

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Zuzana FILAROVÁ

Kvantitativní stanovení buněčné proliferace
(optimalizace metod, hodnocení účinnosti modelových látek)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Eva Kvasničková, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Ladislava Schröterová, Ph.D.

Hradec Králové 2006

Poděkování:

Děkuji své školitelce RNDr. Ladislavě Schröterové, Ph.D. za odborné vedení v průběhu této práce, podnětné připomínky a rady. Děkuji také všem ostatním pracovníkům Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za ochotu a pomoc.

1	ÚVOD	4
2	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	Buněčný cyklus	7
2.1.1	Fáze buněčného cyklu	7
2.1.1.1	G ₁ -fáze	8
2.1.1.2	S-fáze	9
2.1.1.3	G ₂ -fáze	10
2.1.1.4	M-fáze	10
2.1.1.5	G ₀ -fáze	10
2.2	Buněčná kvantifikace	11
2.2.1	Přímé počítání buněk	11
2.2.2	Testy založené na celistvosti buněčné membrány	12
2.2.2.1	Trypanová modř	12
2.2.2.2	Neutrální červeň	13
2.2.2.3	Měření aktivity laktátdehydrogenázy	13
2.2.3	Stanovení koncentrace celkové bílkoviny	14
2.2.4	Stanovení množství DNA	14
2.2.5	Měření metabolické aktivity	15
2.2.6	Měření DNA syntézy	15
2.2.6.1	Radioaktivní měření DNA syntézy	16
2.2.6.2	Neradioaktivní měření DNA syntézy	16
2.3	BrdU – enzymová imunoanalýza (ELISA)	17
2.3.1	Protilátka proti BrdU	17
2.3.2	Substráty pro BrdU-ELISA	18
2.4	Absorpční fotometrie	20
2.5	Chemiluminiscence	21
2.6	Inositolhexafosfát	23
2.6.1	Výskyt	23
2.6.2	Spektrum účinku	24
2.6.3	Mechanismus protinádorového účinku	24
2.6.3.1	Inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy	25
2.6.3.2	Inhibice vzniku metastáz	25
2.6.3.3	Inhibice angiogeneze	25
2.6.3.4	Stimulace imunitního systému	26
2.6.3.5	Antioxidační aktivita	26
3	CÍL PRÁCE	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Přístroje a pomůcky	30

4.2	Chemikálie.....	30
4.3	Biologický materiál.....	31
4.4	Příprava reagensií pro pasážování buněk.....	32
4.5	Pasážování buněk	32
4.6	Příprava roztoků pro BrdU-ELISA.....	33
4.7	Optimalizace pracovního postupu	34
4.7.1	Možné příčiny nízkého signálu a vysokého pozadí.....	36
4.8	Optimalizovaný postup BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí.....	38
4.9	Optimalizovaný postup BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí.....	40
4.10	Optimalizace koncentrace Anti-BrdU-POD	42
4.11	Citlivost.....	42
4.12	Kinetika reakce.....	42
4.13	Opakovatelnost.....	43
4.14	Kvantitativní stanovení buněčné proliferace.....	44
4.14.1	Příprava reagensií.....	44
4.14.2	Příprava médií o různé koncentraci IP ₆	44
4.14.3	Postup.....	45
5	VÝSLEDKY	46
5.1	Kinetika reakce systému protilátka + substrát.....	47
5.2	Optimalizace koncentrace Anti-BrdU-POD	48
5.3	Kinetika reakce.....	51
5.3.1	Kinetika reakce u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí.....	51
5.3.2	Kinetika reakce u BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí	52
5.4	Citlivost.....	54
5.4.1	Stanovení citlivosti u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí	54
5.4.2	Stanovení citlivosti u BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí.....	56
5.5	Opakovatelnost.....	58
5.5.1	Opakovatelnost u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí	58
5.5.2	Opakovatelnost u BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí	59
5.6	Kvantitativní stanovení buněčné proliferace po ovlivnění buněk inositolhexafosfátem	60
6	DISKUZE.....	62

