

MODERNÍ METODY BIOLOGICKÉHO VÝZKUMU **(Speciální cvičení)**

Oddělení cytokinetiky
Oddělení patofyziologie volných radikálů
Oddělení molekulární cytologie a cytometrie

Biofyzikální ústav AV ČR

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 přenese 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 (ATCC)

<http://www.atcc.com/>

The European Collection of Cell Cultures (ECACC)

<http://www.ecacc.org.uk/>

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 $3\text{-}6 \times 10^4$ 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 cisplatinum + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (cisplatinum 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 cisplatinum 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 $2\text{-}4 \times 10^4$ 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 - 37⁰ 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)

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.

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

Uchovávání 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.

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:

Ize sledovat účinky různých faktorů a mechanismy studovaných dějů bez nežádoucí interakce s buňkami jiných typů nebo tkání, účinku humorálních faktorů i celkového stavu organismu

Ize 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 zralejších 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 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:

při výzkumu dějů vázaných na určitou fázi buněčného cyklu
v praxi v nádorové terapii (léčba cytostatiky)

KREVŇNÍ BUŇKY

primární - z krve nebo kostní dřeně člověka a laboratorních zvířat
detekce jednotlivých typů a počtů na hemocytometru
kultivace progenitorů *in vitro* - BFU-E, CFU-S, GM-CFU - vyžadují specifické podmínky a specifické růstové faktory (erythropetin, GM-CSF, IL-3 apod.)
Využití při transplantacích – namnožení buněk

permanentní linie - z krve leukemických pacientů nebo lab. zvířat
HL-60 - lidská promyelocytární leukémie - promyelocyty schopné diferencovat *in vitro* - bipotentní, deficientní v p53
kys. retinová (RA), DMSO - diferenciaci do granulocytů
vit. D3., forbol ester (TPA), butyrát - diferenciaci do monocytů-makrofágů
Vhodný model pro

- ▶ studium regulace proliferace, diferenciaci a apoptózy myeloidních buněk
- ▶ studium příčin leukemických poruch
- ▶ studium účinků kyseliny arachidonové (AA), eikosanoidů a cytokinů (TGF- β a TNF α)

Při diferenciaci

se mění morfologie buněk (mikroskopická detekce na preparátech z cytocentrifugy)

stoupá aktivita specifických enzymů (např. nescifické esterázy)

stoupá exprese specif. povrchových antigenů (CD11b, CD 14) - FCM

vzniká schopnost fagocytózy a produkce kyslíkových radikálů (měření redukce NBT nebo chemiluminiscenčně)

U937 - promonocytární leukémie - promonocyty schopné diferencovat do monocytů po RA, DMSO, TPA, mutovaný p53

ML 1 - lidská myeloidní leukémie - normální (wild type) p53

EPITELIÁLNÍ BUŇKY

z adenokarcinomu kolonu - linie HT29, CaCO2, HCT115 - nádorové buňky ,

- ▶ FHC – fetální střevo – 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 prolif., dif. a apoptózy epitelu střeva a mechanismů vzniku nádorů kolonu
- ▶ pro studium účinků nenasyc. MK a cytokinů

Pro ekotoxikologické studie jsou vhodné

- ▶ **buňky z kůže - keratinocyty** - linie HaCaT - normální buňky s aktivním metabolismem AA a citlivé k působení cytokinů
- ▶ **jaterní buňky**: primární hepatocyty (kryší), linie nádorových buněk hepatomu (lidského nebo hlodavců), kryší jaterní fibroblasty
- ▶ **geneticky modifikované buněčné linie**:

pro detekci dioxinové aktivity (H4IIELuc)

pro detekci estrogenní aktivity (MCF-7, MVLN) studovaných látek

Vnesený gen s luciferázou - intenzita odráží aktivaci příslušných vnitrobuněčných receptorů (AhR nebo ER) a je detekována na luminometru

VYBAVENÍ LABORATOŘE PRO KULTIVACE BUNĚK

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

- ▶ **ELISA reader**
- ▶ **Cytocentrifuga**
- ▶ **Fluorescenční mikroskop**
- ▶ **Vysokoobrátková chlazená centrifuga (výměnné rotory)**
- ▶ **Průtokový cytometr (FACSCalibur, Beckton Dickinson)**
lasery, 4 fluorescence, sortovací modul
stanovení několika parametrů současně u rozsáhlých
buněčných populací
- ▶ **Fluostar** – multifunkční přístroj – spektrofotometr, fluorimetr,
chemiluminometr
- ▶ **Zařízení pro molekulární biologii**
- ▶ **Výkonná výpočetní technika**

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 uzávěren

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	—	—	—	—

— Add (sodium)

nejčastěji používané fetální bovinní sérum

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.



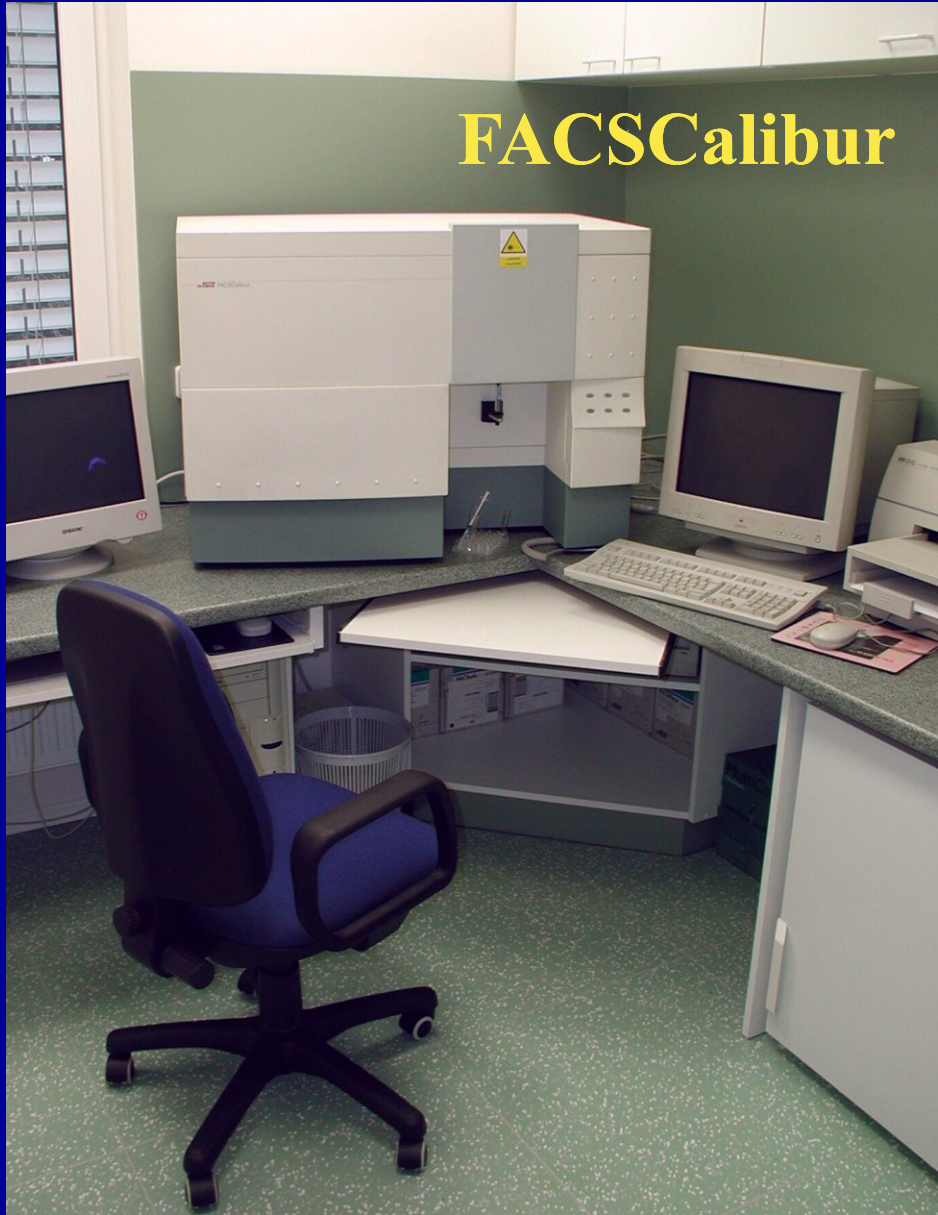
**Laboratoř
cytokinetiky**

Biofyzikální ústav AVČR, BRNO





FACSCalibur



**Průtoková
(flow) cytometrie:**

**jedna z hlavních
používaných
metodologií**

**Laboratory
of Cytokinetics**

**Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic**



DETEKCE PROLIFERAČNÍ AKTIVITY BUNĚK

Růst buněk

počty buněk (Bürkerova komůrka, Coulter Counter) v časových intervalech od vysetí určitého počtu - 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 - 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

Detekce počtu buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu

Flow cytometrie - procento buněk v G0/G1, S a G2/M fázi

Stanovení délky fází buněčného cyklu - autoradiografické metody, BrDU

Testy cytotoxicity

MTT test

Stanovení viability - vitální barvení trypanovou modří nebo eosinem

Detekce apoptózy/nekrózy

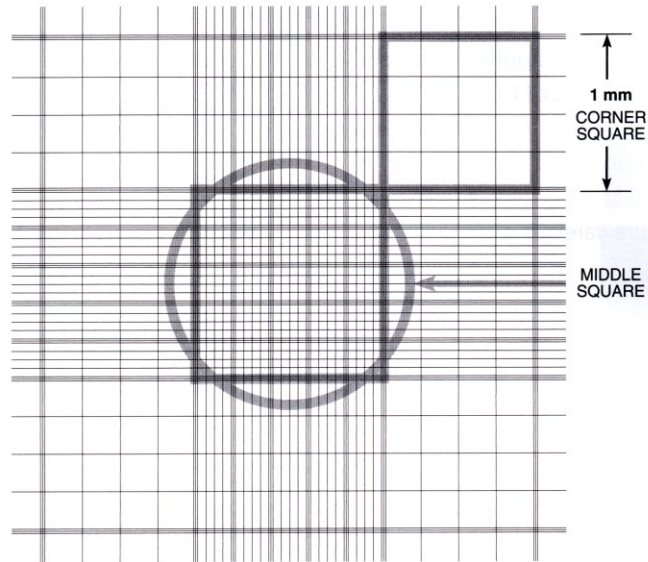
Morfologicky –světelný mikroskop

Fluorescenční mikroskop

Flow cytometrie (AnnexinV, TUNEL, subG0/G1 populace)

TRYPAN BLUE

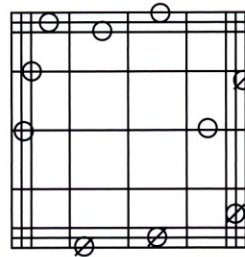
DIAGRAM I
STANDARD HEMOCYTOMETER CHAMBER



The circle indicates the approximate area covered at 100x microscope magnification (10x ocular and 10x objective). Include cells on top and left touching middle line (O). Do not

count cells touching middle line at bottom and right (Ø). Count 4 corner squares and middle square in both chambers (one chamber represented here).

