


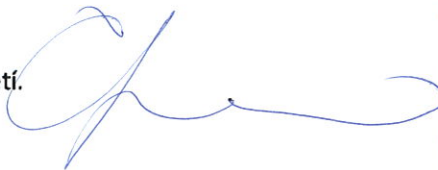
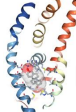



 <b>BIOCEV</b>	<b>RDPM30</b>	<b>Name:</b> RD protokol o měření
		<b>Date:</b> 19.10.2021
 <b>UNIVERZITA KARLOVA</b> I. lékařská fakulta		<b>Address:</b> Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Czech Republic

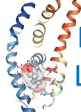



## R&D protokol o měření

Provedl:	Ing. Zdeněk Kejík, Ph.D.	Podpis:		Datum:	13.10.2021
Schválil:	Ing. Milan Jakubek, Ph.D.	Podpis:		Datum:	19.10.2021
Převzal:	Ing. Petra Gottwald	Podpis:		Datum:	21.10.2021
<b>Poznámka:</b> Předávací protokol. Souhlasím s provedením a potvrzuji převzetí. 					

 <b>MedChem Laboratory</b>	 <b>BIOCEV</b>	<b>RDPM30</b>	<b>Name:</b> RD protokol o měření
  UNIVERZITA KARLOVA I. lékařská fakulta			<b>Date:</b> 19.10.2021
			Address: Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Czech Republic

## Obsah

Cíl .....	3
Přístroje .....	3
Chemikálie .....	3
Světelné zdroje – technická specifikace .....	4
Experimentální část.....	5
Naměřené výsledky.....	6
Závěr.....	7

 <b>MedChem Laboratory</b>	 <b>BIOCEV</b>	<b>RDPM30</b>	<b>Name:</b> RD protokol o měření
  <b>UNIVERZITA KARLOVA</b> I. lékařská fakulta			<b>Date:</b> 19.10.2021
			Address: Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Czech Republic

## Cíl

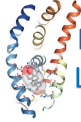


Experimentální porovnání vlivu komerčních svítidel se svítidlem Spectrasol prokognitivní LED s červenou reparační složkou světla na lidské oko otestováním na buněčné linii R28 (Retinal Cell Line, Kerafast).

## Přístroje

- LUNA II, Automated cell counter (Logos)
- Inkubátor s CO2 regulací
- LUNA slide
- Kultivační lahve, běžný laboratorní materiál a příslušenství
- Laminární box
- Světelný senzor Thorlabs s130c

## Chemikálie

- **Trypan Blue Stain 0,4%**
- **R28 cell line, CVCL\_5I35** (R28 je adherentní retinální prekursorová buněčná linie odvozená z postnatální 6. dne krysí sítnice Sprague-Dawley imortalizované 12S E1A genem adenoviru. Gen 12S E1A byl zaveden prostřednictvím nekompetentního retrovirového vektoru; buňkami R28 tedy není produkován žádný infekční virus. Buňky byly dosud pasážovány 200krát a nevykazují žádné známky stárnutí.)
- **DMEM+** (420 ml DMEM D5523 nekompletní (Sigma); 15 ml hydrogenuhličitanu sodného (7,5% zásobní roztok, w/v) (Sigma S5761); 50 ml telecího séra (Hylone, SH30073.03HI); 5 ml neesenciálních aminokyselin MEM (GIBCO, 11140-019); 5 ml L-glutaminu (zásoba 200 mM) (GIBCO, 25030-024); 0,625 ml ml gentamicinu (zásobní roztok je 80 mg/ml)
- **CMF-EDTA** (Nejprve bylo vytvořeno CMF: NaCl 8,77 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,28 g; KCl 0,2 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g; NaHCO<sub>3</sub> 2,18 g; Tyto sloučeniny byly rozpuštěny v 900 ml dH<sub>2</sub>O. pH roztok standardizováno na 7,4. Poté zvýšen objem na jeden litr s sterilní H<sub>2</sub>O. Sterilizace filtrem a autoklávem. CMF-EDTA: na každých 100 ml sterilního CMF připraveného výše bylo přidáno následující: 1 ml sterilní 2% EDTA; 1 ml sterilní 10% glukózy; 125 ul gentamicinu (konečná koncentrace je 50 ug/ml.