7	ZÁVĚR	67
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	69
9	SEZNAM OBRÁZKŮ	71
10	SEZNAM GRAFŮ A TABULEK.....	73
11	POUŽITÁ LITERATURA.....	75

1 ÚVOD

Pokroky v medicínském výzkumu byly v minulosti uskutečňovány především prostřednictvím pokusů na laboratorních zvířatech. V současné době se přistupuje k použití různých alternativních metod, jako jsou buněčné linie, tkáně z rostlin, mikroorganismy, počítačové modely atd. Ze všech možných alternativních metod představují právě buněčné linie významný příspěvek k nahrazení pokusů na zvířatech.

Základní vlastností buněk mnohobuněčných organismu je schopnost se opakovaně dělit neboli proliferovat. Velmi často ale dochází k tomu, že buňka dělení nerealizuje a opakování buněčných cyklů je přerušeno. Toto může být způsobeno jednak nevyhovujícími podmínkami okolí, jednak negativní regulací buněčné proliferace. Je-li totiž buňka součástí vyššího organismu, pak je udržování počtu buněk na určité stabilní úrovni nutnou podmínkou zachování integrity organismu. Naproti tomu stojí buňky nádorové, které schopnost regulace ztratily a dělí se nekontrolovaně, nezávisle na potřebách organismu.

Vlastnost opakované proliferace umožňuje pěstovat buňky *in vitro*. V tomto případě se využívá především buněk nádorových, neboť oproti normálním (nenádorovým) liniím disponují neomezeným růstovým potenciálem.

Buněčné linie slouží jako model pro experimentální účely. Umožňují testovat působení různých vlivů na buněčné úrovni a takto získané poznatky pak mohou být přenášeny na celý organismus. Užívají se především pro hodnocení účinku chemických látek, ať už se jedná o léčiva a to především sloučeniny s antikancerogenním účinkem, nebo naopak látky toxické, mutagenní a kancerogenní. Účinek těchto látek lze hodnotit na základě buněčné proliferace. Ke stanovení proliferace je možno použít řadu metod od prostého, ale pracného počítání buněk až po moderní technologie, které umožňují stanovit proliferaci nepřímo pomocí vhodně zvoleného parametru.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Buněčný cyklus

Buňky živých organismů se v závislosti na jejich typu a potřebě dělí v různě dlouhých intervalech. Pokud se jedná o buněčné linie pěstované *in vitro*, je dělení závislé nejen na typu buněk, ale i na zvoleném kultivačním médiu, které musí obsahovat dostatečné množství živin a růstových faktorů. Vlastní rozdělení buňky mateřské ve dvě buňky dceřiné je předcházeno zmnožením celého jejího obsahu. Během růstu buňky tedy probíhá mnoho příprav na její příští rozdělení. Tyto procesy zahrnují řadu dílčích dějů, které ve výsledku vedou ke zdvojení genetické informace a k přírůstku všech buněčných struktur. Sled těchto procesů nazýváme buněčný cyklus.