DIAGRAM II
CORNER SQUARE (ENLARGEMENT)



Count cells on top and left touching middle line (O). Do not count cells touching middle line at bottom and right (Ø).

- ▶ Na počátku stojí pracovní hypotéza, kterou ověřujeme
- ▶ Důležité jsou časové a koncentrační závislosti (dose-response)
- ▶ Studium působení jednotlivých faktorů nebo jejich kombinací (multivariační analýzy)
- ▶ Souvislost proliferace, diferenciaci a apoptózy na buněčné úrovni
- ▶ Po stanovení základních cytotkinetických dat studium detailnějších mechanismů účinků na subbuněčné a molekulární úrovni
- ▶ Experimenty se opakují nezávisle nejméně 3x (v případě nejasností i vícekrát) a v mnoha případech zahrnují ještě paralelní měření, která upřesňují získanou hodnotu.
- ▶ Výsledky jsou vždy statisticky zhodnoceny a je určena významnost rozdílů.
- ▶ Výsledky jsou prezentovány formou tabulek, grafů nebo reprezentativních obrázků či fotografií.

Příklady výsledků s využitím buněčných linií

Růstové křivky

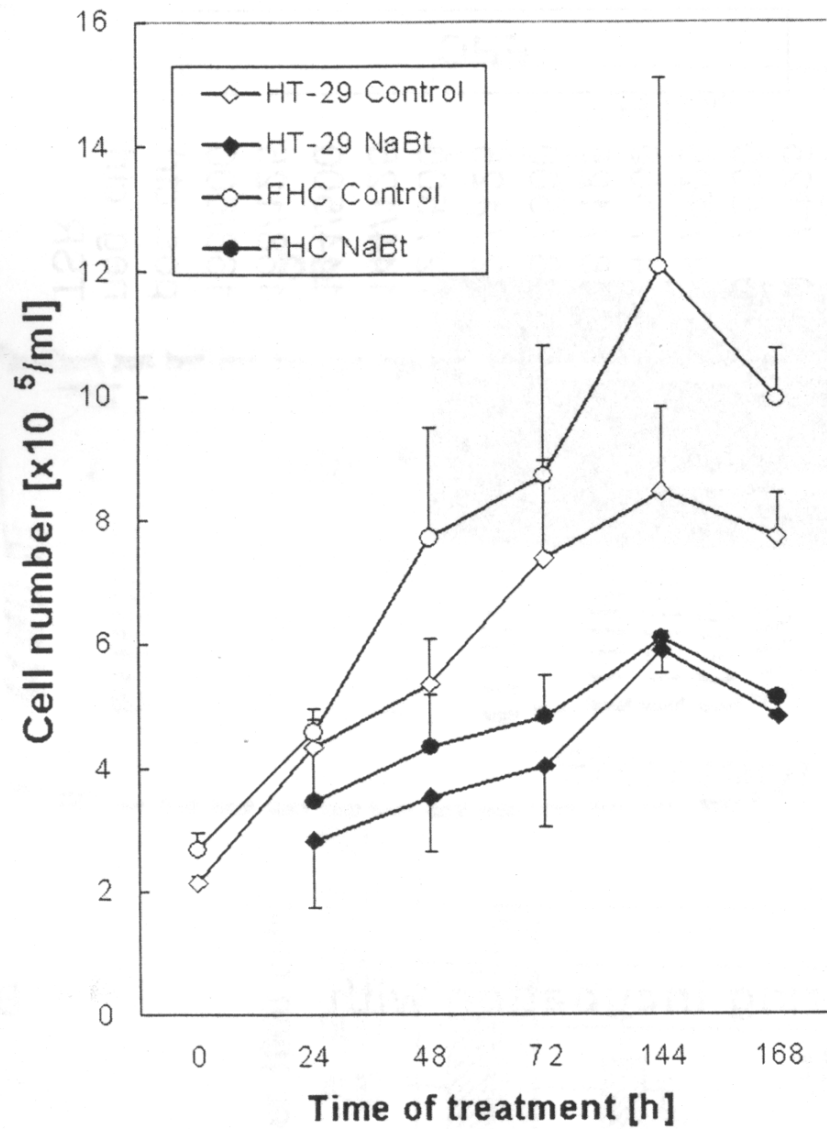


Figure 1. Effect of NaBt (5 mM) on growth of HT-29 and FHC cells (starting density $\times 10^5/\text{ml}$). The values are means \pm SEM of three independent experiments.

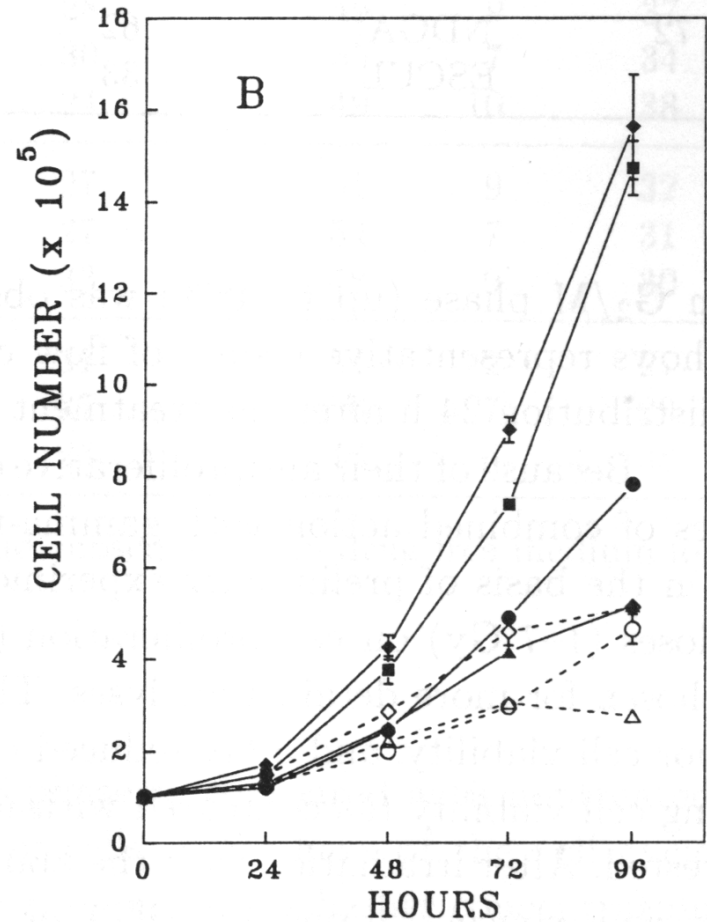
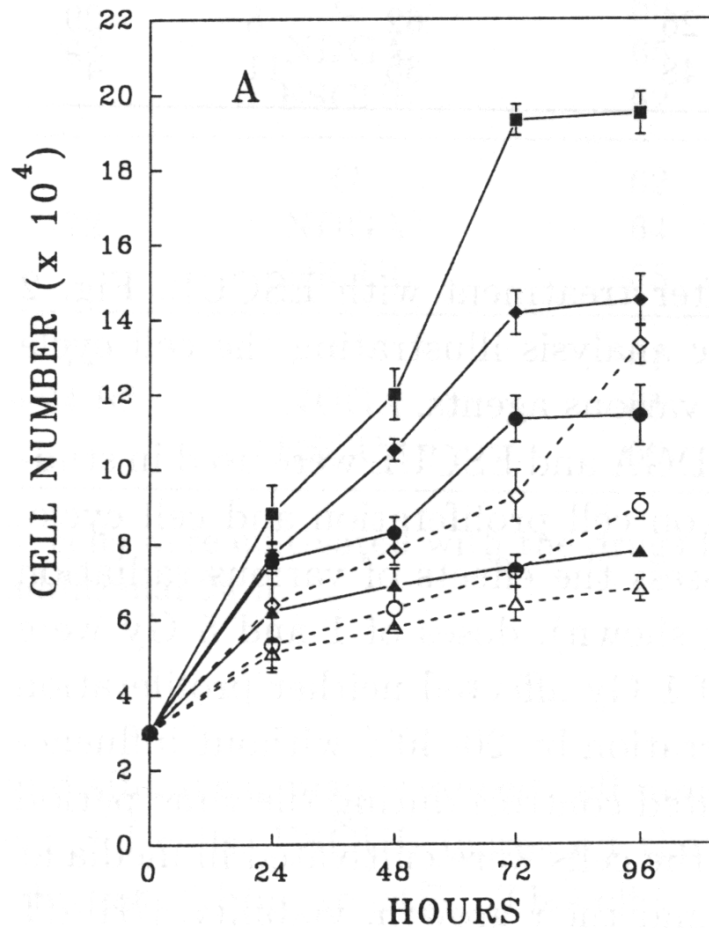


Figure 3. Growth of HS578T (A) and U937 (B) cells cultivated in the absence (diamonds) or in the presence of 50 $\mu\text{mol/l}$ PIROX (squares), 25 $\mu\text{mol/l}$ NDGA (circles) or 50 $\mu\text{mol/l}$ ESCUL (triangles). The solid lines and solid symbols represent nonirradiated cells. The dashed 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.

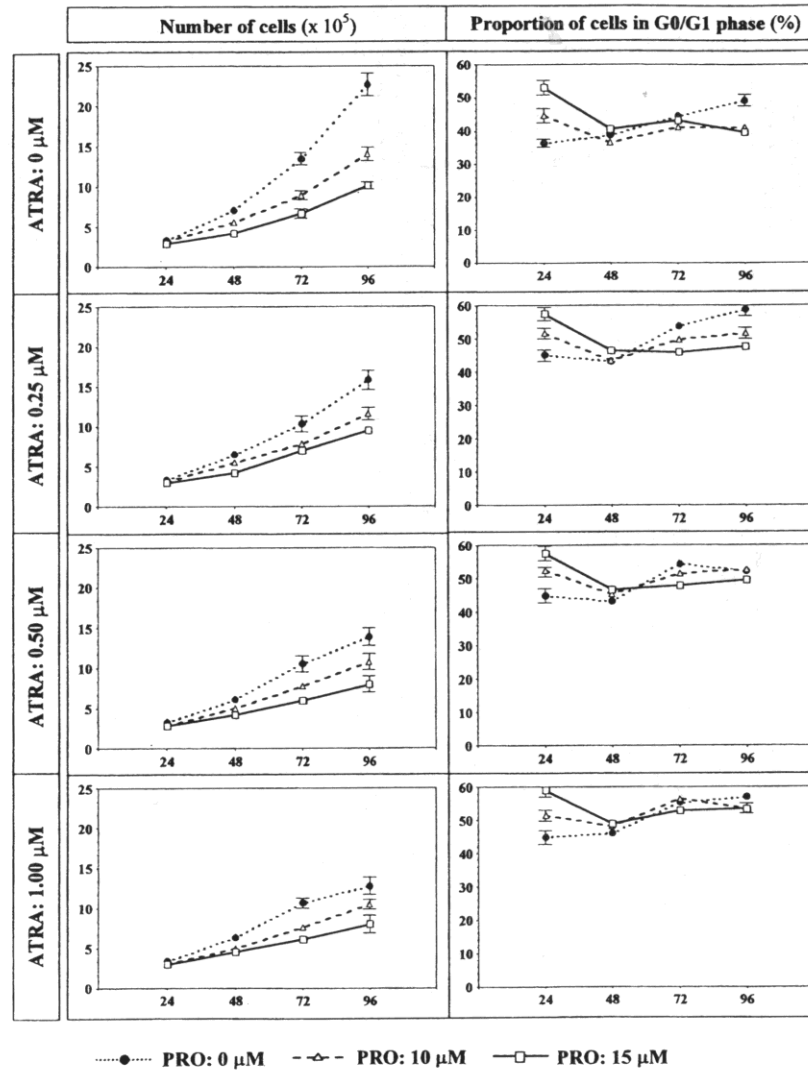


FIGURE 5. Number of cells and proportion of cells in cell cycle phases as influenced by combined all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and proadifen (PRO) during the experimental 24- to 96-h period. The points represent the means of 3–8 independent experiments supplied with standard errors (error bars).

