

Základy - buněčné kultury, cytokinetika

J. Hofmanová
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity
Biofyzikální ústav AV ČR, Brno
hofmanova@ibp.cz



ODDĚLENÍ CYTOKINETIKY

<http://www.ibp.cz/cs/oddeleni/cytokinetika/informace-o-oddeleni>

těsná spolupráce s Odd. fyziologie a imunologie živočichů ÚEB, PřF MU

VĚDECKÉ ZAMĚŘENÍ

- ▶ Molekulární mechanismy zahrnuté v kontrole buněčné proliferace, diferenciaci, přežití/smrti
- ▶ změny buněčného fenotypu a mezibuněčné komunikace, které hrají úlohu ve vývoji nádorových onemocnění a mohou být využity v protinádorové terapii.

OKRUHY VÝZKUMU

- Úloha lipidů a jejich metabolismu v rozvoji nádorového onemocnění kolonu
- Mechanismy působení dietetických mastných kyselin (n-3 PUFAs, butyrát)
- Působení protinádorových léčiv (platinové deriváty v interakci s cytokinem TRAIL)
- Role růstových faktorů v signalizaci nádorových buněk prostaty (TGF beta, EMT, senescence), vliv nádorového mikroprostředí
- Molekulární a buněčné mechanismy toxicity organických látek (PAHs, PCB, interakce s dietetickými lipidy)

PŘENÁŠKY A CVIČENÍ ZAJIŠŤOVANÉ ODD. CYTOKINETIKY (Odd. fyziologie a imunologie živočichů, ÚEB, PŘF MU)

- Fyziologie buněčných systémů (Bi7070), prof. A. Kozubík
- Mechanismy karcinogeneze (Bi 8110), prof. J. Hofmanová
- Zdravotní rizika (Bi3871), prof. J. Hofmanová
- Molekulární fyziologie živočichů (Bi651)
- Mechanizmy buněčné smrti, význam, metody – RNDr. Alena Hyršlová, Ph.D. (Bi8870)
- Analytická cytometrie – Mgr. K. Souček, PhD. (Bi9393)
- Aplikovaná chemie a biochemie – Doc. Vondráček (Bi5599)

TKÁŇOVÉ (BUNĚČNÉ) KULTURY *IN VITRO*

živočišné, rostlinné, hmyzí, rybí atd.

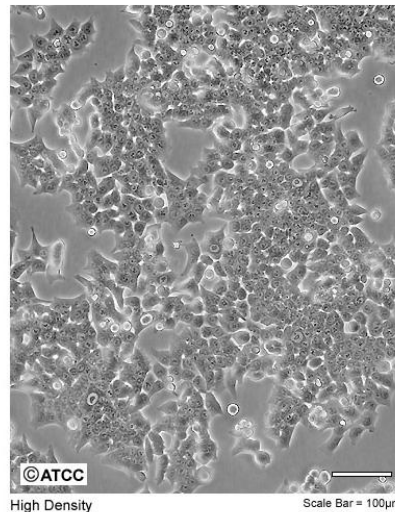
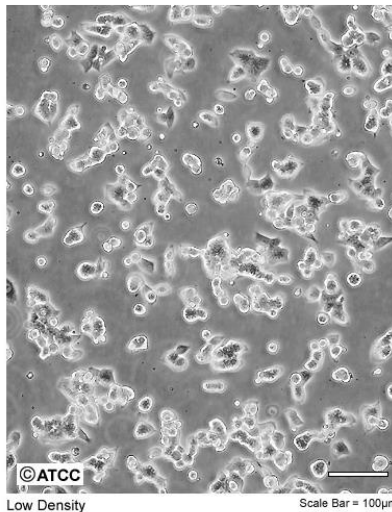
Živočišné buněčné kultury (získané z různých tkání např. hlodavců jako je myš, krysa, křeček nebo opic, člověka)

- **PRIMÁRNÍ KULTURY** – buňky získané přímo z živočišných tkání, kousek tkáně, nutná disociace (rozvolnění) buněk a odstranění nežádoucích částí, omezená doba kultivace, specifické požadavky
- **BUNĚČNÉ LINIE** – adaptované na dlouhodobý růst *in vitro*
 - **diploidní** – karyotyp identický s živočišným druhem, z něhož byly izolovány většinou omezený počet pasáží, stárnou a hynou (omezený tzv. “life-span”)
 - **heteroploidní** – karyotyp a často i morfologie odlišné, dlouhodobá kultivace. Udržují se tzv. pasážováním – určitý počet buněk se po určité době přenesou do čerstvého živného prostředí
- **ADHERENTNÍ kultury** – rostou přichyceny k pevnému podkladu (kultivační nádoby, mikronosiče)
- **SUSPENZNÍ kultury** – nevyžadují podklad, rostou volně v médiu

HLAVNÍ KOMERČNÍ DODAVATELÉ BUNĚČNÝCH LINIÍ

- ▶ The American Type Culture Collection
www.atcc.com
- ▶ The European Collection of Cell Cultures
www.ecacc.org.uk

ATCC Number: **CCL-247**
Designation: **HCT 116**



Organismus
Orgán a typ tkáně
Adherentní x neadherentní
Jaké medium a sérum
Způsob pasážování
Podrobnosti, literatura atd.

ECACC Cell Lines

Product	Product Number	Storage Conditions	Unit Size
<p>A2780 <i>Species:</i> human <i>Tissue:</i> ovary <i>Morphology:</i> epithelial <i>Subculture Methods:</i> Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:3 to 1:6 i.e. seeding at $3-6 \times 10^4$ cells/cm² using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO₂; 37 °C. <i>Medium:</i> RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamine + 10% Fetal Bovine Serum (FBS). <i>Karyotype:</i> Not specified <i>Description:</i> The A2780 human ovarian cancer cell line was established from tumor tissue from an untreated patient. Cells grow as a monolayer and in suspension in spinner cultures. A2780 is the parent line to the cisplatin resistant cell line A2780 cis (ECACC catalog no. 93112517) and the adriamycin resistant cell line A2780 ADR (ECACC catalog no. 93112520). Shipped on dry ice</p>	93112519	-196°C	1 vial
<p>A2780cis <i>Species:</i> human <i>Tissue:</i> ovary <i>Morphology:</i> epithelial <i>Subculture Methods:</i> Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:5 to 1:20 i.e. seeding at 1×10^3 to 1×10^4 cells/cm² using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO₂; 37 °C. Cells will attach slowly after resuscitation and take up to 7 days to reach confluency. Recommendation: resuscitate cells in media without cisplatin. Add after subculture of attached cells. <i>Medium:</i> RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamine + 1 µm cisplatin + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (cisplatin only necessary every 2-3 passages). <i>Karyotype:</i> Modal no. 46 <i>Description:</i> This cisplatin-resistant cell line has been developed by chronic exposure of the parent cisplatin-sensitive A2780 cell line (ECACC catalog no. 93112519) to increasing concentrations of cisplatin. A2780cis is cross-resistant to melphalan, adriamycin and irradiation. An increased ability to repair DNA damage as well as cytogenetic abnormalities has been observed. In order to retain resistance cisplatin has to be added to the media every 2-3 passages. In addition to this matched pair of drug-sensitive/resistant cell lines an adriamycin-resistant cell line, A2780adr (ECACC catalog no. 93112520), has been isolated from the same parental line A2780. Shipped on dry ice</p>	93112517	-196°C	1 vial
<p>A431 <i>Species:</i> human <i>Tissue:</i> skin <i>Morphology:</i> epithelial <i>Subculture Methods:</i> Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:3 to 1:6 i.e. seeding at $2-4 \times 10^4$ cells/cm² using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO₂; 37 °C. <i>Medium:</i> EMEM (EBSS) + 2 mM L-Glutamine + 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS). <i>Karyotype:</i> Hypertriploid <i>Description:</i> Derived from an 85 year old female with epidermal carcinoma. The cells carry large numbers of EGF binding sites and is an indicator cell for anti-TGF binding. Shipped on dry ice</p>	85090402	-196°C	1 vial

KULTIVACE BUNĚK

- ▶ **Speciální plastické lahvičky, misky různé velikosti** – sterilní
Kultivace v živném médiu podle růstových a metabolických požadavků buněk v termostatu s řízenou atmosférou – 37 °C, 95 % vlhkost, 5 % CO₂.
Nutná přísná sterilita!!!! – sterilní roztoky, plastik. nádoby, sklo, pipety atd., sterilizace autoklávem (120 °C), nebo horkým vzduchem (180 °C)
Práce ve **sterilním laminárním boxu** (typ BioHazard – laminární proudění vzduchu, filtry – chrání i uživatele – práce s nebezpečnými viry apod.)
- ▶ **Základní médium** je balancované chemické prostředí – zdroj pro energii a biosyntézu.
- ▶ **Doplňky:**
 - a) **nedefinované složky** – zvířecí séra (hovězí, telecí, fetální, koňské)
 - b) **definované složky** (růstové faktory, hormony atd.) – specializované podle typu buněk
- ▶ **Živočišná séra**
nejdražší součást média – ze zvířat z ekologicky málo poškozených oblastí vhodné definované náhrady sér
- ▶ **Antibiotika a antimykotika**
penicilin + streptomycin, gentamicin (i proti mykoplazmatům)

ZPŮSOB KULTIVACE

Suspenzní buňky – po spočítání buněk se část supenze doplní čerstvým kultivačním médiem

Adherentní (přisedlé) buňky – uvolnění od podkladu a rozvolnění shluků enzymy např. trypsinem, spočítání buněk, vysetí do čerstvého média.