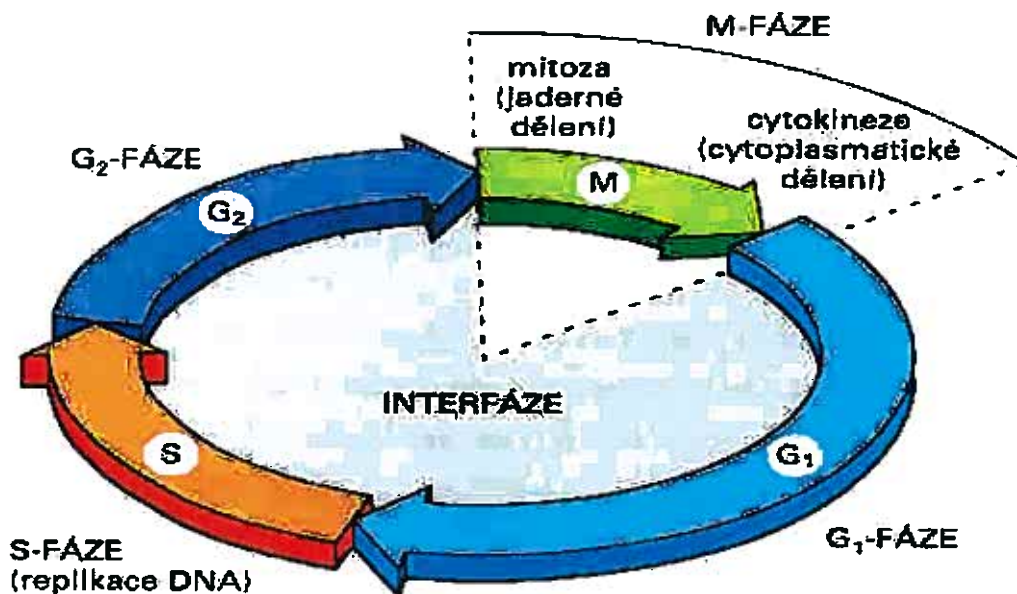
Buněčný cyklus je obecnou vlastností každé buňky a je zakódován v její genetické informaci. Každá buňka má teoreticky schopnost neomezené exponenciální reprodukce. Ta je však přísně regulována řadou kontrolních mechanismů [1].

2.1.1 Fáze buněčného cyklu

Roku 1882 popsal Flemming proces jaderného dělení a nazval jej mitózou. Jelikož se buňka zdála aktivní pouze během mitózy, byla zbývající část buněčného cyklu označena jako interfáze, období klidu.

Poté co byla v roce 1944 jako nositelka genetické informace prokázána molekula deoxyribonukleové kyseliny (DNA), bylo zřejmé, že musí být někdy během interfáze zdvojena, aby dceřiné buňky mohly obdržet zcela kompletní genetický materiál. Jednoduchým klíčovým experimentem byl identifikován vztah mezi načasováním DNA replikace a mitózou a byly definovány čtyři fáze buněčného cyklu, tak jako jsou známy dnes.

Jaderná DNA je replikována během S-fáze (syntetická fáze), M-fáze zahrnuje mitózu. Mezi obě tyto fáze jsou vmezeřeny dva časové úseky, G_1 a G_2 fáze. G_1 -fáze je intervalem mezi mitózou a replikací DNA. G_2 -fáze je intervalem mezi replikací DNA a mitózou [2]. Časové trvání všech fází dohromady se označuje jako generační doba buňky [1].



Obr. 1 Fáze buněčného cyklu [3]

2.1.1.1 G₁-fáze

G₁-fáze začíná v okamžiku, kdy se po rozdělení buňky mateřské stává dceřiná buňka soustavou schopnou samostatné existence a končí zahájením replikace jaderné DNA, tedy S-fází.

G₁-fáze je, pokud se týká časového trvání, ze všech fází nejvariabilnější a zpravidla nejdelší. Různá délka generační doby buňky, způsobená vlivem vnějších podmínek, se odráží právě v délce G₁-fáze, zatímco délka ostatních fází zůstává zhruba konstantní.

V G₁-fázi intenzivně probíhají syntetické procesy, zejména syntéza RNA a proteinů, které vedou k přírůstku hmotnosti buňky. Zvětšuje se počet většiny buněčných struktur, jako jsou ribozómy, membrány, mitochondrie, endoplazmatická retikula a ostatní orgány, vytváří se zásoba nukleotidů a syntetizují se enzymy pro budoucí replikaci jaderné DNA [1].