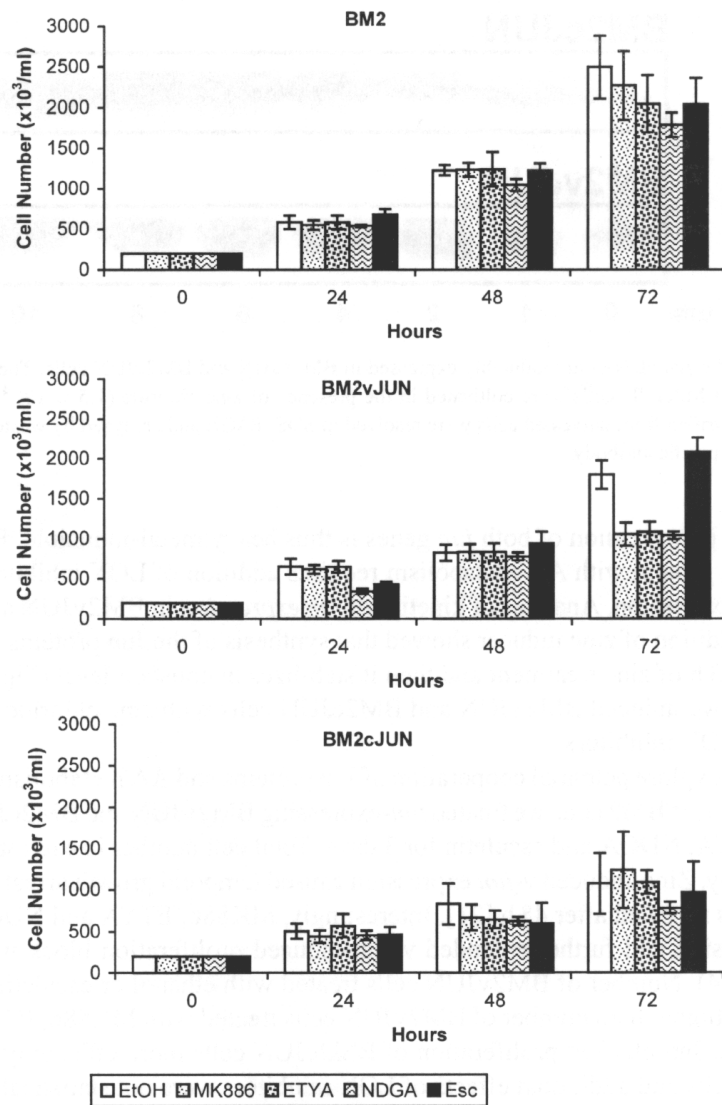


Fig. 4. Jun proteins and lipoxigenase inhibitors slow down proliferation of BM2 cells. The same number of BM2, BM2vJUN and BM2cJUN cells was seeded and treated with zinc chloride (1.5×10^{-4} M). Four hours later, lipoxigenase inhibitors MK886, ETYA, NDGA and esculetin (Esc) ($5 \mu\text{M}$) were added 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 závislosti (dose-response)

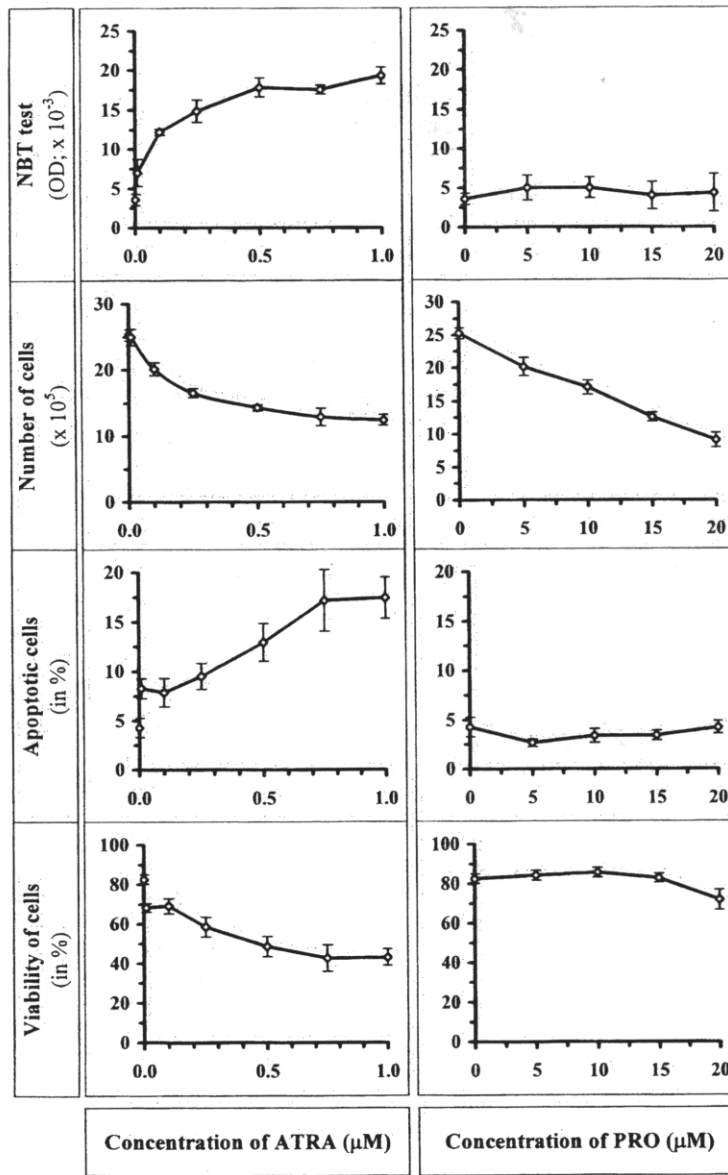


FIGURE 1. Dose-response profiles of the individual cell parameters based on concentration of all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and proadifen (PRO) as independent variables. The points represent the means of 3–10 independent experiments supplied with standard errors (error bars). NBT = nitroblue tetrazolium.

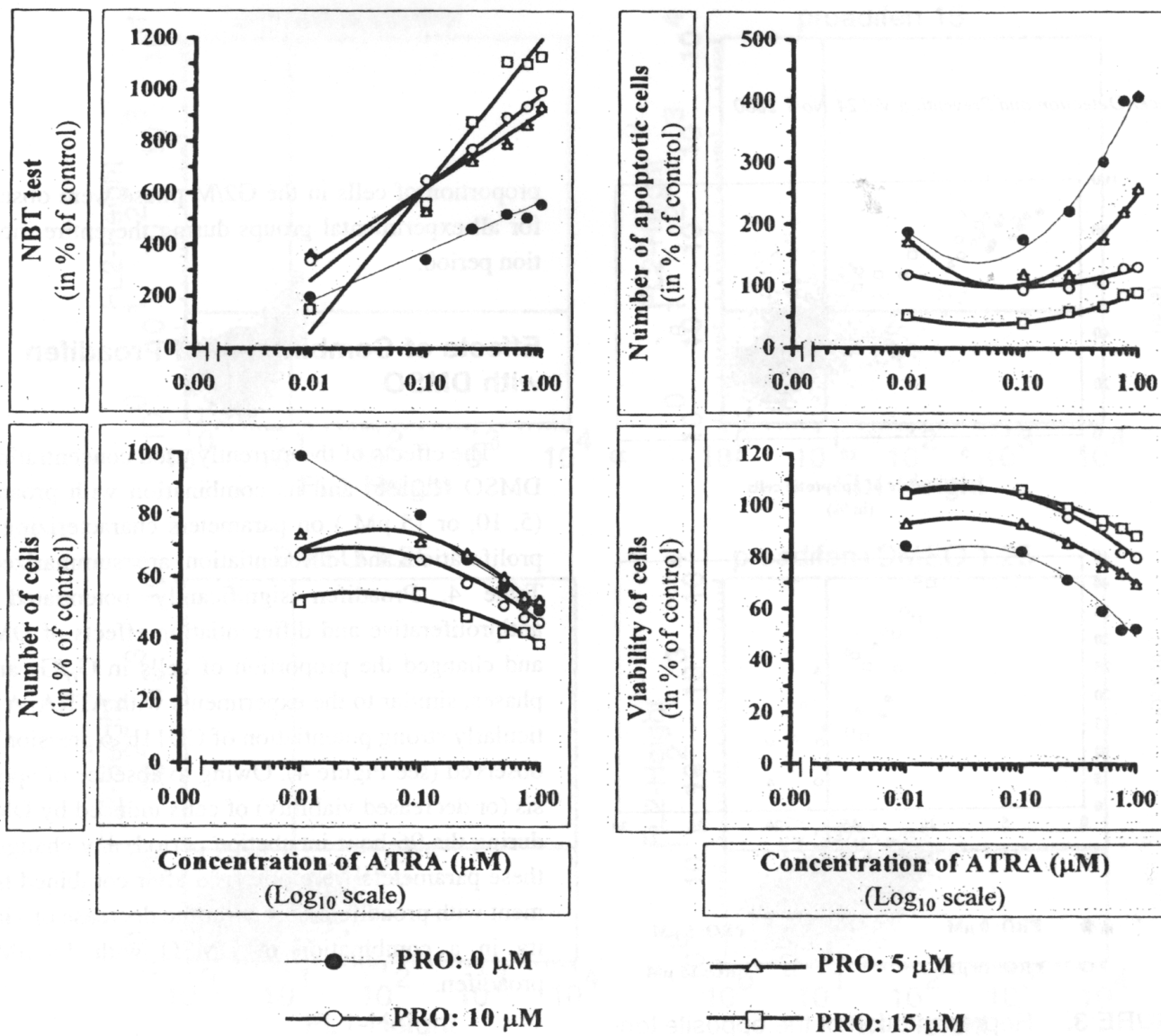
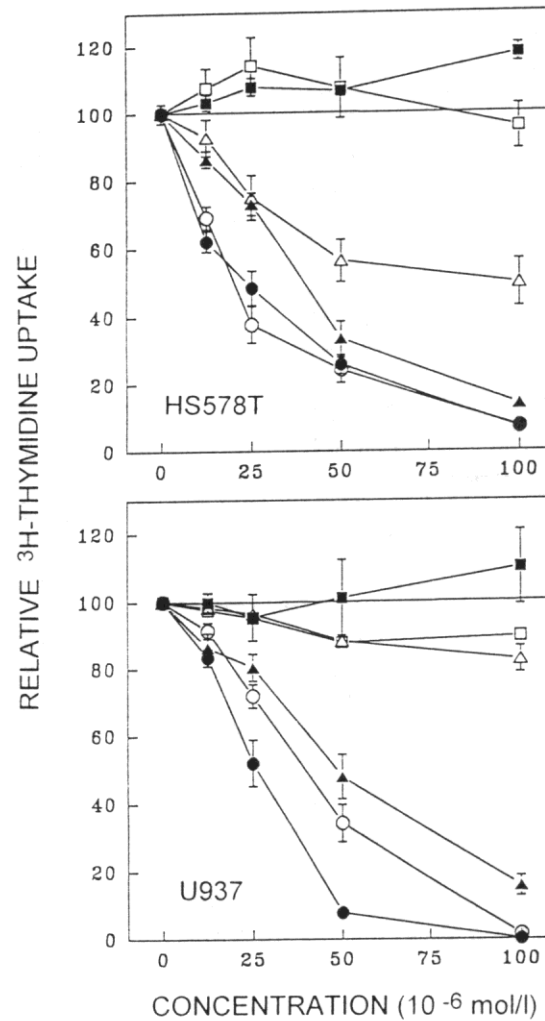