Některé buňky vyžadují tzv. „feeder layer“ – vrstvu buněk inaktivovaných zářením nebo chemicky sloužící jako podklad pro růst specifických typů buněk

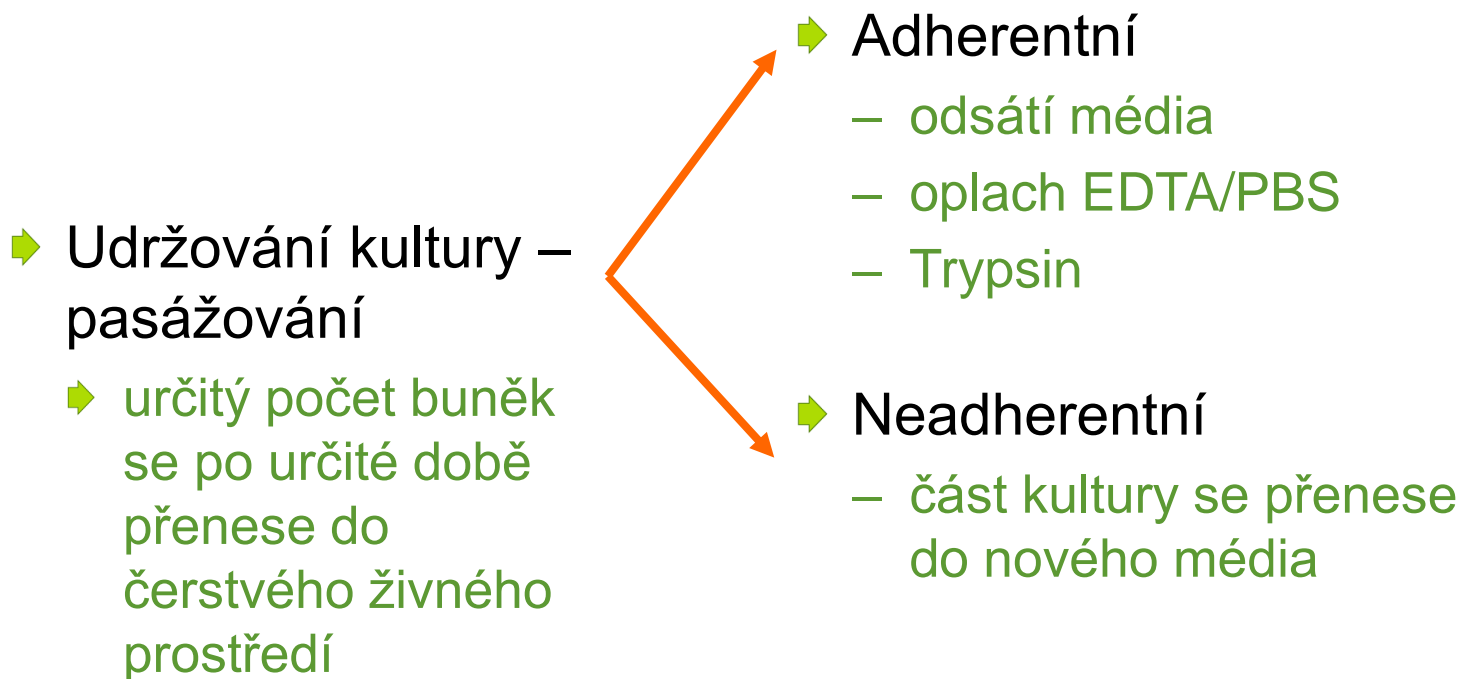
Kultivace ve sterilních plastických lahvičkách se šroubovacími uzávěry nebo v miskách různé velikosti – otevřený systém v atmosféře 5 % CO₂.

Velkokapacitní kultivace – na mikročasticích ve velkých kontejnerech – automatická výměna média

Uchování buněk v hlubokozmrazeném stavu (-180 °C – mraznice, tekutý dusík) ve speciálních ampulích a kontejnerech několik let. Nutné kryoprotektivum (proti tvorbě krystalů vody) – většinou dimetylsulfoxid nebo glycerol.

Zmrazování je pomalé (řízené po 1 °C), rozmrazování rychlé – ponoření ampulí do lázně 37 °C.

KULTIVACE BUNĚK

- ▶ Udržování kultury – pasážování
 - ▶ určitý počet buněk se po určité době přenese do čerstvého živného prostředí
 - ▶ Adherentní
 - odsátí média
 - oplach EDTA/PBS
 - Trypsin
 - ▶ Neadherentní
 - část kultury se přenese do nového média
- 

VYUŽITÍ BUNĚČNÝCH KULTUR

- **Buněčné kultury** se staly nástrojem pro detekci a objasňování mechanismů účinků buněčných regulátorů a genů, které určují individuální aspekty chování buněk.
- Tato **technologie umožnila pokrok** ve virologii, somatické buněčné genetice, endokrinologii, toxikologii, farmakologii, hematologii, imunologii i ve výzkumu karcinogeneze a stala se významným nástrojem vývojové biologie, komplexní tkáňové fyziologie a průmyslové výroby specifických buněčných produktů.

Výhody

- lze sledovat účinky různých faktorů a mechanismy studovaných dějů bez nežádoucí interakce s buňkami jiných typů nebo tkání, účinku humorálních faktorů i celkového stavu organismu
- lze získat rozsáhlé populace buněk shodných vlastností a sledovat jejich reakce v kontrolovatelných podmínkách
- homogenita, reprodukovatelnost a množství materiálu umožňuje studovat a odhalovat základní mechanismy vybraných aspektů chování těchto buněk
- specifické buněčné kultury lze využít k produkci a získávání množství důležitých biologických látek (enzymy, hormony) – hybridomy
- etické hledisko – systém omezuje využívání laboratorních zvířat

Nevýhody

- umělý zjednodušený systém
- poznatky nelze beze zbytku aplikovat na podmínky *in vivo*

Buňky nezralé (nediferencované nebo částečně diferencované)

- ▶ buňky kmenové (toti- nebo pluripotentní)
- ▶ buňky progenitorové

Jsou schopny sebeobnovy, mohou se dále dělit a diferencovat do zralějších stádií.

Charakteristické pro embryonální stadium a v dospělém organismu pro některé tkáně (krevní tkáň, střevní a kožní epitel, zárodečné buňky).

Schopné kultivace a dozrávání *in vitro* ve specifických podmínkách.

Buňky zralé – diferencované

Rozrůzněné podle typu tkáně se specifickými vlastnostmi. Nejsou schopny se dále dělit, stárnou a umírají apoptózou (nervové, jaterní buňky apod.)

Schopné kultivace *in vitro* omezený počet pasáží (diploidní stav) nebo se z nich vytvářejí heteroploidní permanentní linie.

BUNĚČNÉ POPULACE *IN VITRO*

Imortalizované

- ▶ z normální tkáně i nádorové linie

asynchronní

- ▶ buňky se nacházejí v různých fázích buněčného cyklu – přirozený stav

synchronní

- ▶ buňky jsou ve stejné fázi buněčného cyklu – uměle navozené různými chemickými látkami, homogenní populace, stejné reakce
- ▶ Využití zejména při výzkumu dějů vázaných na určitou fázi buněčného cyklu nebo v praxi v nádorové terapii (léčba cytostatiky)

EPITELIÁLNÍ BUŇKY

z lidské tkáně kolonu

- línie HT29, CaCO₂, HCT116 – nádorové buňky , FHC – fetální střevo, NCM460 – nenádorové.
- Schopnost diferencovat *in vitro* po působení butyrátu sodného (NaBt):
 - růst aktivity alkalické fosfatázy
 - morfologické změny doprovázené polymerizací F-aktinu
 - zvýšení exprese adhezivních molekul – E-kadherinu

Vhodný model

- pro studium regulace proliferace, diferenciace a apoptózy epitelu střeva a mechanismů vzniku nádorů kolonu, působení lipidových složek výživy a environmentálních polutantů

z lidské tkáně prostaty – nádorové i nenádorové linie

- pro studium účinků cytokinů a nádorového mikroprostředí

SŘEVNÍ EPITEL – PŘECHOD ADENOM X KARCINOM

Buněčné linie

normální epitel
NCM460

fetální colon
FHC

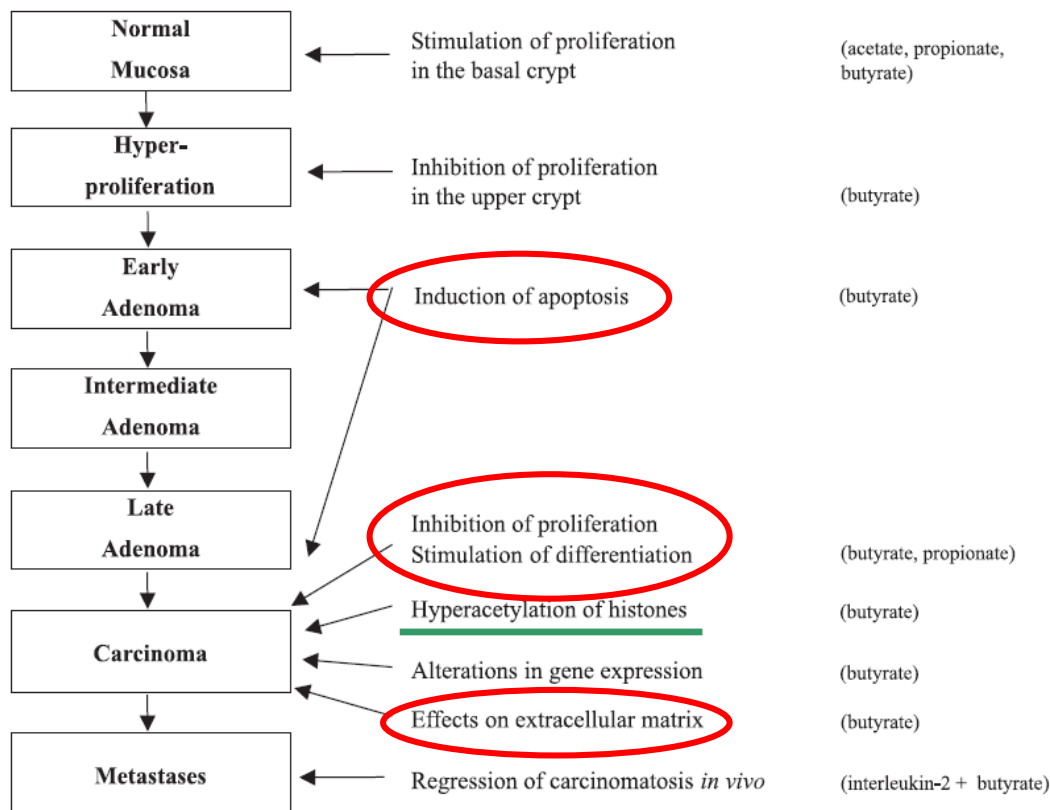
adenom
AA/C1
RG/C2

adenocarcinom
HT-29
DLD-1
HCT-116
SW480

lymfatická
metastáza
SW-620

**Karcinogenní
potenciál**

Účinky butyrátu



Pro ekotoxikologické studie jsou vhodné

- **jaterní buňky:** primární hepatocyty (kryší), linie nádorových buněk hepatomu (lidského nebo hlodavců), kryší jaterní fibroblasty
- **plicní buňky:** normální i transformované

Geneticky modifikované buněčné linie

Linie transfekované různými zkoumanými geny nebo je postrádající („knock-out“)

„Luciferase assay“

vnesený gen s luciferázou – intenzita světla odráží aktivaci příslušných vnitrobuněčných receptorů

Pro detekci dioxinové aktivity (AhR), estrogenní aktivity (ER) či aktivace PPAR (peroxisome proliferator – activated receptors) studovaných látek

Intenzita světla měřena na **luminometru**.

