového profilu buněk, kdy průměrná výška kontrolních buněk byla 1,185 μm a buněk s nanočásticemi stříbra 3,306 μm.

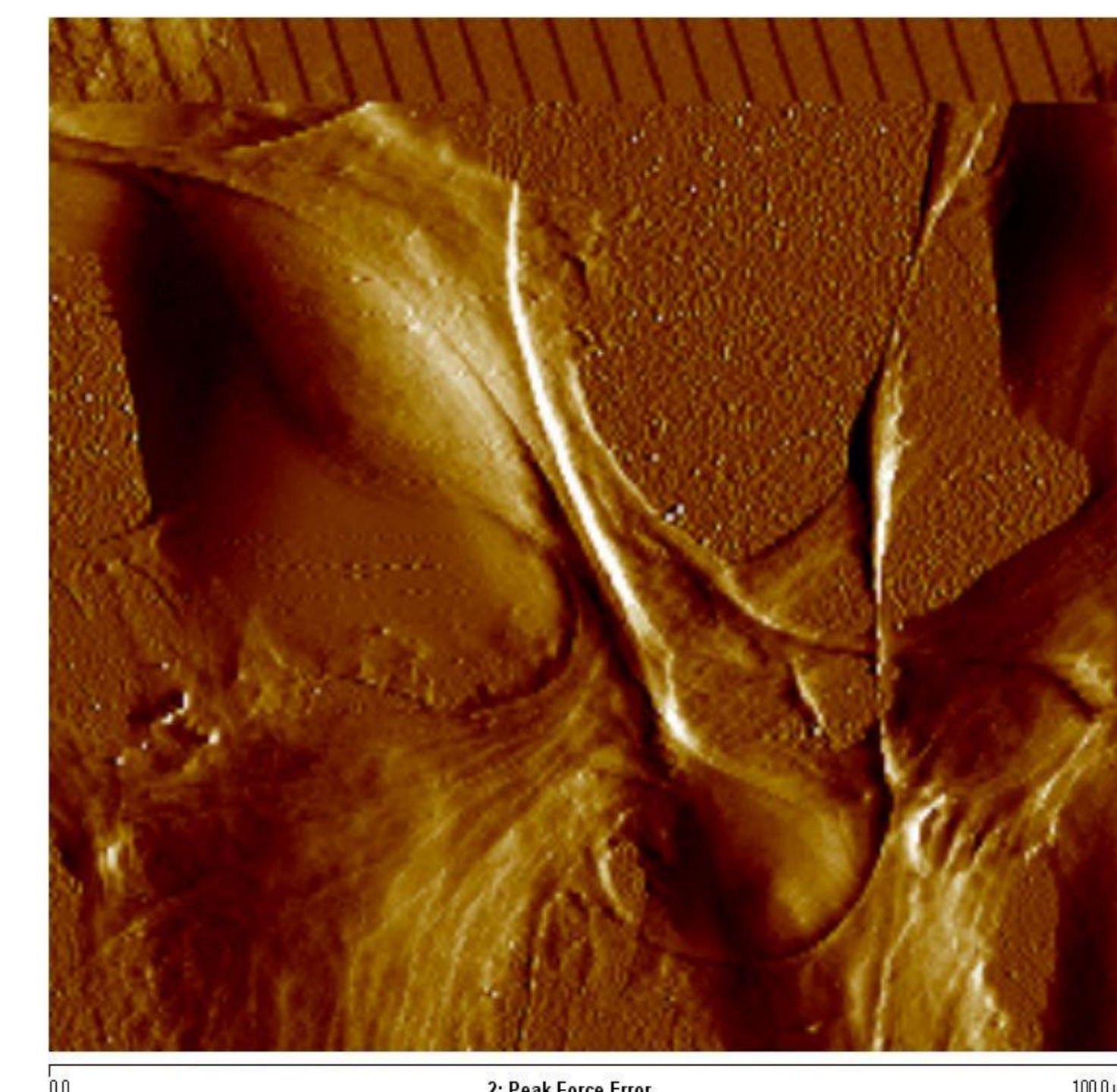
Graf č. 5: Závislost membránového potenciálu na koncentraci Ag nanočástic, inkubace 24 hodin.