FIGURE 2. The effect of all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and proadifen (PRO) on the studied cell parameters expressed as model predictions (*lines*) supplied with experimental points representing the means of 3–10 independent experiments. NBT = nitroblue tetrazolium.

Figure 1. Effects of various doses of PIROX (squares), NDGA (circles), or ESCUL (triangles) on ³H-thymidine incorporation (% of nontreated control) in HS578T and U937 cells after 24 h (open symbols) or 72 h (solid symbols) cultivation. The data are means ± S.E.M. for 3–4 independent experiments performed in six parallels.



vyjádření v % kontroly
(neovlivněná
populace=100%)

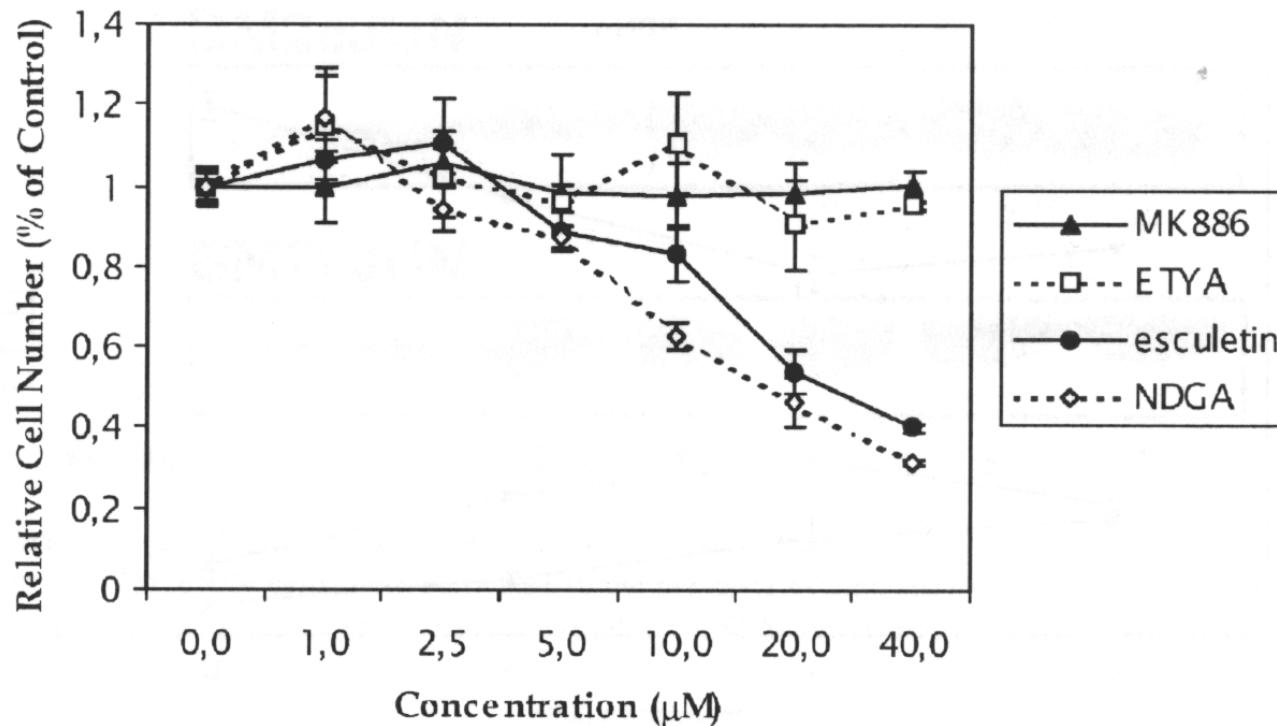


Fig. 1. Esculetin and NDGA negatively regulate growth of BM2 cells. The cells were cultivated in the presence of lipoxygenase inhibitors or ethanol solvent in indicated concentrations for 3 days. Total cell number in each sample was determined using cell counter. The curves represent the average numbers 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.

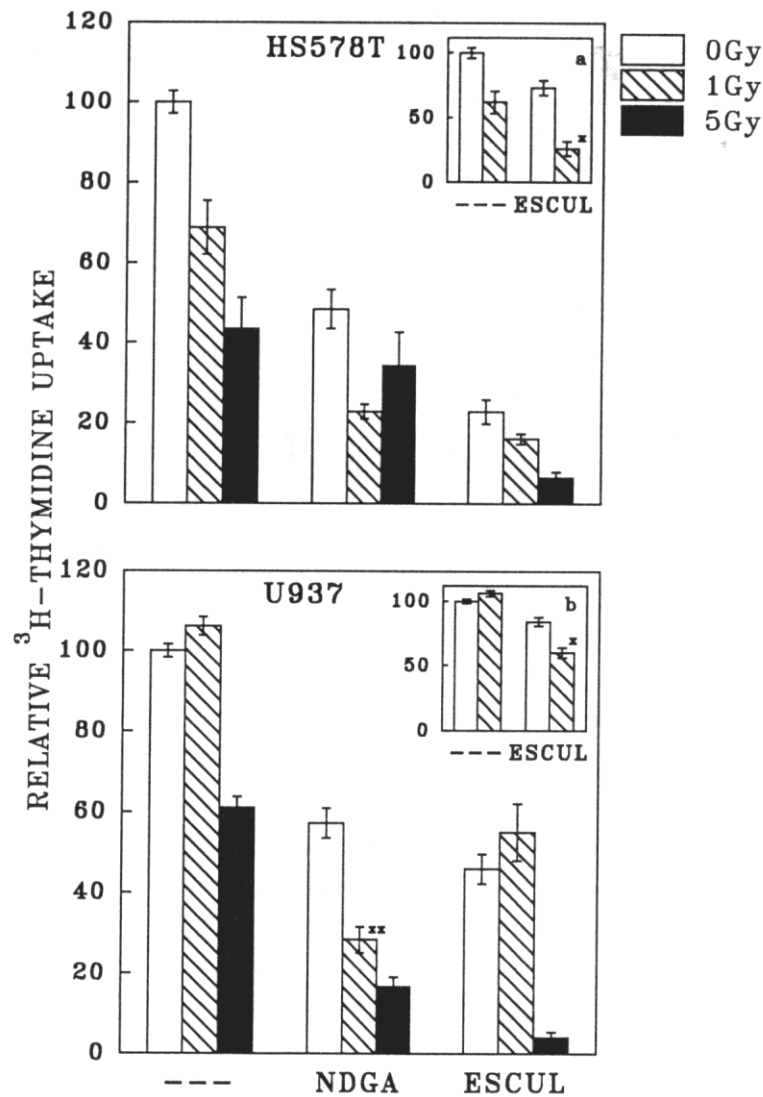


Figure 4. ³H-thymidine incorporation (% of nontreated control) in HS578T and U937 cells subjected to different treatment. The nonirradiated cells or cells irradiated with 1 or 5 Gy were cultivated in the presence of 25 μmol/l NDGA, 25 μmol/l ESCUL (inserts *a*, *b*) or 50 μmol/l ESCUL or without the agents (---) for 72 h. Data are means ± S.E.M. for three independent experiments performed in six parallels. * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01 significance of the interactive component