VYBAVENÍ LABORATOŘE PRO KULTIVACE BUNĚK

- **Sterilní prostředí** – speciální plastik, sklo, pipety (skleněné, automatické – různé objemy)
autokláv, horkovzdušná sterilizace (130 °C)
- Klimatizace, UV světlo
- **Destilační přístroj** na superčistou vodu
- **Laminární box** (Biohazard) – laminární proudění vzduchu, filtry – sterilní prostředí pro práci, ochrana při práci
- **Inkubátor** – 37 °C, 5 % CO₂, 95 % vlhkost
- **Počítač částic** (buněk)
- **Inverzní mikroskop**
- **Centrifugy**

- ELISA reader
- Cytocentrifuga
- Fluorescenční mikroskop
- Vysokoobrátková chlazená centrifuga (výměnné rotory)
- Průtokový cytometr, sorter
- Několik laserů, stanovení několika parametrů současně u rozsáhlých buněčných populace, sortování populací
- **Fluostar** – multifunkční přístroj – spektrofotometr, fluorimetr, chemiluminometr
- Zařízení pro molekulární biologii
- Výkonná výpočetní technika

„Core facilities“ (Laboratoř molekulární biofyziky)

FACS Aria Sorp (BD) – vysokorychlostní buněčný sorter

Unikátní konfokální mikroskop Leica s vysokým rozlišením

MÉDIA

Řada druhů podle typu buněk (Eaglovo, Dulbecco, RPMI-1640), dodávají se kompletní tekutá, koncentráty, prášková – skladování 40 °C.

Nutná **kvalitní apyrogenní voda** o vodivosti 0,2-0-1 μS a chemikálie nejvyšší čistoty. Nutná **sterilizace** přes filtr 0,2 μm .

Základní složky

- ▶ **Glukóza (nebo galaktóza) a glutamin** – zdroj energie a uhlíku
- ▶ **Aminokyseliny** – zdroj energie a dusíku
- ▶ **Vitamíny** – kofaktory pro enzymatické reakce
- ▶ **Lipidy** – esenciální mastné kyseliny, cholesterol, etanolamin apod.
- ▶ **Anorganické soli** – zajišťují osmolalitu, tlumí aciditu, nutriční faktor
- ▶ **Pufrační solné směsi** – Earlov roztok (fyziolog. roztok s vysokým obsahem NaHCO_3) – **kultivace v řízené atmosféře s regulovaným obsahem 5 % CO_2** zabraňuje rozpadu a alkalizaci média.
- ▶ **Požadované pH** většinou 7,2–7,4 – úprava HCl a NaOH
- ▶ Otevřený systém – Petriho misky nebo lahvičky s povoleným uzávěrem
- ▶ Optická kontrola – indikátor fenolová červeň
- ▶ Organické pufrační systémy – HEPES 20mM

Cell Culture Media

Classic Media: Media Formulations

RPMI-1640 Medium

Component	R 0883 [1x] g/L	R 1145 [10x] g/L	R 1383 g/L	R 6504 g/L	R 8758 [1x] g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Nitrate • 4H ₂ O	0.1	1.0	0.1	0.1	0.1
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.04884	0.04884	0.04884	0.04884	0.04884
Potassium Chloride	0.4	4.0	0.4	0.4	0.4
Sodium Bicarbonate	2.0	—	6.0	—	2.0
Sodium Chloride	6.0	60.0	6.8	6.0	6.0
Sodium Phosphate Dibasic (anhydrous)	0.8	8.0	0.8	0.8	0.8
AMINO ACIDS					
L-Arginine	0.2	2.0	0.2	0.2	0.2
L-Asparagine (anhydrous)	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
L-Aspartic Acid	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Cystine • 2HCl	0.0652	0.652	0.0652	0.0652	0.0652
L-Glutamic Acid	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Glutamine	—	—	0.3	0.3	0.3
Glycine	0.01	0.1	0.01	0.01	0.01
L-Histidine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015
Hydroxy-L-Proline	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Isoleucine	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
L-Leucine	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
L-Lysine • HCl	0.04	0.4	0.04	0.04	0.04
L-Methionine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015
L-Phenylalanine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015
L-Proline	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Serine	0.03	0.3	0.03	0.03	0.03
L-Threonine	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Tryptophan	0.005	0.05	0.005	0.005	0.005
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.02883	0.2883	0.02883	0.02883	0.02883
L-Valine	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
VITAMINS					
D-Biotin	0.0002	0.002	0.0002	0.0002	0.0002
Choline Chloride	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Folic Acid	0.001	—	0.001	0.001	0.001
myo-Inositol	0.035	0.35	0.035	0.035	0.035
Niacinamide	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
p-Amino Benzoic Acid	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.00025	0.0025	0.00025	0.00025	0.00025
Pyridoxine • HCl	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
Riboflavin	0.0002	0.002	0.0002	0.0002	0.0002
Thiamine • HCl	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
Vitamin B ₁₂	0.000005	0.00005	0.000005	0.000005	0.000005
OTHER					
D-Glucose	2.0	20.0	—	2.0	2.0
Glutathione (reduced)	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
Phenol Red • Na	0.0053	0.053	0.0053	0.0053	0.0053
ADD					
L-Glutamine	0.3	0.3 at 1x	—	—	—
Sodium Bicarbonate	—	2.0 at 1x	2.0	2.0	—

Cell Culture Media

Classic Media: Media Formulations

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)

Component	D 5523 g/L	D 5546 [1x] g/L	D 5648 g/L	D 5671 [1x] g/L	D 5796 [1x] g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Chloride • 2H ₂ O	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767
Potassium Chloride	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Sodium Bicarbonate	—	—	3.7	—	3.7
Sodium Chloride	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	—	0.109	0.109	0.109	0.109
AMINO ACIDS					
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	0.084	0.084	0.084
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	0.0626	0.0626	0.0626
L-Glutamine	0.584	0.584	—	0.584	0.584
Glycine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042
L-Isoleucine	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105
L-Leucine	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146
L-Methionine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
L-Phenylalanine	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066
L-Serine	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042
L-Threonine	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095
L-Tryptophan	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379	0.10379	0.10379	0.10379	0.10379
L-Valine	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094
VITAMINS					
Choline Chloride	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Folic Acid	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
myo-Inositol	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072
Niacinamide	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Pyridoxal • HCl	0.004	0.004	—	0.004	—
Pyridoxine • HCl	—	—	0.004	—	0.004
Riboflavin	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004
Thiamine • HCl	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
OTHER					
D-Glucose	4.5	1.0	1.0	4.5	4.5
Phenol Red • Na	0.0159	0.0159	0.0159	0.0159	0.0159
Pyruvic Acid • Na	—	0.11	0.11	—	—
ADD					
L-Glutamine	—	—	0.584	—	—
Sodium Bicarbonate	3.7	3.7	—	3.7	—
Sodium Phosphate	0.109	—	—	—	—

Nejčastěji používané fetální bovinní (telecí) sérum (certifikát)

Animal Sera

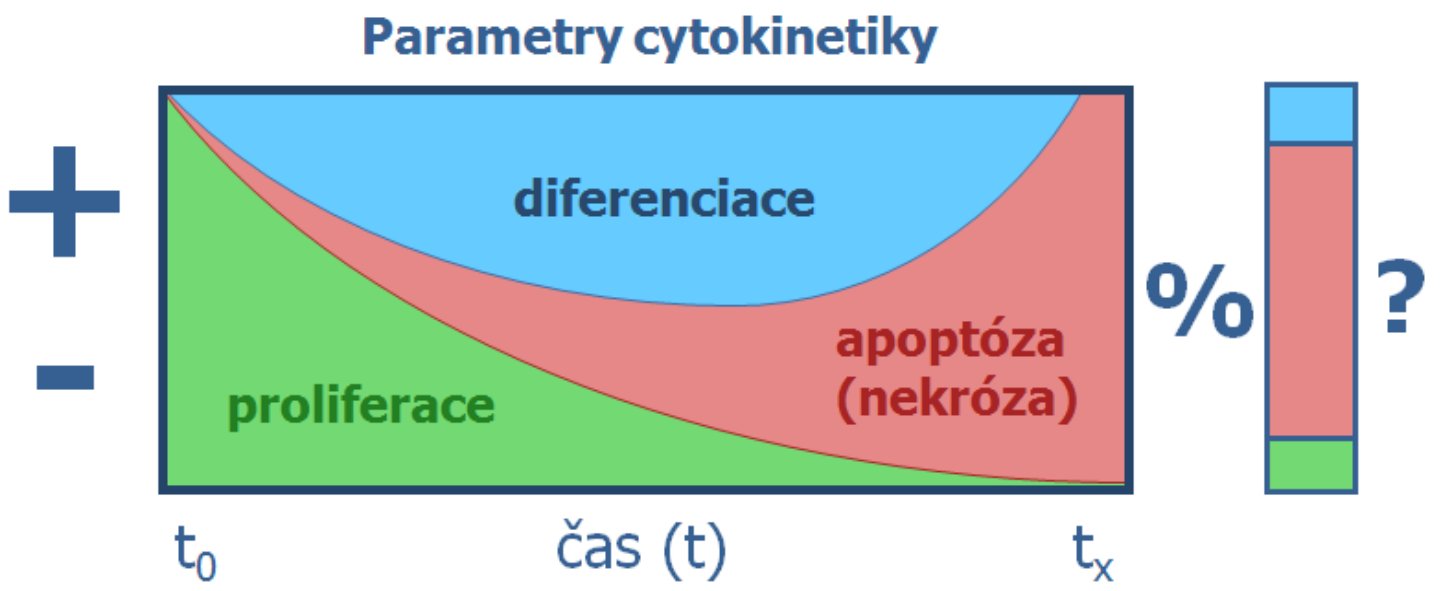
Product Testing for Fetal Bovine Sera

	F 2442	F 0643	F 3885	F 4135	F 3018	F 0392
SOURCE	bovine	bovine	bovine	bovine	bovine	bovine
COUNTRY	USA	USA	USA	USA	USA	USA
STERILITY	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PERFORMANCE	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CLONING ASSAY	✓	✓	✓	✓	✓	✓
VIRUS (raw material)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MYCOPLASMA	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BACTERIOPHAGE	✓	N/A	✓	✓	N/A	N/A
ENDOTOXIN (EU/ml)	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10
HEMOGLOBIN (mg %)	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20
TOTAL PROTEIN (g %)	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5
ELECTROPHORECTIC PATTERN	✓	✓	✓	✓	✓	✓
IgG	✓	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
HORMONE TESTING	Report result	N/A	Report result	Report result	N/A	N/A
pH at RT	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0
OSMOLALITY (mOsm/Kg H ₂ O)	260-340	260-340	260-340	260-340	260-340	260-340
CHEMICAL ANALYSIS	✓	N/A	✓	✓	N/A	N/A

✓ — Indicates testing is performed and product meets specification.