 <b>MedChem Laboratory</b>	 <b>BIOCEV</b>	<b>RDPM30</b>	<b>Name:</b> RD protokol o měření
			<b>Date:</b> 19.10.2021
 <b>UNIVERZITA KARLOVA</b> I. lékařská fakulta			<b>Address:</b> Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Czech Republic

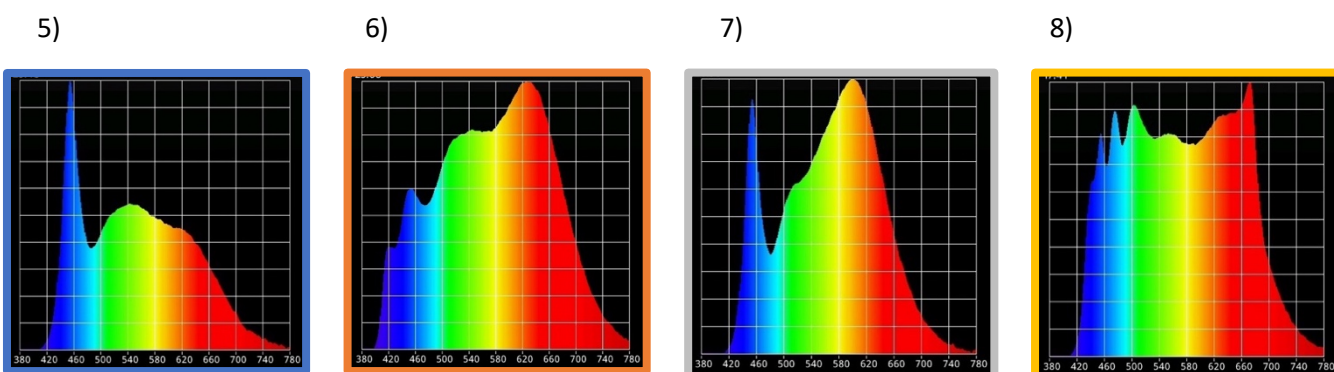
## Světelné zdroje – technická specifikace

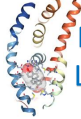



Jednotlivé testované LED světelné zdroje byly osazeny na DPS o velikosti cca 20x250mm, pro vhodné umístění do kultivačního inkubátoru. Zdroje byly uloženy do kultivačního boxu a fixovány ve vzdálenosti 400 mm od testovací plochy kultivačních jamkových destiček. Destičky byly během osvitů uzavřené, osvit vzorků retinálních buněk byl rovnoměrný. Každý světelný zdroj byl vybaven vlastním napájením s regulací, pro přesné nastavení vyzařované energie v referenční vlnové délce 480 nm (modrá). U všech světelných zdrojů nastavených dle referenční energie ve 480 nm byla současně pro kontrolu změřena i reparační energie světla o vlnové délce 670nm (NIR). Podrobná specifikace světelných zdrojů viz. tab. níže. Osvit byl prováděn v uzavřeném zatemněném inkubátoru, vždy jedním typem světelného zdroje, kdy každá sada kultivačních destiček s tkáňovou kulturou R28 byla ozařována samostatně s odstíněním jakéhokoli externího světelného zdroje, pro vyloučení chyby.

Označení a technické specifikace použitých světelných zdrojů:

Označení zdroje		Typ LED	Technický popis LED	Power density [ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ]		Vzdálenost zdroje od experimentální plochy
číslo	interní označení			$\lambda$ [nm]	[ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ]	
5	NS	Studeně bílá LED s vysokou intenzitou modré primární energie	LED 6500K CRI 93 (primární energie $\lambda \approx 450\text{nm}$ )	480	239	400
6	SLK	Neutrálně bílá LED s fialovou primární energií	LED 4000K CRI 95 (primární energie $\lambda \approx 420\text{nm}$ )	480	240	400
7	STND	Neutrálně bílá LED s modrou primární energií, standardní CRI	LED 4000K CRI 80 (primární energie $\lambda \approx 450\text{nm}$ )	480	240	400
8	SPPK	Spectrasol pro-kognitivní LED s červenou reparační energií	LED 4900K CRI 95 s 670nm (primární energie $\lambda \approx \text{multi}$ )	480	240	400