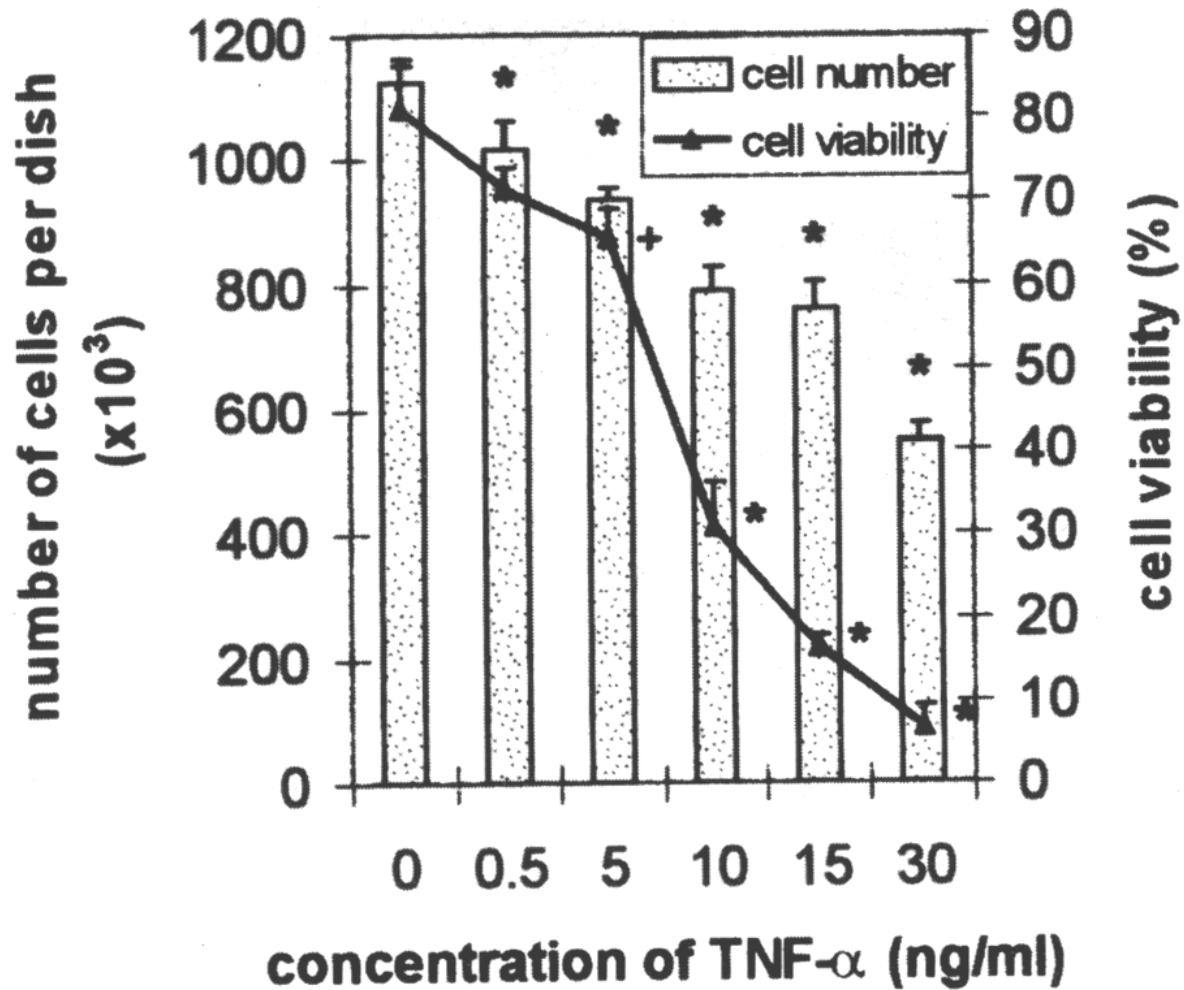


Figure 1. Growth and viability of HT-29 cells after 120-hour-treatment with TNF- α . $P < 0.05$ versus untreated control; (*) Tukey or (+) LSD test.

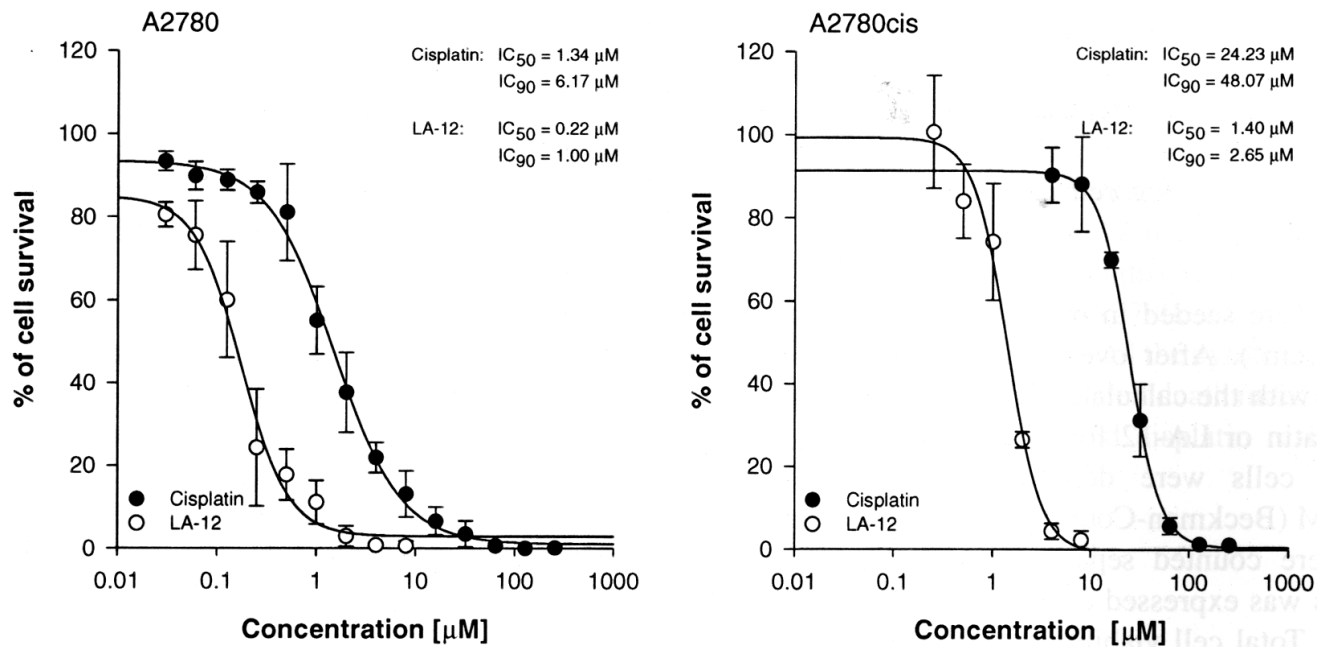


Fig. 2. Time- and dose-response effects on the survival of A2780 and A2780cis cancer cell lines. The effects after 72 h exposure to cisplatin or LA-12 in a concentration range between 0.3 μM and 256 μM were determined by MTT assay. The calculated drug concentrations inhibiting metabolic activity of cells by 50% (IC_{50}) and 90% (IC_{90}) 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.

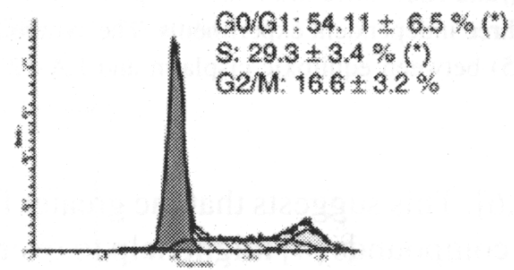
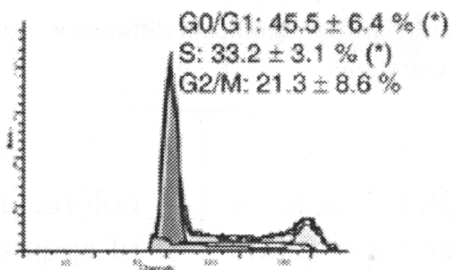
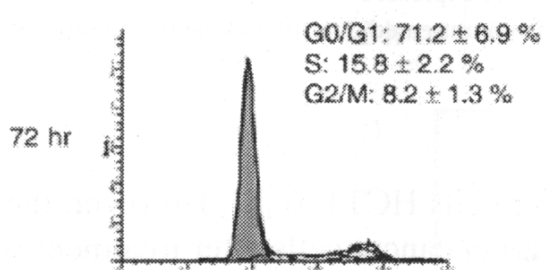
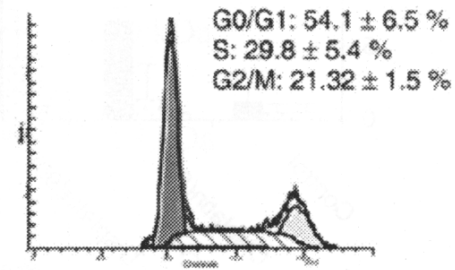
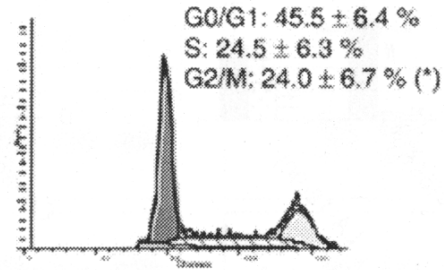
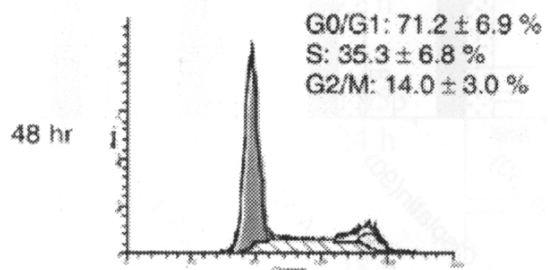
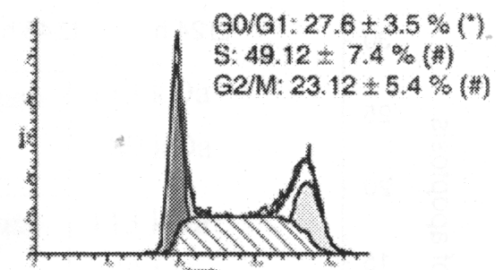
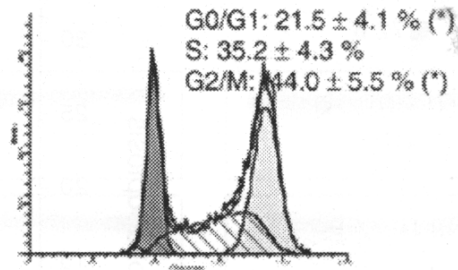
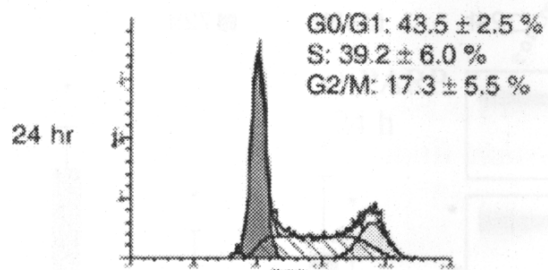
PARAMETRY BUNĚČNÉHO CYKLU

A2780

UNTREATED CONTROL

CISPLATIN(50)

LA-12(50)