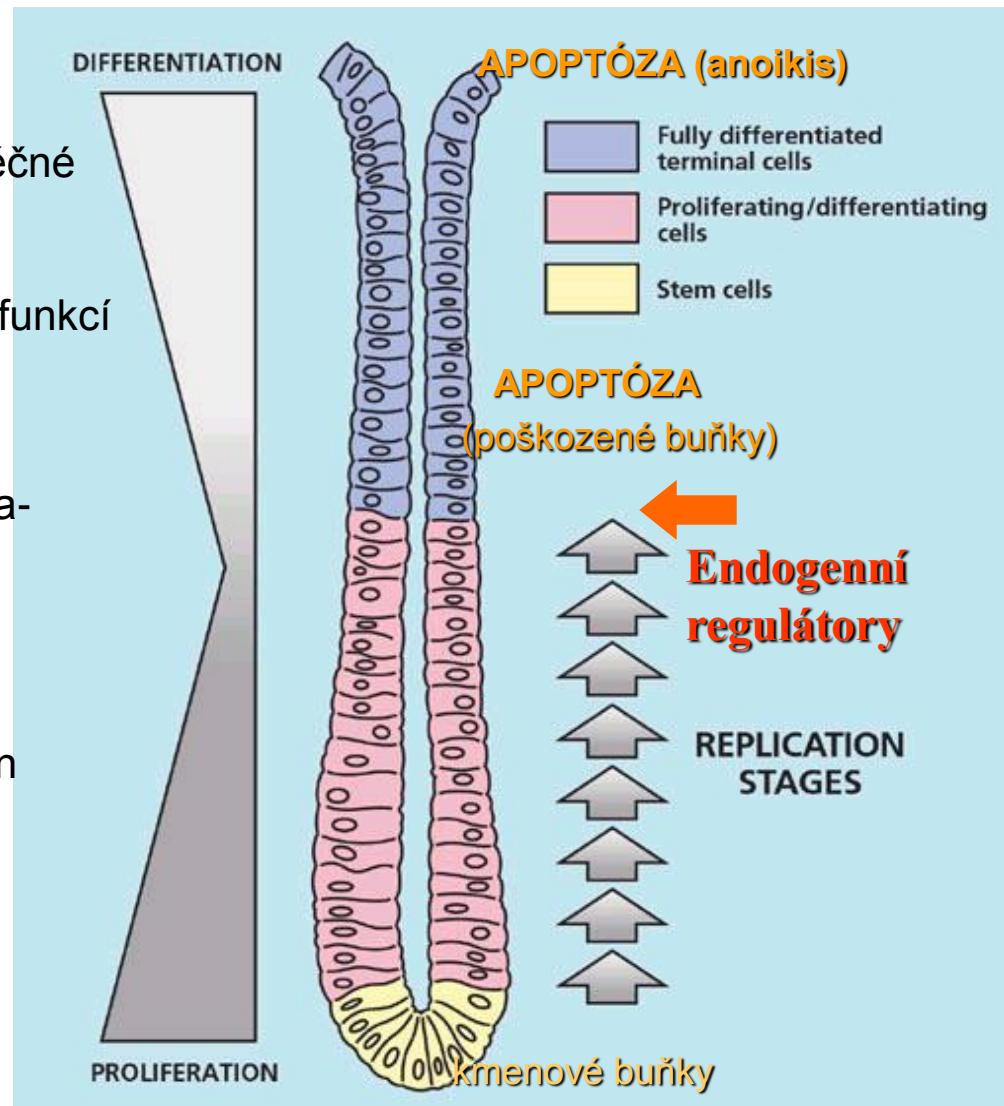
Metodologické přístupy

CYTOKINETIKA – chování buněk v čase



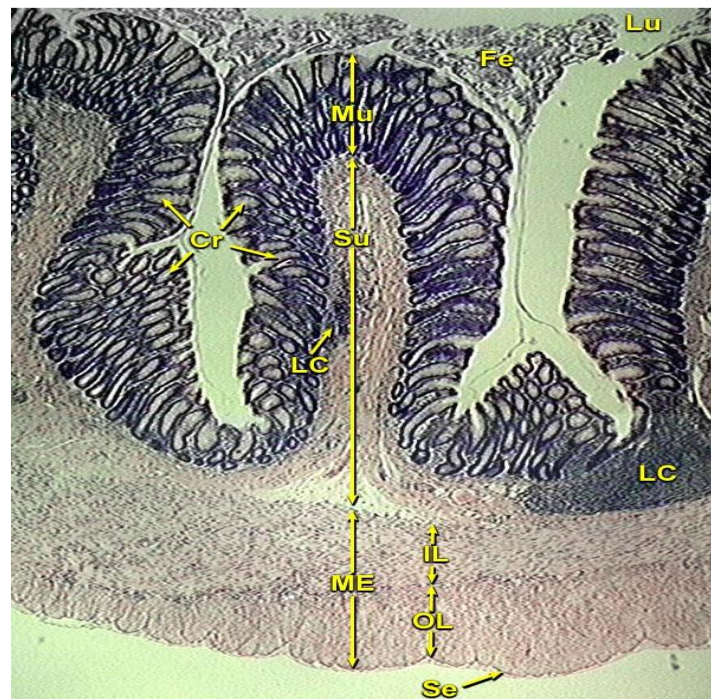
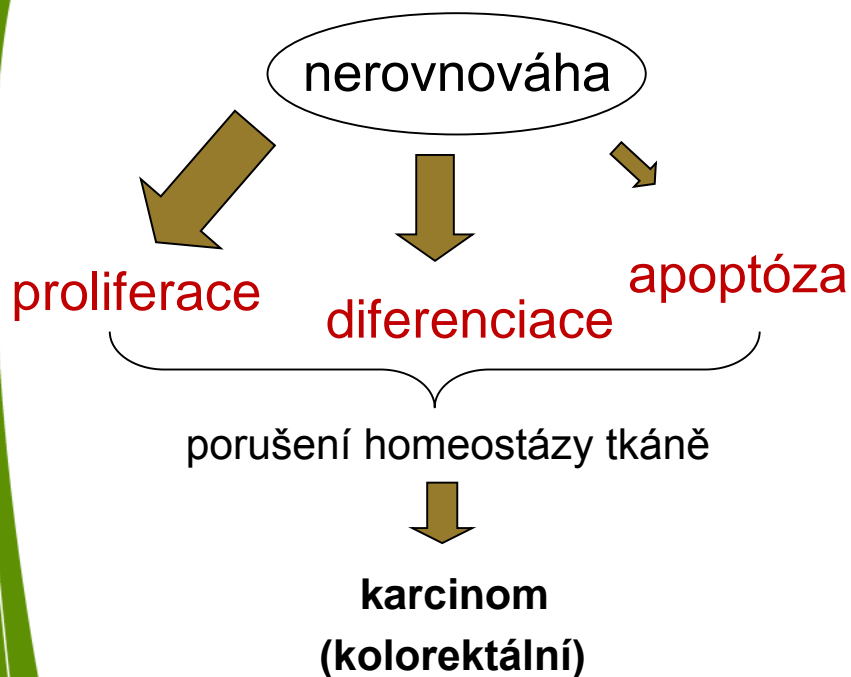
EPITEL TLUSTÉHO STŘEVA (KOLONU)

- ◆ kontinuálně se obnovující buněčné populace
- ◆ řada zásadních fyziologických funkcí
- ◆ dynamická rovnováha mezi přírůstkem buněk na bázi krypty (proliferace) a úbytkem (apoptóza-anoikis) na povrchu
- ◆ regulace endogenními faktory (hormony a cytokiny), ale rovněž složkami diety přítomnými v lumen střeva



NÁDOR TLUSTÉHO STŘEVA

- druhým nejčastějším nádorem u mužů hned po nádoru plic a u žen po nádoru prsu
- ČR – vysoká incidence, přední ve statistikách, alarmující růst



<http://cellbio.utmb.edu/microanatomy/digestive/Intestine.htm>

rozvoj nádorů kolonu - vlivy genetické

- vlivy zevního prostředí (genotoxická činidla
a negenotoxické promotory)

DETEKCE PROLIFERAČNÍ AKTIVITY BUNĚK

Růst buněk

- ▶ počty buněk (Coulter Counter, Casy, Bürkerova komůrka) v časových intervalech od vyšetří určitého počtu buněk – růstové křivky
- ▶ spektrofotometrické stanovení celkových proteinů – Amido black
- ▶ doba zdvojení populace (doubling time),
- ▶ generační doba (trvání buněčného cyklu)