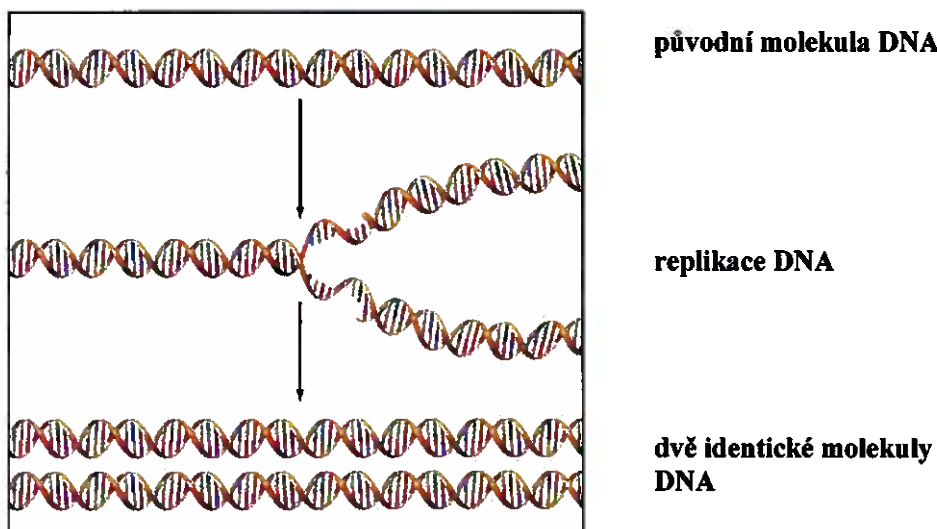
2.1.1.2 S-fáze

Jako S-fázi označujeme úsek buněčného cyklu, kdy probíhá replikace jaderné DNA. Dochází v ní tedy ke zdvojení genetické informace.

Bezchybná replikace DNA je základní podmínkou života. (pozn. Může samozřejmě docházet k chybám při replikaci DNA – mutacím. Chybně replikovaná DNA je opravena, zachována nebo je buňka s touto DNA odsouzena k apoptóze. Mutace mohou svým nositelům přinášet existenční výhody i nevýhody.) Když roku 1953 Watson a Crick prezentovali svou hypotézu o struktuře DNA, byli mimořádně vzrušeni možností jejího zdvojení a navrhli tzv. semikonzervativní model replikace DNA, který je dodnes považován za správný [4].

Molekula DNA je zpravidla tvořena dvěma k sobě komplementárními polynukleotidovými řetězci, které probíhají vedle sebe a jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky mezi jednotlivými bázemi. Během replikace dochází k oddělení řetězců a každý z nich je pak doplněn volnými komplementárními nukleotidy, čímž vzniknou dvě přesné kopie původní molekuly s identickou sekvencí nukleotidových párů, tedy se stejnou genetickou informací.

Při replikaci DNA zůstává tedy jeden řetězec původní a druhý, komplementární je nově syntetizován. Z tohoto důvodu se tento způsob replikace označuje jako semikonzervativní [1].



Obr. 2 Replikace DNA [2]

2.1.1.3 G₂-fáze

Skončením S-fáze nastupuje G₂-fáze, která končí zahájením mitózy. V této fázi pokračuje růst buňky podmíněný intenzivní syntézou proteinů a RNA a tvorbou buněčných struktur [1].

V G₂-fázi také probíhá oprava možných chyb v nově syntetizované DNA [4].

2.1.1.4 M-fáze

M-fáze je poslední etapou buněčného cyklu, která bývá zpravidla zakončena vlastním rozdělením buňky.

Součástí M-fáze jsou dva procesy: rozdělení jádra (mitóza) a rozdělení buňky (cytokineze). Oba procesy jsou zpravidla synchronizovány, tj. cytokineze probíhá ke konci mitózy [1].

2.1.1.5 G₀-fáze

Většina buněk nacházejících se v lidském těle se nedělí, avšak dělicí schopnost neztratila. Tyto buňky jsou diferencované a jejich role v organismu spočívá v plnění speciálních funkcí.

Nedělicí buňky jsou označovány jako necyklující neboli klidové. Jejich buněčný cyklus je přerušen v určitém místě G₁-fáze. Toto stadium je označováno jako G₀-fáze [1].

G₀-fáze není bezpodmínečně trvalá. V určitých případech se buňka může pod vlivem různých signálů navrátit do aktivního buněčného cyklu. Tento návrat je však přísně regulován. Poruchy regulace buněčného dělení spojené s nekontrolovanou proliferací a se ztrátou diferenciací mohou pak vést ke vzniku zhoubného bujení [2].