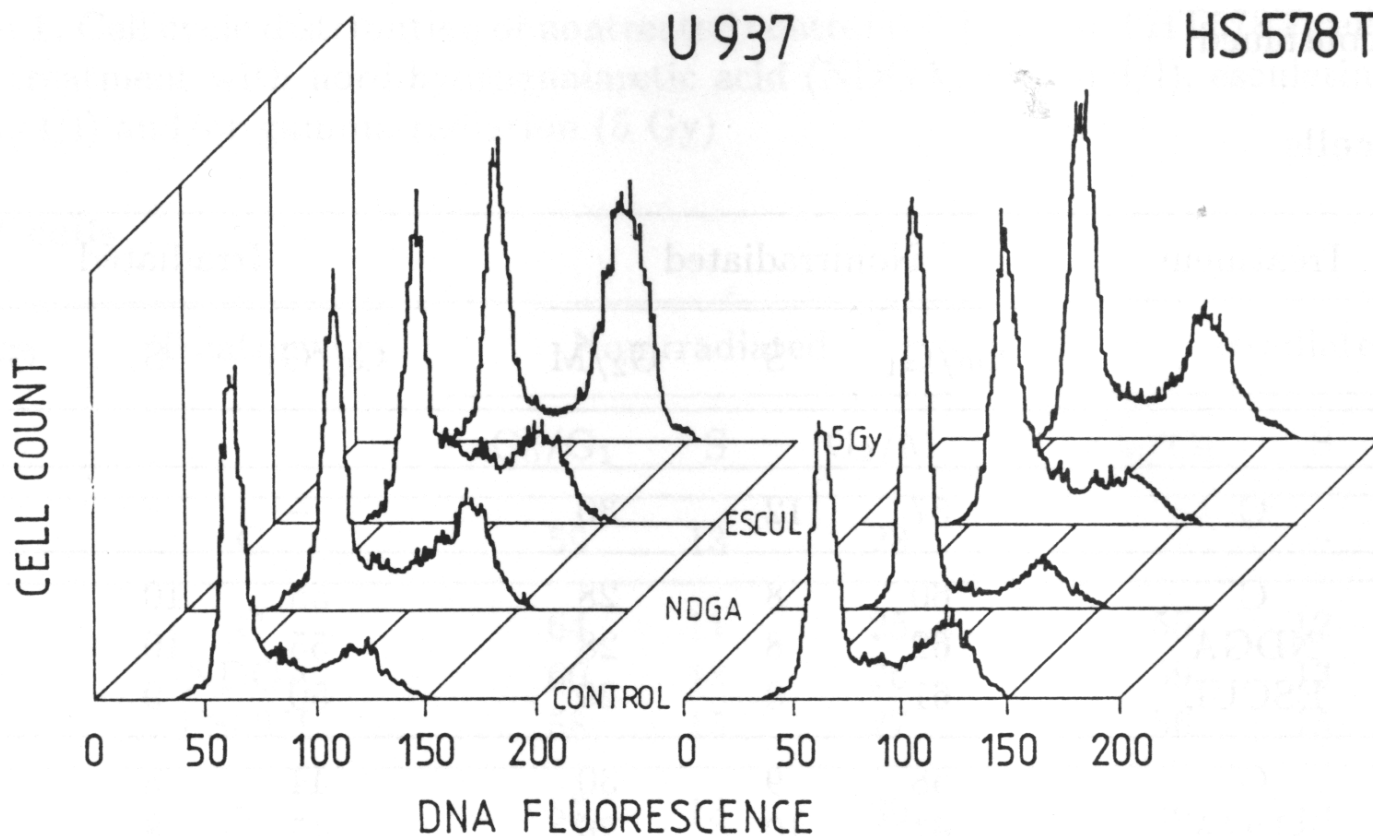


Figure 2. Representative results of flow cytometric analysis of the cell cycles of U937 and HS578T cell lines after 24 h of cultivation. Cells were treated with 25 $\mu\text{mol/l}$ NDGA, 50 $\mu\text{mol/l}$ ESCUL, or irradiated with 5 Gy.

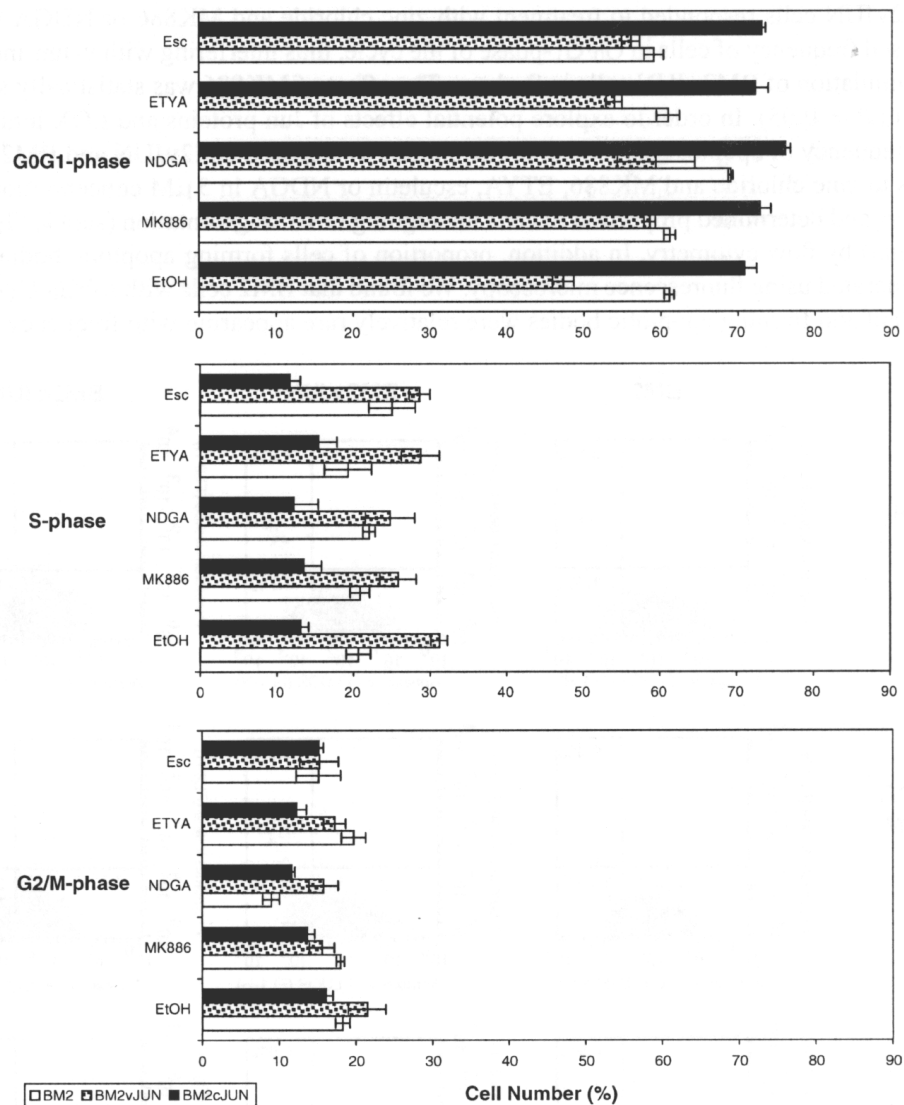


Fig. 5. The effects of lipoxygenase inhibitors on cell cycle of BM2 cells expressing *v-jun* or *c-jun*. BM2, BM2vJUN and BM2cJUN cells were treated with zinc chloride and lipoxygenase inhibitors (5 μ M) or ethanol solvent (EtOH) for 1 day. Harvested cells were fixed and stained with propidium iodide. DNA content in individual cells was determined by flow cytometry. The bars represent the average values from three independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

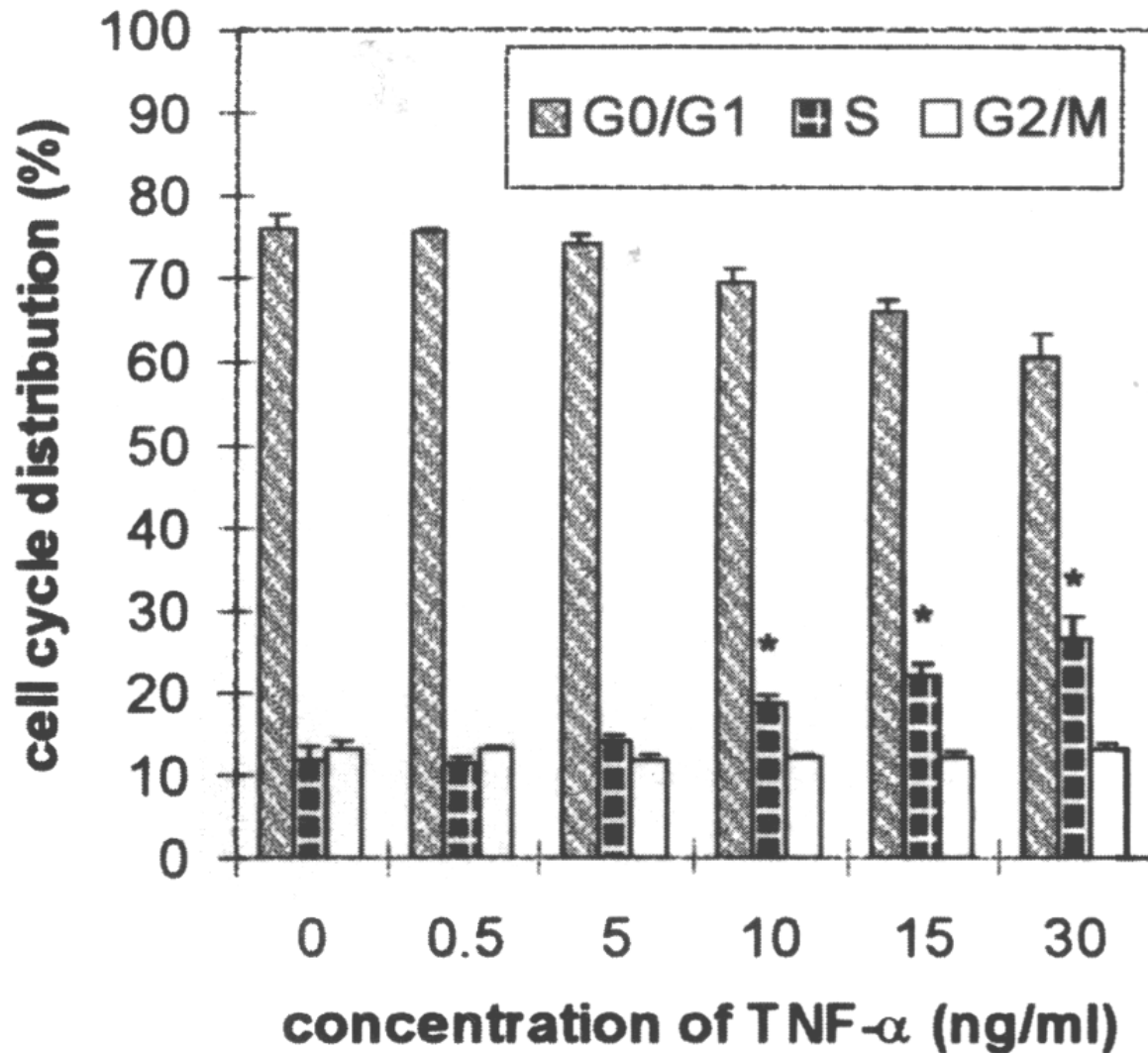


Figure 2. Cell cycle of HT-29 cells after 96-hour-treatment with TNF- α . (*) $P < 0.05$ versus untreated control for Tukey test.