Metabolicky aktivní část populace

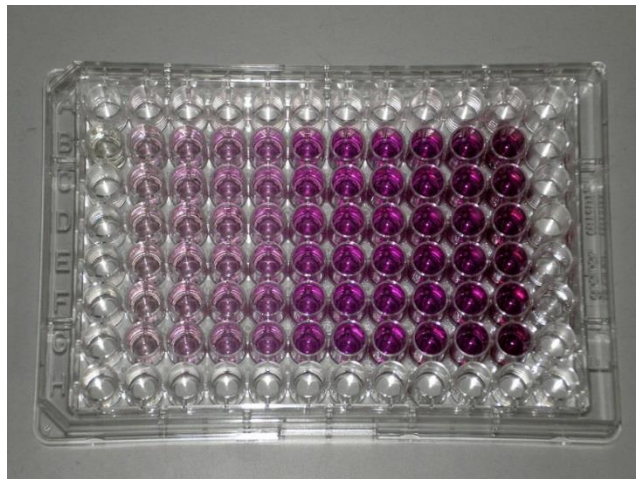
- ▶ izotopové metody - stanovení podílu populace syntetizující DNA – inkorporace ³H-tymidinu do DNA – detekce hladiny radioaktivity autoradiograficky nebo scintilačně – detektor β záření
- ▶ spektrofotometrické metody – inkorporace bromdeoxyuridinu (BrdU) – detekce pomocí navázané protilátky – ELISA reader nebo průtoková cytometrie (FCM)
- ▶ metoda redukce MTT na formazan – založeno na aktivitě mitochondrií

Stanovení mitotického indexu

- ▶ mikroskopické stanovení podílu buněk v mitóze na řezech z tkání či buněčných preparátech

TESTY CYTOTOXICITY – KOLORIMETRICKÉ METODY

- ▶ **MTT** (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylyltetrazolium bromid) **test**
Žluté MTT se mitochondriálními enzymy dýchacího řetězce redukuje na fialový formazanový derivát, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných granulí. Po přidání detergentu (lauroylsírán sodný, SDS) a okyselení se barvivo z buněk uvolní a rozpustí, takže vznikne roztok k **fotometrickému stanovení**.



- ▶ **Stanovení viability** – vitální barvení trypanovou modří nebo eosinem, propidium jodid (flow cytometrie) – mrtvé buňky nejsou schopny vyloučit barvivo a zůstávají obarvené – % živých buněk – viabilita

Dávkové závislosti přežití buněk (detekce IC50)

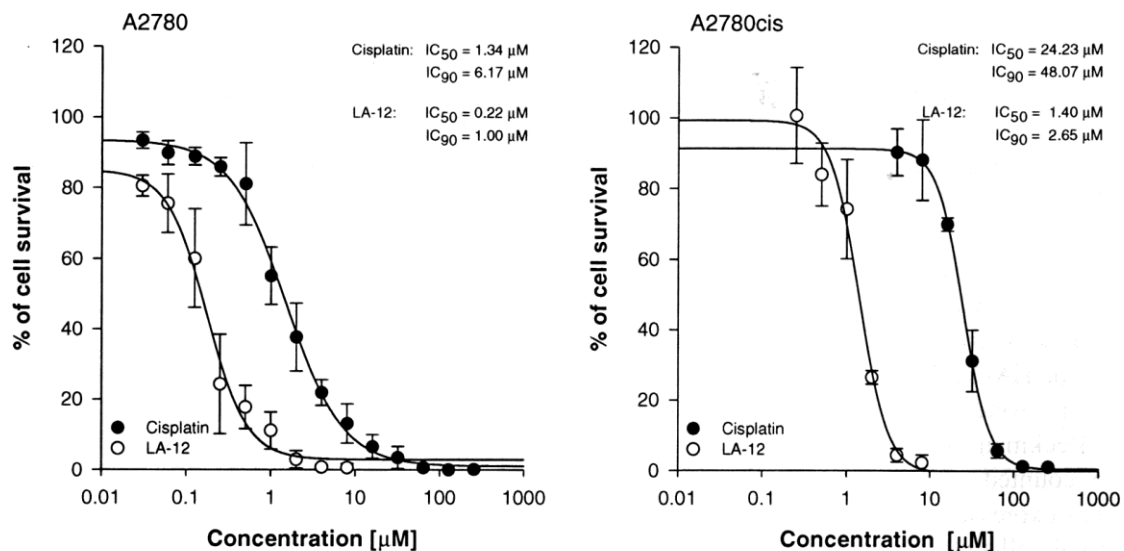
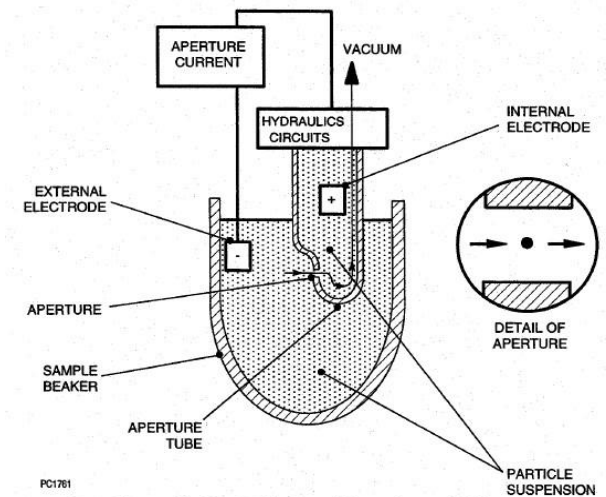


Fig. 2. Time- and dose-response effects on the survival of A2780 and A2780cis cancer cell lines. The effects after 72 h exposure to cisplatin or LA-12 in a concentration range between 0.3 μM and 256 μM were determined by MTT assay. The calculated drug concentrations inhibiting metabolic activity of cells by 50% (IC₅₀) and 90% (IC₉₀) are displayed for both derivatives. The results are expressed as mean \pm standard deviations (S.D.) of at least three independent experiments; all concentrations were tested in three replicates.

POČTY BUNĚK

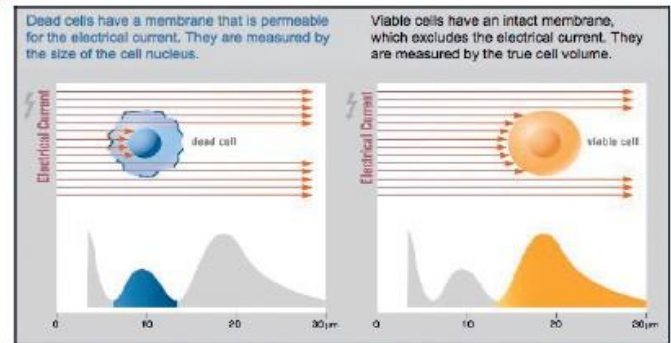
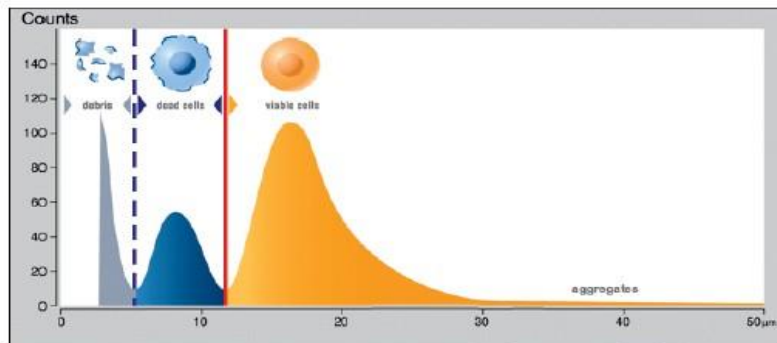
Coulter Counter

- Mezi elektrodou uvnitř trubice a zevní elektrodou protéká elektrický proud
 - Buňka procházející mezi elektrodami přeruší tok proudu a vede k změně napětí
 - Změna napětí je úměrná objemu částice
 - Změna napětí musí mít určitou prahovou hodnotu, aby byla započítána
- Suspenze buněk v elektrolytu je nasávána do trubice s malým otvorem



CASY

- Základní princip stejný jako u Coulter Counter
- Navíc analýza
 - Viability buněk
 - Objemu buněk
 - Agregátů
 - Debris – „rozbitých buněk“



Růstové křivky (počty buněk v čase)

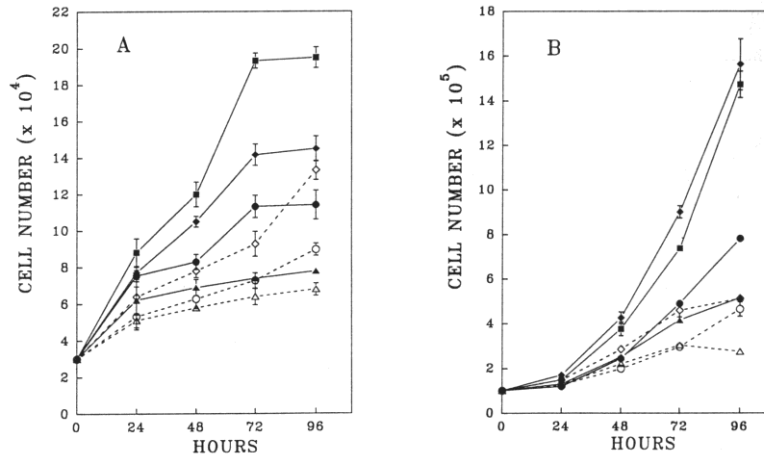


Figure 3. Growth of HS578T (A) and U937 (B) cells cultivated in the absence (diamonds) or in the presence of 50 $\mu\text{mol/l}$ PIROX (squares), 25 $\mu\text{mol/l}$ NDGA (circles) or 50 $\mu\text{mol/l}$ ESCUL (triangles). The solid lines and solid symbols represent nonirradiated cells. The dashed lines and open symbols represent cells irradiated with 5 Gy. The data are means \pm S.E.M. for three independent experiments performed in triplicates.