Spektrální diagramy testovaných světelných zdrojů:



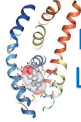


 <b>MedChem Laboratory</b>	 <b>BIOCEV</b>	<b>RDPM30</b>	<b>Name:</b> RD protokol o měření
  <b>UNIVERZITA KARLOVA</b> I. lékařská fakulta			<b>Date:</b> 19.10.2021
			Address: Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Czech Republic

## Experimentální část

Buňky byly rozmrazeny při laboratorní teplotě (cca 15 min). Následně byl obsah buněk napipetován do 5 mL media DMEM+ a centrifugován po dobu 5 minut. Pelet buněk byl rozdispergován v 10 ml media DMEM+ (vortex) a byl inkubován v inkubátoru (37°C) 2 dny.

Po 2 dnech inkubace byly buňky zpasážovány. Buňky byly vypláchnuty 1 ml EDTA. Dále byl přidán 1 ml EDTA a 1 ml trypsinu a takto připravená kultivační lahev byla inkubována 5 minut. Bylo přidáno 5 ml čerstvého media DMEM+ a roztok byl promíchán (vortex). Polovina roztoku byla odpipetována do nové kultivační lahve a do obou lahví bylo přidáno nové medium DMEM+ do konečného objemu 20 ml. Takto připravené kultivační lahve byly opět dány do inkubátoru a inkubovány po dobu 3 dnů. Počáteční koncentrace po kultivaci činila cca 519000-579000 buněk na ml.

Buňky byly každý den kontrolovány pod mikroskopem z pohledu jejich růstu. Potom byly buňky rozpipetovány do jednotlivých jamek 12 jamkové destičky. Následně po třech dnech byly buňky vloženy do inkubátoru 37°C a 5%CO<sub>2</sub> a vystaveny záření světelného zdroje dle technické specifikace. Před zahájením ozařování byl proveden první odběr, následně byl po uzavření inkubátoru zapnut světelný zdroj. První tři hodiny byl odběr častější, a to po 30 minutách, kdy byl očekáván největší progres v růstu tkáňové kultury, poslední odběr byl proveden po 10 hodinách, tedy po 600 min ozařování. V každý časový okamžik odběru, byly buňky odebrány ze dvou jamek, zpracovány a změřena jejich koncentrace (počet živých buněk). Výsledky byly vyneseny graficky.

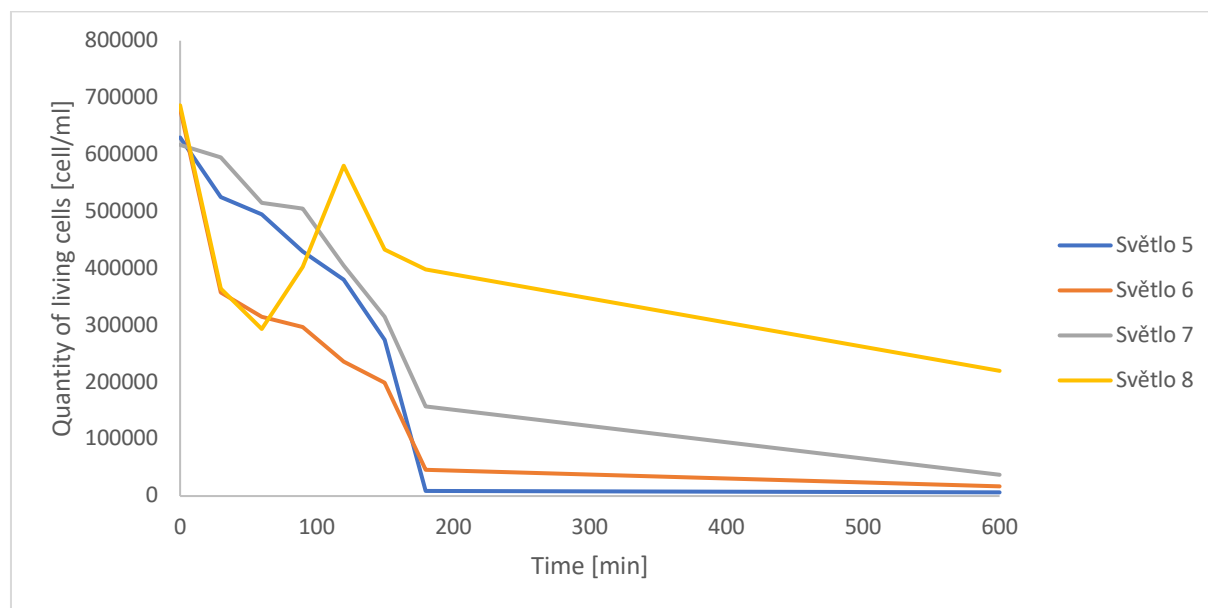
 <b>MedChem Laboratory</b>  <b>BIOCEV</b>	<b>RDPM30</b>	<b>Name:</b> RD protokol o měření
		<b>Date:</b> 19.10.2021
 <b>UNIVERZITA KARLOVA</b> I. lékařská fakulta		<b>Address:</b> Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Czech Republic