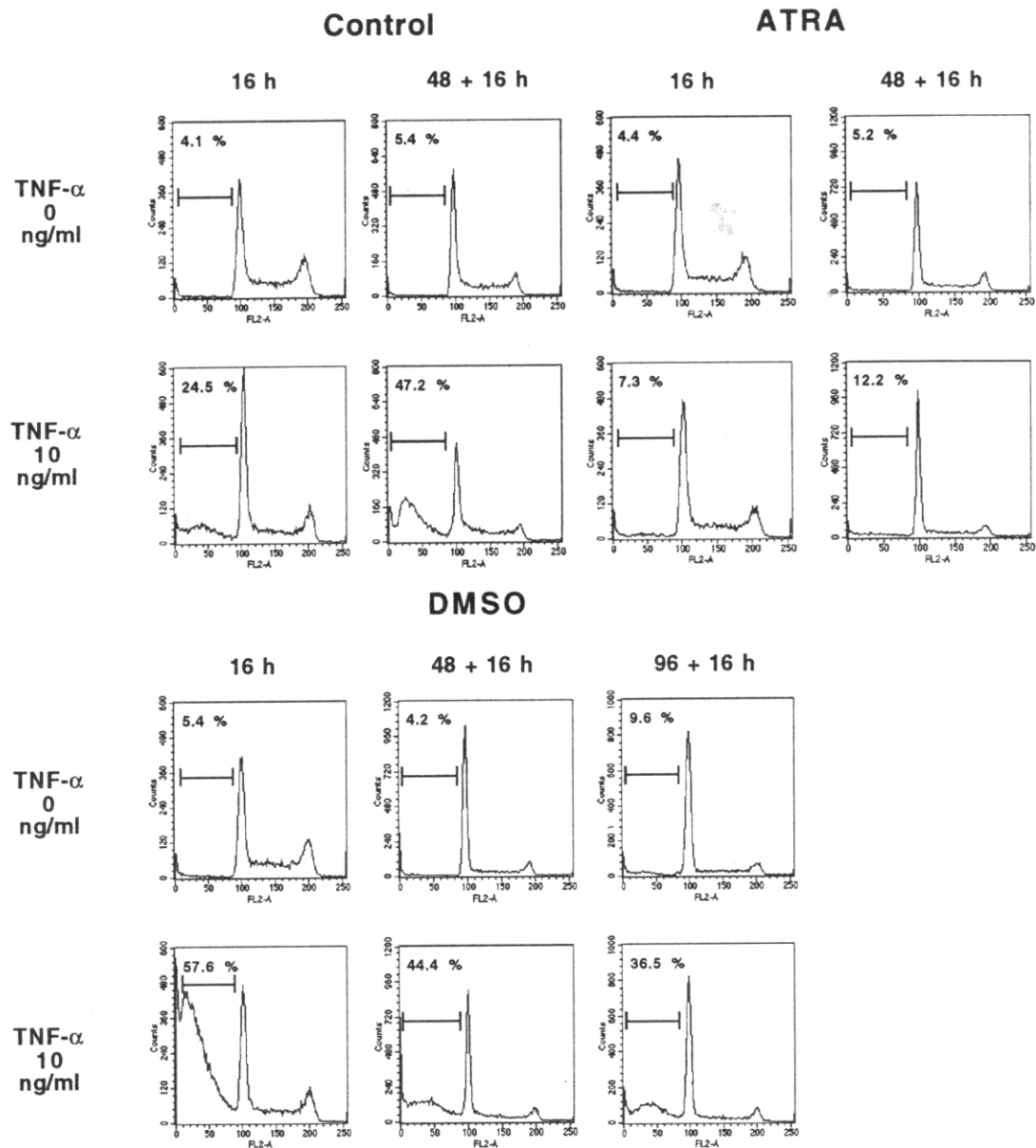
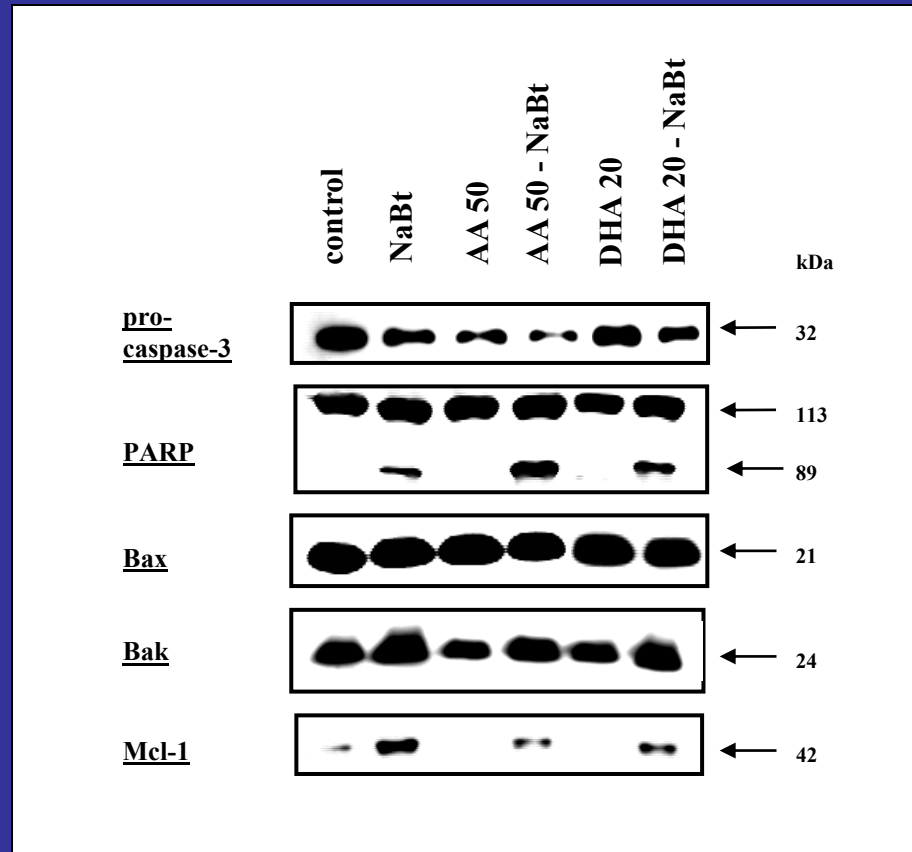


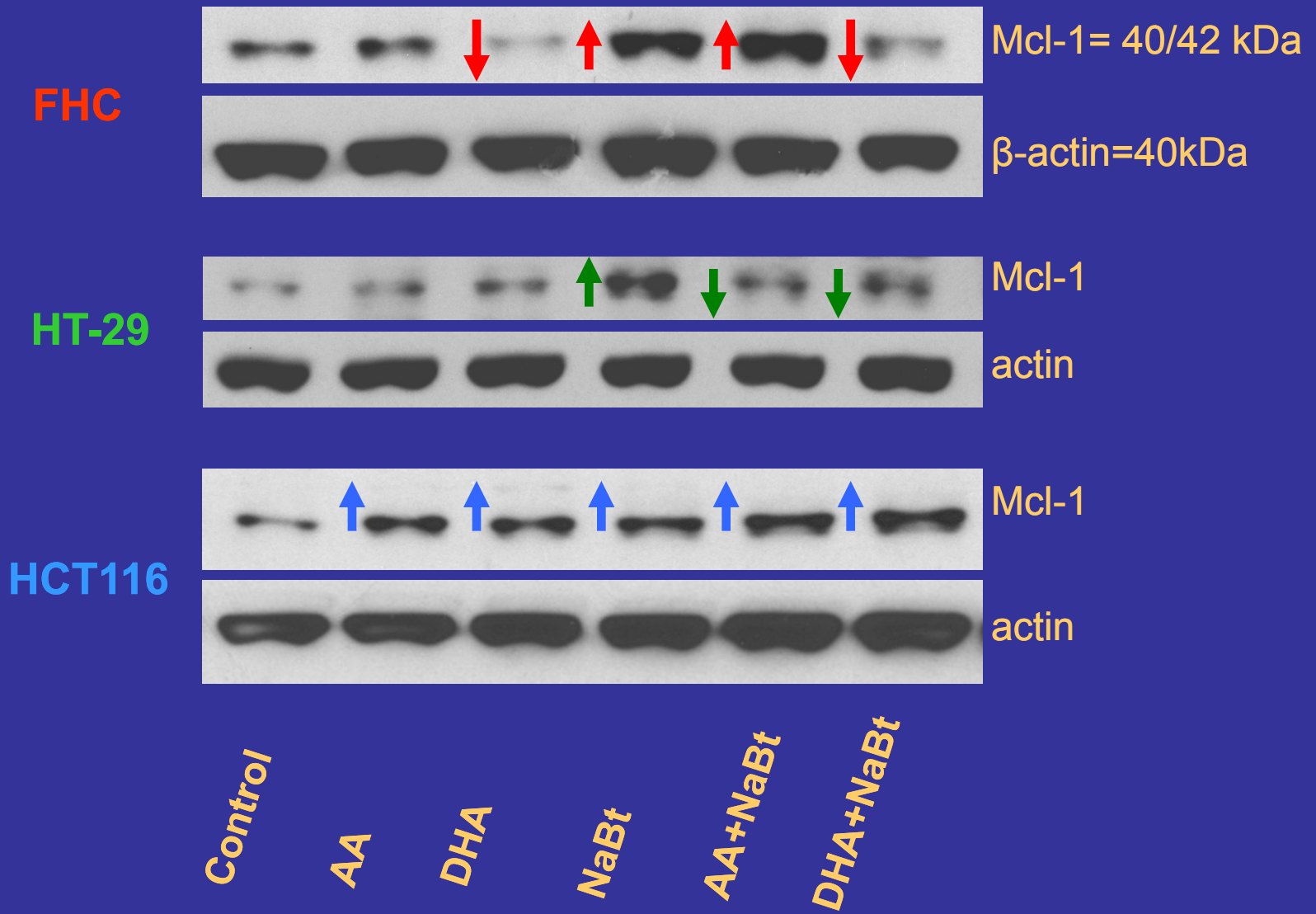
Fig. 2. Representative DNA content analyses ($n = 3$) for HL-60 cells treated with DMSO or ATRA, and TNF- α . Cells were stained and analyzed as described in Materials and Methods. y-axis, counts; x-axis, PI staining. Gates denote subdiploid fraction.