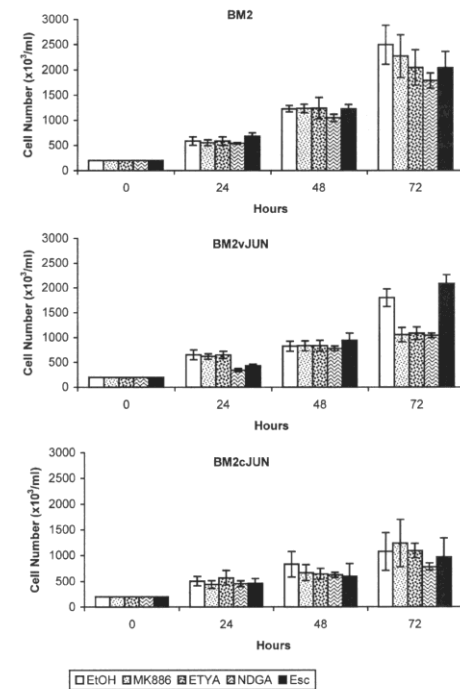


Fig. 4. Jun proteins and lipoxigenase inhibitors slow down proliferation of BM2 cells. The same number of BM2, BM2vJUN and BM2cJUN cells was seeded and treated with zinc chloride (1.5×10^{-4} M). Four hours later, lipoxigenase inhibitors MK886, ETYA, NDGA and esculetin (Esc) ($5 \mu\text{M}$) were added to cultivation media for indicated time. Total cell number was determined using cell counter. Columns represent the average values from three to six independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

Koncentrační (dávkové) závislosti

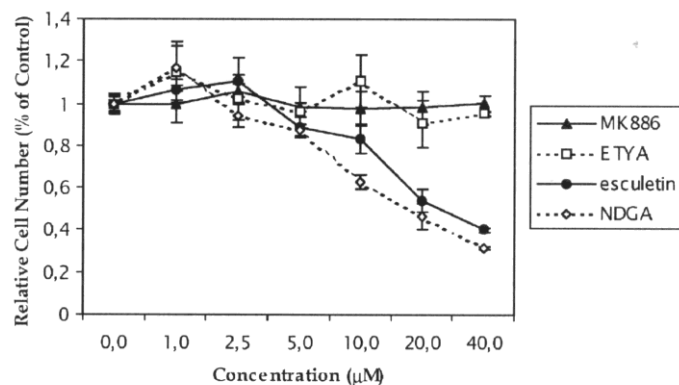


Fig. 1. Esculetin and NDGA negatively regulate growth of BM2 cells. The cells were cultivated in the presence of lipoxygenase inhibitors or ethanol solvent in indicated concentrations for 3 days. Total cell number in each sample was determined using cell counter. The curves represent the average numbers from three independent experiments. Error bars indicate standard deviations. BM2 cells treated with the amount of ethanol solvent corresponding to 40 µM concentration of inhibitor were used as a reference sample.

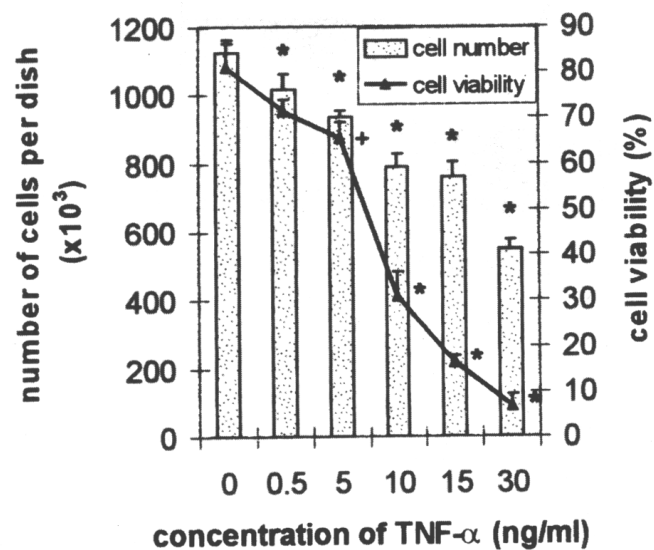
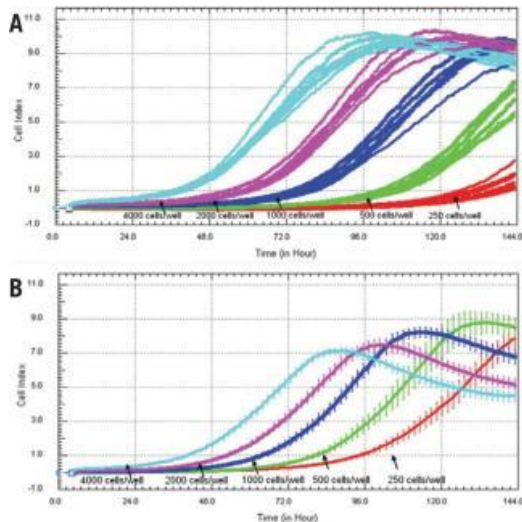


Figure 1. Growth and viability of HT-29 cells after 120-hour-treatment with TNF- α . $P < 0.05$ versus untreated control; (*) Tukey or (+) LSD test.

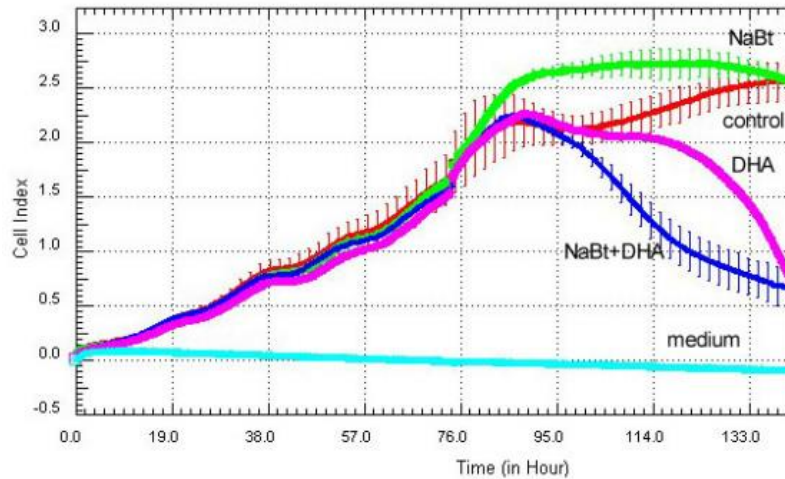
xCELLigence System (Roche) Real-Time CellAnalyzer

- Speciální destičky s mikroelektrodami – zaznamenávají se změny impedance
- Měří tzv. **cell index (CI)** v reálném čase
- (odráží změny v růstu, adhezi, morfologii buněk)

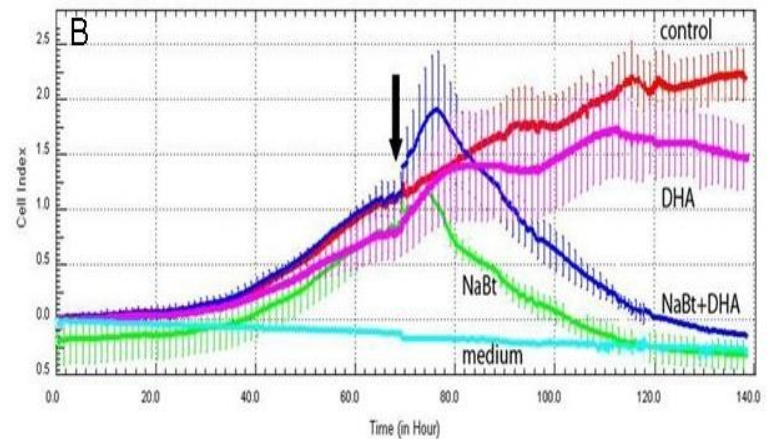


Cell index po působení mastných kyselin (DHA, NaBt) a jejich kombinace

Linie FHC (lidské fetální střevo)



Linie HCT-116 (adenokarcinom střeva)



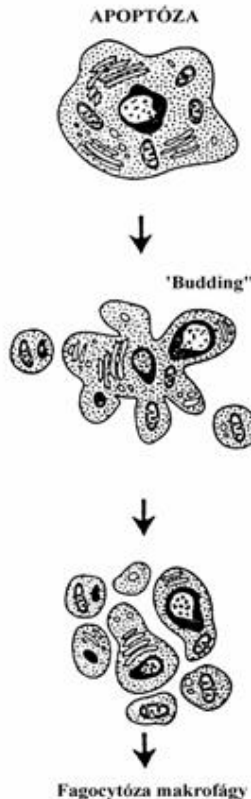
DETEKCE BUNĚČNÉ SMRTI

apoptózy/nekrózy/autofagie

- Morfologicky – světelný mikroskop
- **Fluorescenční mikroskop**
- Průtoková (flow) cytometrie
(TUNEL- barvení konců fragmentů DNA, AnnexinV, subG0/G1 populace)
- Stanovení specifických markerů (proteinů, mRNA) těchto procesů (western blotting, RT-PCR)

STANOVENÍ APOPTÓZY

více metod principiálně odlišných



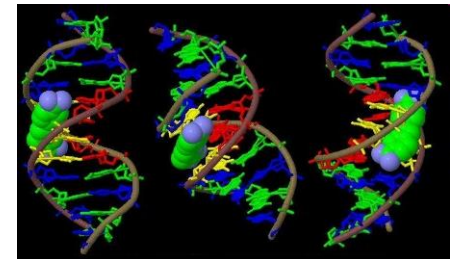
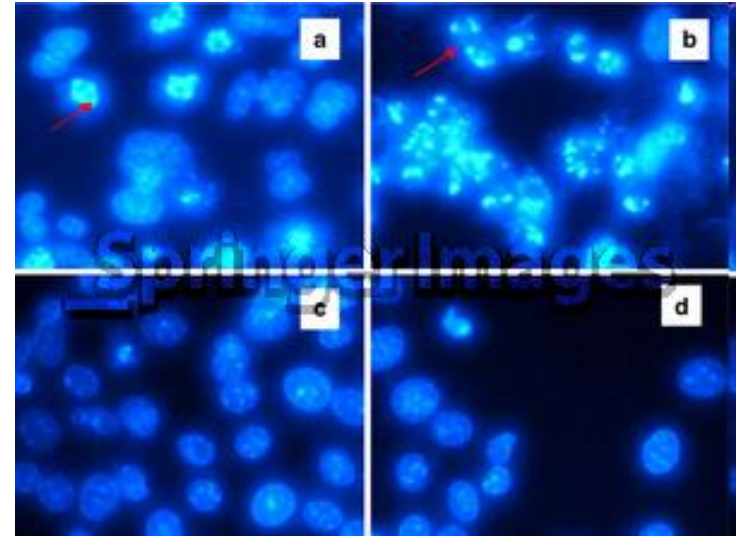
- ▶ Aktivace kaspáz
- ▶ Kondenzace buňky a organel
- ▶ Kondenzace chromatinu
- ▶ Ztráta asymetrie buněčné membrány
- ▶ Zachování integrity buněčné membrány
- ▶ Tvorba „bodies“ a jejich fagocytóza okolními buňkami