Zdroj: vlastní



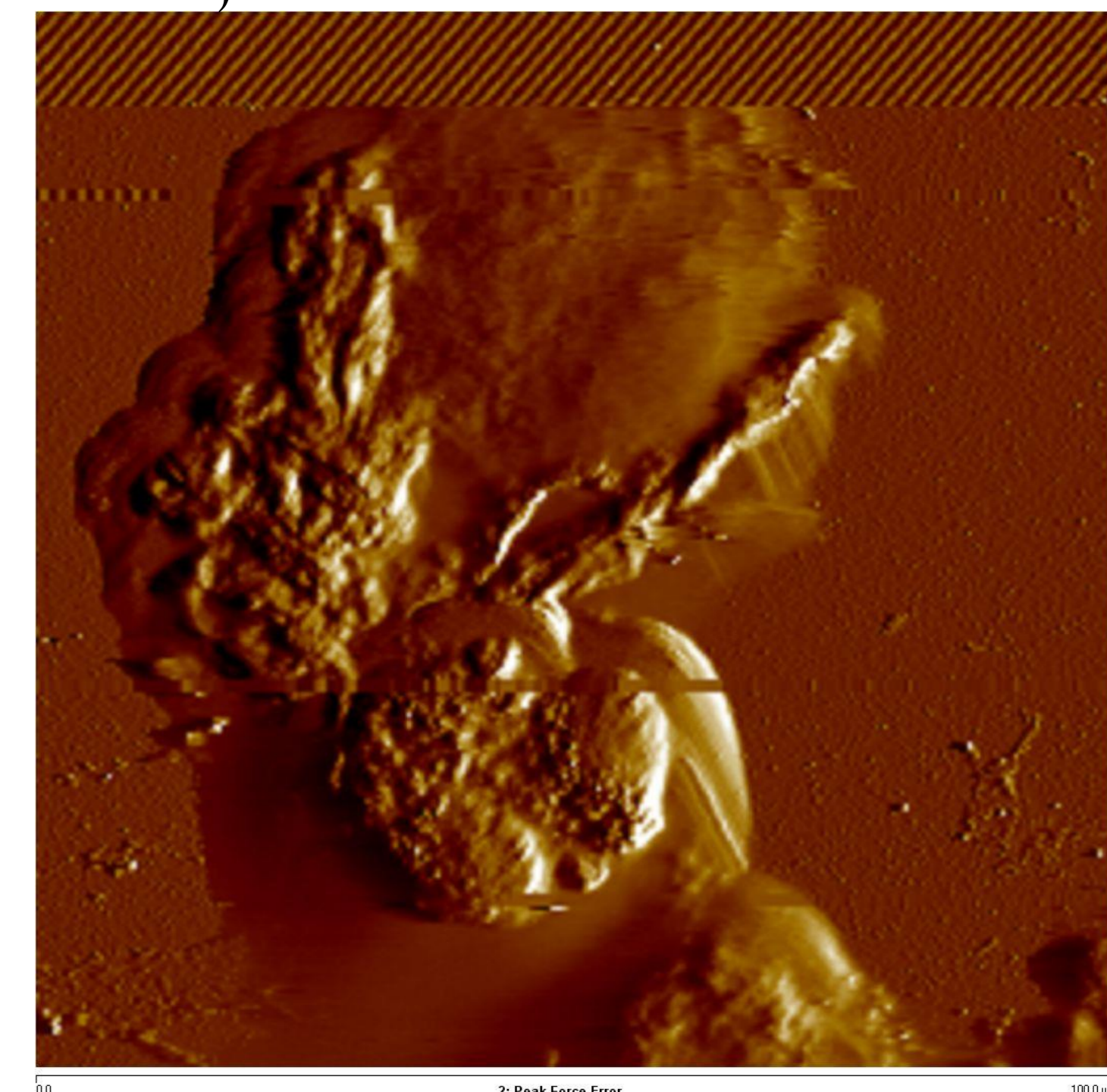
Obr. č. 5: Snímek buněk NIH3T3 (kontrola) získaný pomocí AFM (*peak force error*).