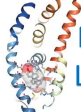



## Naměřené výsledky

Hodnoty živých buněk odebraných z ozařování v daném čase

LIVE	Světlo 5	Světlo 6	Světlo 7	Světlo 8
0	630000	680000	617000	686500
30	525000	357500	595000	364500
60	494500	315000	515000	293500
90	430000	297000	505000	402500
120	380000	236000	405000	580000
150	275000	199000	314500	433500
180	9500	46400	158000	398000
600	6500	17050	37400	220000

Grafická závislost délky ozařování tkáňové kultury světelnými zdroji na množství živých buněk



 <b>MedChem Laboratory</b>	 <b>BIOCEV</b>	<b>RDPM30</b>	<b>Name:</b> RD protokol o měření
  <b>UNIVERZITA KARLOVA</b> I. lékařská fakulta			<b>Date:</b> 19.10.2021
			Address: Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Czech Republic

## Závěr

Stejně jako u světelných zdrojů v prvním experimentu byl i nyní zjištěn značný rozdílný vliv záření na opačných stranách viditelné oblasti spektra a to krátkých vlnových délek modrého a fialového světla oproti záření dlouhých vlnových délek červeného světla na samotný růst, resp. dělení buněk retinální linie R28.

Kvantitativní rozdíl žijících buněk byl sledován v čase pod vlivem záření, tentokrát běžně v interiérech využívaných bílých LED světel. Porovnávané komerční světelné zdroje 5 až 7 způsobovaly po přibližně 200 minutách osvitů buněčnou apoptozu, jen světelný zdroj 8 po 60 minutách osvitů vykázal po původním snížení stavu živých buněk nárůst z  $2,9 \cdot 10^5$  na  $5,8 \cdot 10^5$  (téměř na dvojnásobek). Následný pokles byl způsoben zřejmě vyčerpáním živin (experiment byl prováděn vsádkově).

Výsledek provedeného experimentu naznačuje, že ozáření retinálních buněk R28 (sítnicové buňky oka), především elektromagnetickým zářením viditelného světla krátkých vlnových délek s maximem modrého světla ve 450 nm (světelný zdroj 5), nebo světelným zdrojem s maximem v ještě kratších vlnových délkách 420 nm fialové části světelného spektra (světelný zdroj 6) má za následek apoptozu buněk.

Zároveň byl sledován pozitivní vliv fotobiomodulační energie viditelného záření v 670 nm obsažené ve světelném zdroji 8 na vitalitu retinálních buněk R28. Je tedy pravděpodobné, že bílý LED světelný zdroj 8 s červeným LED čipem s maximem vyzařování v 670 nm, neutralizuje nežádoucí vliv modrého světla na sítnicové buňky oka a pozitivně ovlivňuje jejich vitalitu jeho prostým používáním. Tato zjištění je třeba ověřit a podrobně analyzovat dalším výzkumem, aby byly popsány jevy opakovaně prokázány a podrobněji popsány.