Stanovení apoptózy na různých úrovních procesu... (aktivace kaspáz, uvolnění cytochromu c, štěpení cílových proteinů, DNA)

MORFOLOGICKÁ DETEKCE APOPTÓZY

barvení DAPI

- ▶ Během apoptózy – fragmentace DNA ~ 200 PB
- ▶ **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole) prochází neporušenou cytoplazmatickou membránou
- ▶ DAPI se vmezeřuje do DNA – typické „rosety“ pod fluorescenčním mikroskopem – **apoptická tělíska**
- ▶ Absorpční maximum ~358 nm (ultrafialová)
- ▶ Emisní maximum ~461 nm (modrá)



http://springerimages.com/Images/Biomedicine/1-10.1007_s13277-010-0036-6-3

http://cytoquant.com/mediac/450_0/media/8cda7dca66452e40ffff84f0ac144225.JPG

DIFERENCIACE

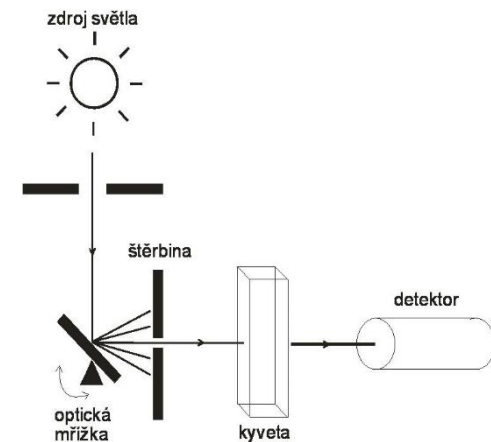
- Rozrůznění buněk do odlišných typů (při vývoji, v dospělosti v některých tkáních – krevní, epiteliální)

Při diferenciaci

- se mění morfologie buněk
- stoupá aktivita specifických enzymů (např. alkalické fosfatázy)
- stoupá exprese specifických povrchových antigenů (CD11b, CD14)
- vzniká schopnost fagocytózy a produkce kyslíkových radikálů (měření redukce NBT nebo chemiluminiscenčně)

STANOVENÍ DIFERENCIACE BUNĚK Z ADENOKARCINOMU KOLONU (LINIE HT-29)

- ▶ Buňky diferencují po působení butyrátu sodného (NaBt, 2–5 mM, 72 h).
- ▶ Morfologické změny, adheze, zvýšená exprese E-kadherinu, polymerizace F-aktinu
- ▶ Zvýšení aktivity alkalické fosfatázy
- ▶ Metoda fluorimetrického stanovení – přístroj Fluostar (spektrofotometr, fluorimetr, chemiluminometr).
- ▶ **Spektrofotometrie** = stanovování vlastností vzorku, např. koncentrace určité látky v roztoku, na základě pohlcování světla v různých vlnových délkách spektra.



APOPTÓZA

% buněk s apoptickou morfologií
(počítá se cca 200 buněk/vzorek)

DIFERENCIACE

Aktivita ALP vyjádřená v %
kontroly (=100%)

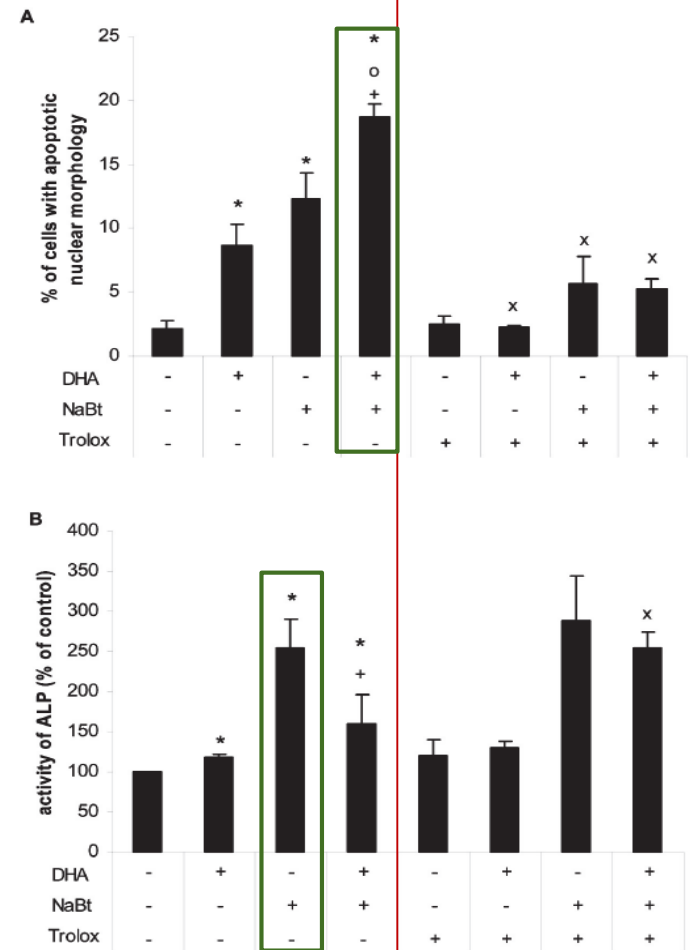


Figure 5. The effects of Trolox (100 ug/mL added 1 h before other compounds) on (A) apoptosis (% of cells with apoptotic nuclear morphology, DAPI staining) and (B) differentiation (ALP activity,% of control) of FHC cells treated 48 h with 50 μ M DHA, NaBt (3 mM) and their combination. Statistical significance: $p < 0.05$ versus control (*), versus DHA (o), versus NaBt (+), and versus the respective sample without Trolox (\times).

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

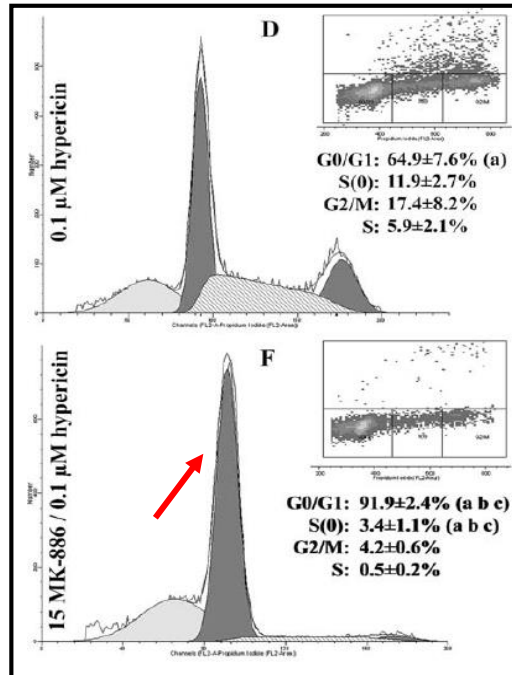


- ➔ Fluorescenční barvy s vazbou na DNA nebo monoklonální protilátky
- ➔ Excitace laserem
- ➔ Měření intenzity fluorescence

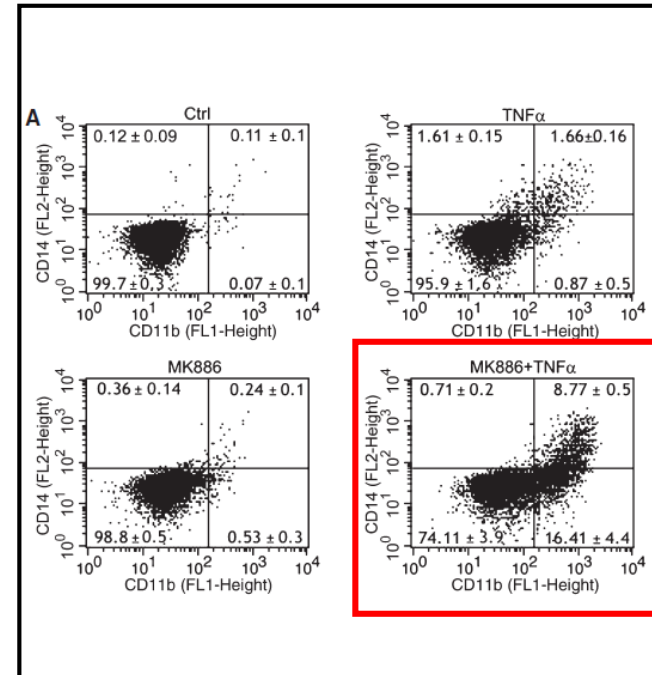
- Jedna z hlavních používaných metodologií
- Měření řady buněčných parametrů v krátkém čase u 10 tis. buněk
- FACSVerse
- FACSria – vysokorychlostní sorter rozdělí buňky dle požadovaných parametrů