Zdroj: vlastní



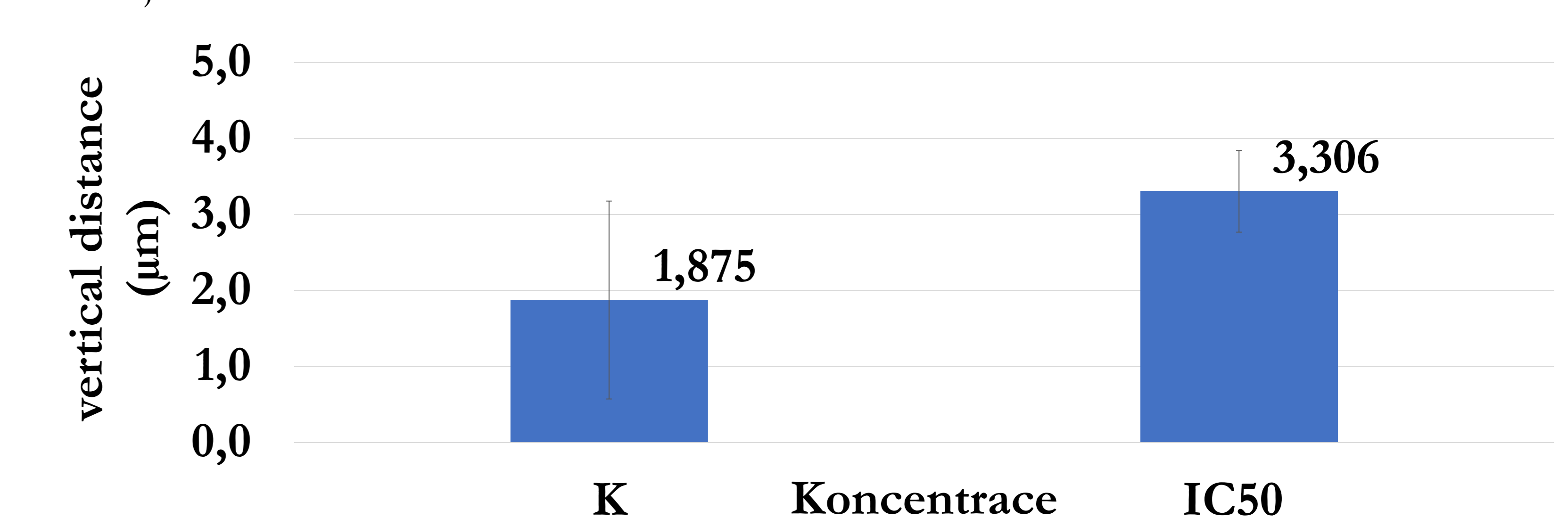
Obr. č. 6: Snímek buněk NIH3T3 s Ag nanočásticemi (koncentrace IC_{50}) získaný pomocí AFM (*peak force error*).

Zdroj: vlastní



Graf č. 6: Závislost výškového profilu buněk na koncentraci Ag nanočástic.

Zdroj: vlastní



Závěr:

1. Pomocí stanovení membránového potenciálu jsme zjistili, že mitochondrie nejsou primárním cílem nanočástic stříbra a k usmrcení buněk dochází tedy prostřednictvím jiného mechanismu.
2. Porovnáním povrchových skenů buněk jsme prokázali viditelné změny v morfologii, které byly způsobeny vlivem stříbrných nanočástic. Tyto změny také potvrdily výsledky analýzy výškového profilu, kdy vlivem Ag nanočástic došlo k průměrné změně výšky buněk z 1,185 μm (kontrola) na 3,306 μm (IC_{50}).