EXPRESE PROTEINU (WESTERN BLOTTING)

Interakce kys. arachidonové (AA) a dokosahexaenové (DHA) s butyrátem



Expresse antiapoptického proteinu Mcl-1



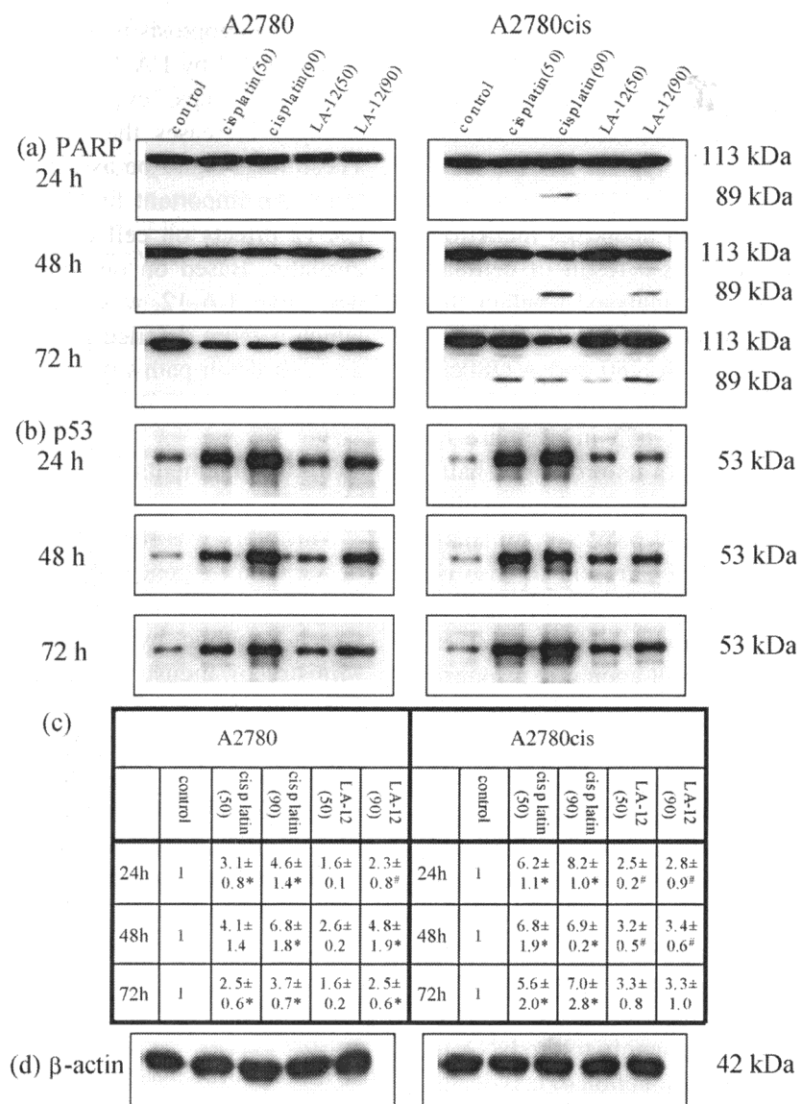
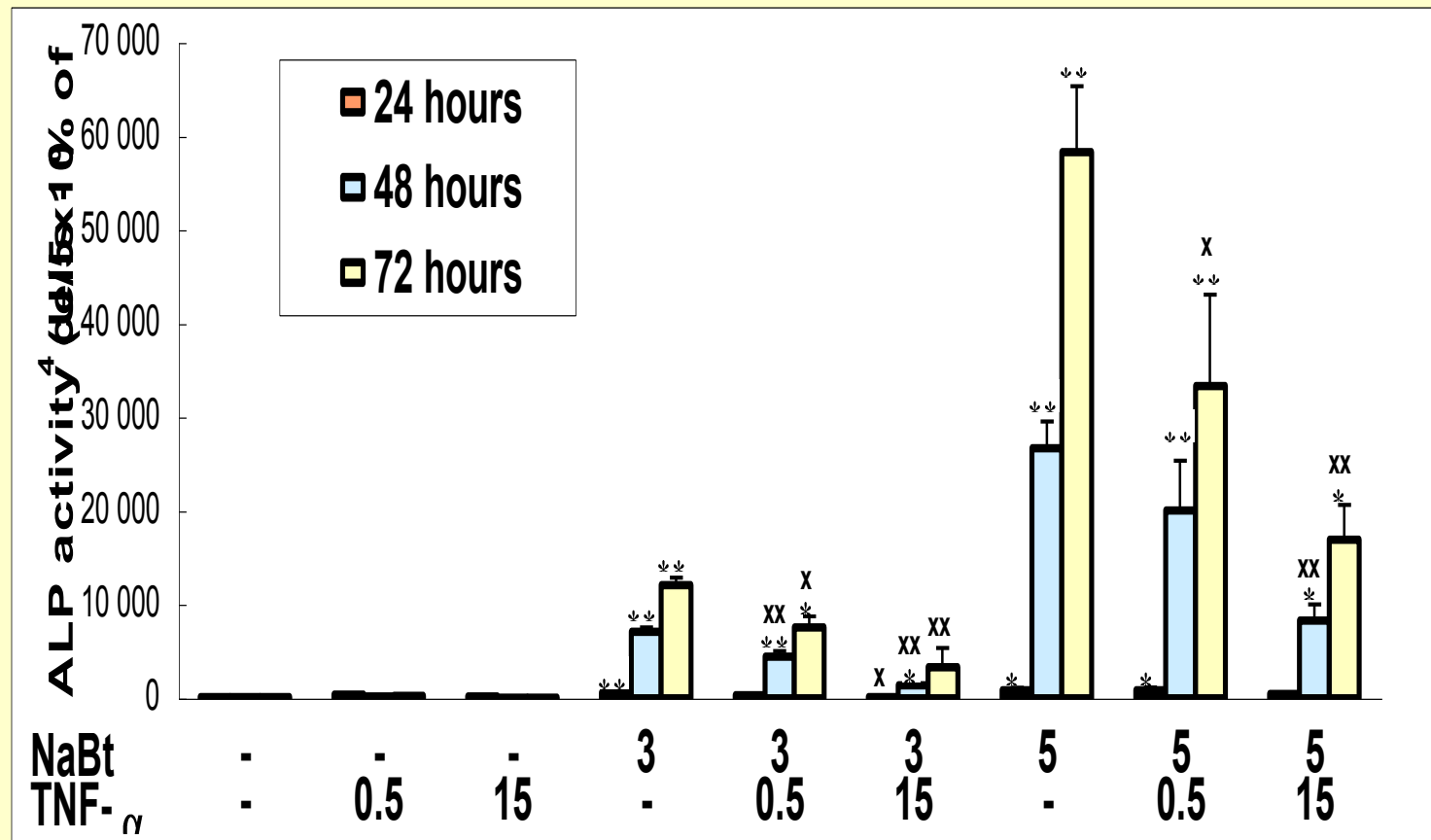


Fig. 8. Western blot analyses of (a) PARP (upper panel) and (b) p53 (middle panel) protein levels in A2780 (left panel) and A2780cis cells (right panel). The cells were not exposed (untreated controls) or exposed to IC₅₀ or IC₉₀ concentrations of cisplatin or LA-12 and harvested at 24 h, 48 h, and 72 h of sustained drug treatment. One representative experiment of at least three is presented. Table (c) contains values of p53 expression quantified by densitometry (mean ± S.D. of at least three independent experiments). The symbols (*) denote significant difference ($p < 0.05$) from untreated control; (#) denote significant difference ($p < 0.05$) between equitoxic cisplatin and LA-12 effects. Equal loading is documented by detection of (d) β-actin (bottom panel).

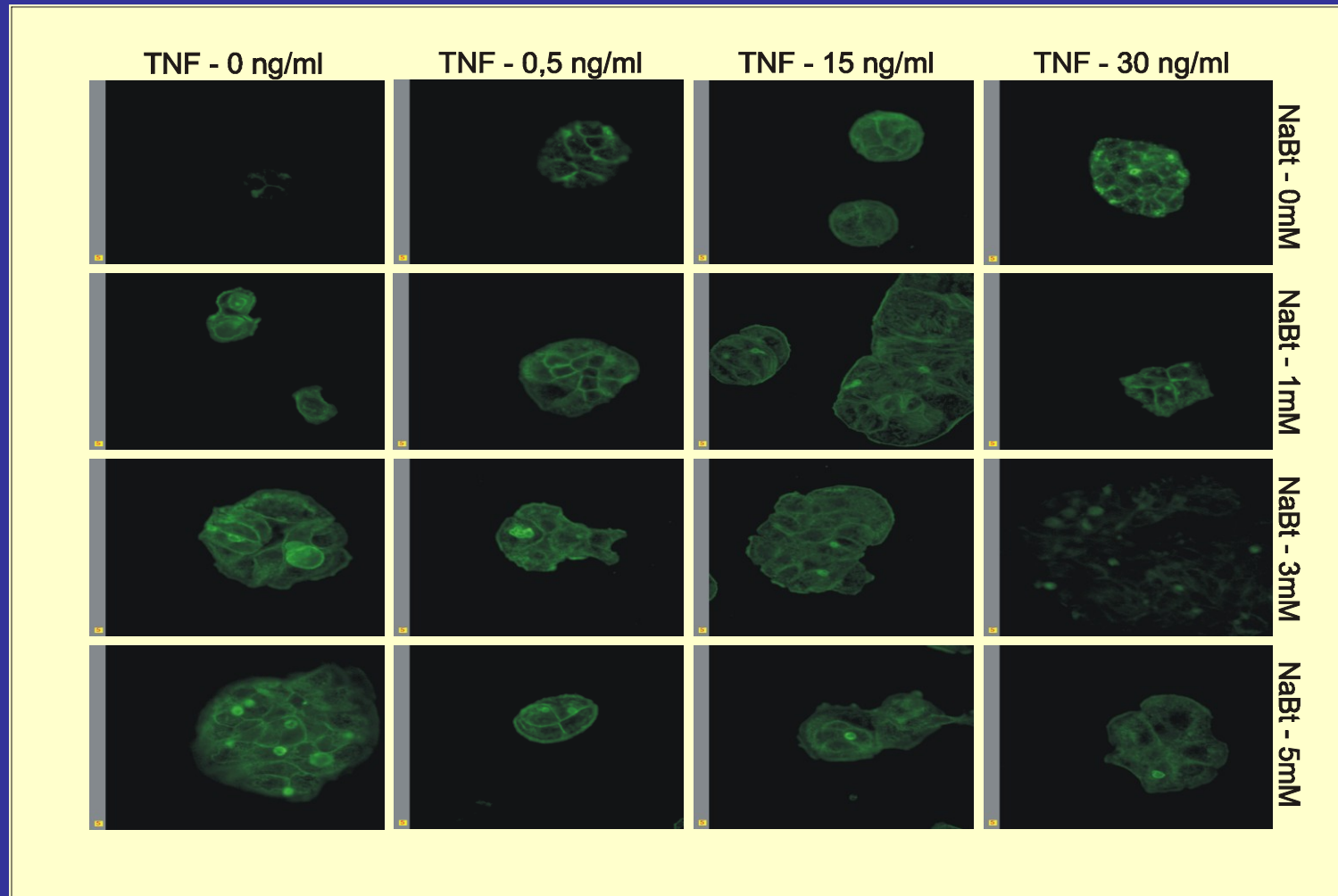
Detekce buněčné diferenciace

(aktivita alkalické fosfatázy, spektrofotometrie)



Detekce buněčné diferenciace

(obsah F-aktinu FITC značený phalloidin- konfokální mikr.)



Doporučená literatura:

Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures, Eds. A. Doyle, J. B. Griffiths, D. G. Newell, Wiley&Sons Inc., London 1995

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