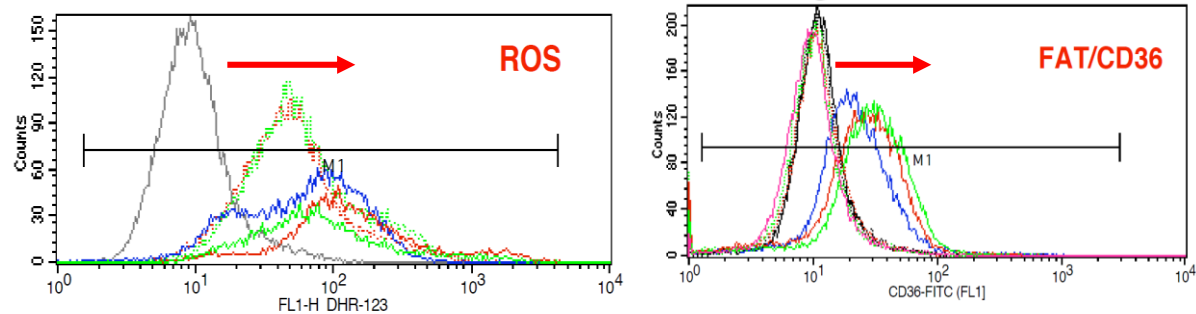
Buněčný cyklus



Expresse povrchových CD antigenů

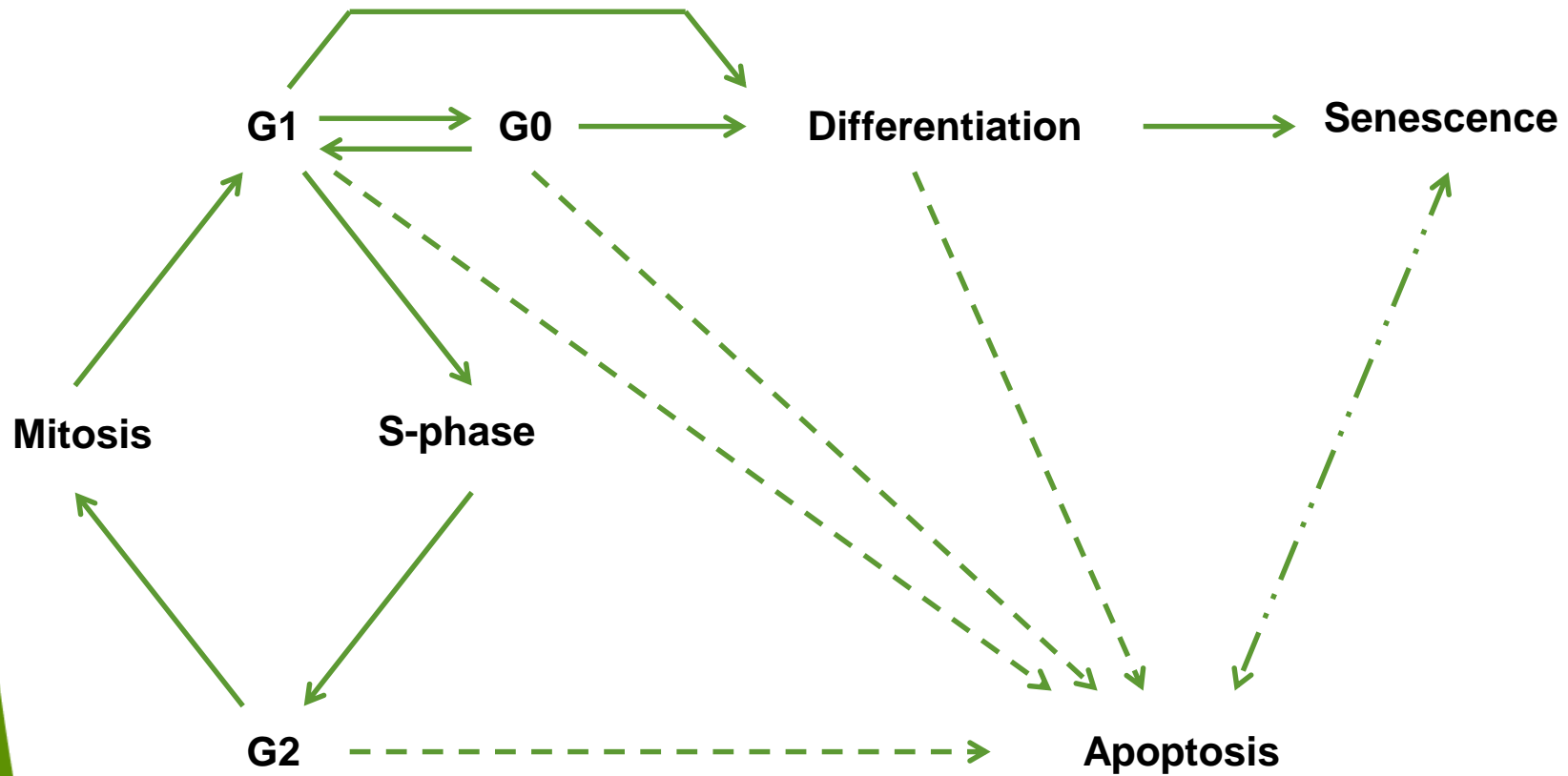


Expresse a produkce vnitrobuněčných molekul



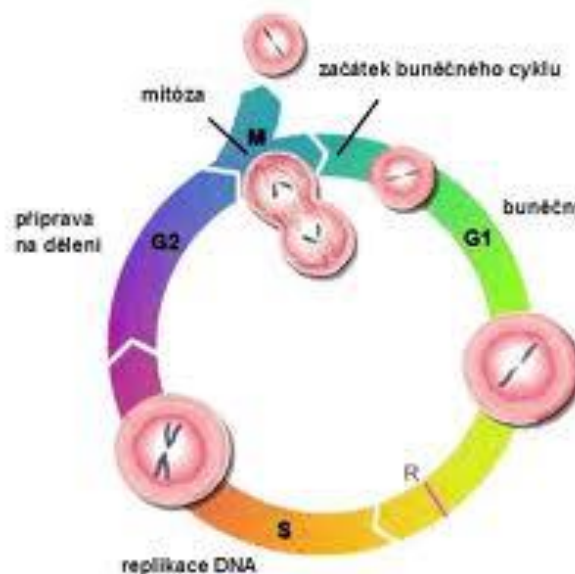
→ Intenzita fluorescence

BUNĚČNÝ CYKLUS

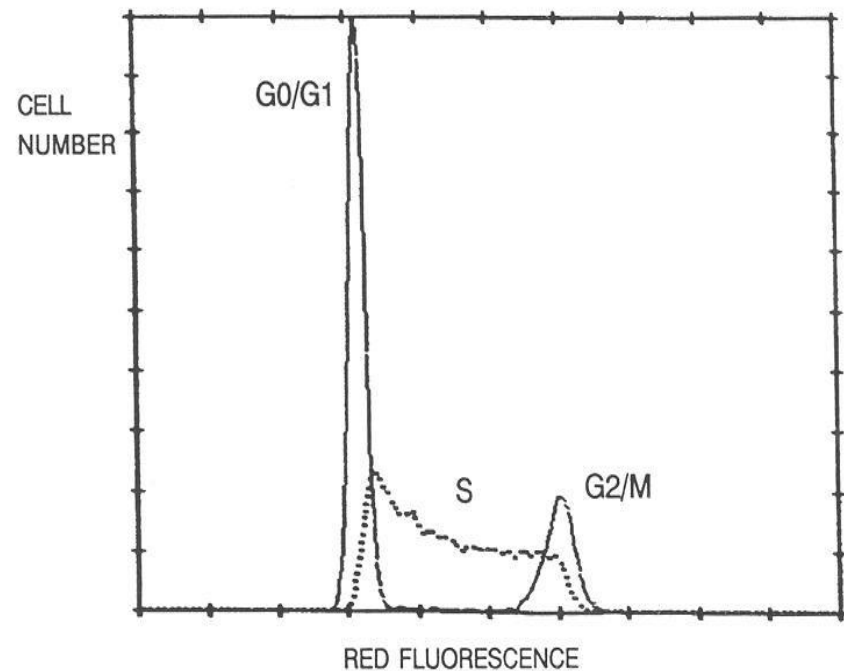


DETEKCE POČTU BUNĚK V JEDNOTLIVÝCH FÁZÍCH BUNĚČNÉHO CYKLU

- ▶ Flow cytometrie – procento buněk v G₀/G₁, S a G₂/M fázi (propidium iodid)
Stanovení délky fází buněčného cyklu – autoradiografické metody, BrDU



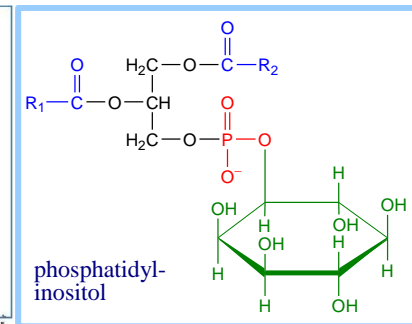
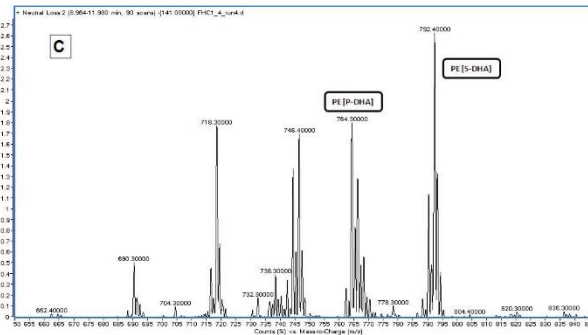
7: Analysis of DNA—general methods



Biochemické metody - LIPIDOMICKÉ ANALÝZY

(spolupráce s VÚVeL)

- obsah a spektrum jednotlivých typů mastných kyselin (MK) v celkových buněčných lipidech
- **GC-MS (gas chromatography – mass spectrometry)**
- hmotnostní profily v jednotlivých skupinách lipidů:
- fosfolipidy - PC, PS, PI, PE, SM, neutrální lipidy (cholesterol a jeho estery)
- **LC-MS-MS (high – performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry)**
- srovnání lipidomu nádorových a nenádorových buněk
- změny lipidomu po působení dietetických lipidů a jiných faktorů



DOPORUČENÁ LITERATURA:

- ▶ *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*, Eds. A. Doyle, J. B. Griffiths, D. G. Newell, Wiley&Sons Inc., London 1995 (Vol. 1 and 2)
- ▶ *Culture of human tumor cells*, Eds. R. Pfagner, R.I. Freshney, Wiley-Liss, Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2004
- ▶ *Current Protocols in Cytometry*, Ed. J. P. Robinson et al., Wiley&Sons Inc., New York 1997
- ▶ T. Eckschlager a kol.: *Průtoková cytometrie v klinické praxi*
- ▶ *The Handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, 10th edition, R. P. Haugland, Invitrogen Corp. 2005
- ▶ R. A: Bradshaw, E. A. Dennis: *Handbook of Cell Signaling* (Vol. 1, 2, 3), Elsevier Science, Academic Press 2004
- ▶ *Short Protocols in Molecular Biology* (Vol. 1, 2) John Wiley & Sons, 2002
- ▶ K. M. Debatin, S. Fulda: *Apoptosis and Cancer Therapy* (Vol. 1, 2), WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, 2006
- ▶ *Methods of Enzymology, DNA Microarrays Part A and B*, Vol. 410 and 411, Eds. J.N. Abelson, M.I. Simon, Elsevier Inc. 2006