2.2 Buněčná kvantifikace

Rychlé a přesné stanovení počtu životaschopných buněk je důležitým požadavkem v mnoha studiích, které se mohou týkat např. analýzy aktivity růstových faktorů, testování léků, určení cytostatického potenciálu sloučenin v toxikologických studiích, stanovení cytotoxického, mutagenního a kancerogenního efektu chemických sloučenin na lidské buňky atd.

Testy buněčné kvantifikace jsou založeny na dvou parametrech, jedním je buněčná životaschopnost a druhým buněčná proliferace.

Téměř ve všech případech jsou tyto parametry testovány na základě životně důležitých funkcí, které jsou charakteristické pro živé buňky, jako je celistvost buněčné membrány, funkčnost enzymů, schopnost buněčného dělení atd.

Ostatní jsou založeny na stanovení množství určité buněčné struktury, např. celkové množství DNA nebo bílkoviny, případně je možno užít prosté počítání buněk [5].

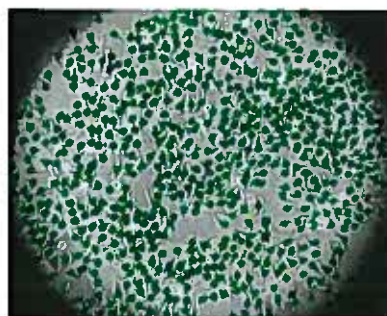
2.2.1 Přímé počítání buněk

Přímé počítání buněk je jednoduchým způsobem buněčné kvantifikace. Princip spočívá v nanesení buněčné suspenze na Petriho misku, přičemž na vnější stranu jejího dna je upevněn papírový proužek s pěti otvory. Průměr jednoho otvoru je 1 mm.

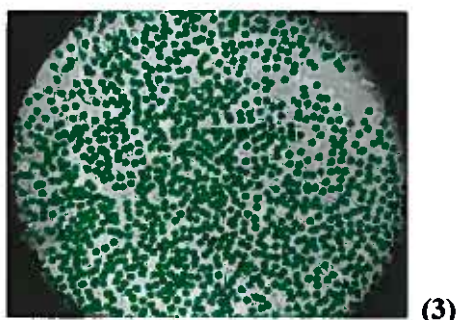
Po uplynutí kultivační doby je pořízena fázově-kontrastní fotografie každého otvoru. Nárůst buněčného počtu je určen jako průměrná hodnota počtu buněk na každé fotografii [6].



(1)



(2)



Obr. 3 Buněčná linie Hep-2 ovlivněna výluhem ze zubního implantátu, fotografie byly pořízeny po 24 (1), 48 (2) a 72-hodinové (3) inkubaci

2.2.2 Testy založené na celistvosti buněčné membrány

Integrita cytoplazmatické membrány je základní podmínkou životaschopnosti všech buněk.

2.2.2.1 Trypanová modř

Přímé určení počtu buněk s využitím mikroskopické počítací komůrky se řadí mezi tradiční způsoby buněčné kvantifikace.

K rozlišení živých a mrtvých buněk nám slouží jejich vzhled pod mikroskopem. Živé buňky jsou obvykle kulaté a relativně malé ve srovnání s buňkami mrtvými, které se jeví větší a vroubkované.

Pro lepší odlišení živých buněk od mrtvých je vhodné spojení této metody s vitálním barvením (supravitální barviva barví přežívající buňky, postvitální pouze buňky mrtvé).

Jako postvitální barvivo se nejčastěji užívá trypanová modř, která vstupuje přes buněčnou membránu do mrtvých buněk. Po naředění suspenze buněk tímto barvivem, zůstávají živé buňky kulaté a malé. Neživé buňky jsou větší a tmavě modré.

Tato metoda je jednoduchá a finančně nenáročná, avšak neumožňuje rychlé vyhodnocení většího počtu vzorků [7].

2.2.2.2 Neutrální červeň

Neutrální červeň je ve vodě rozpustné, slabě bazické, supravitální barvivo, které se akumuluje v buněčných lyzozómech.

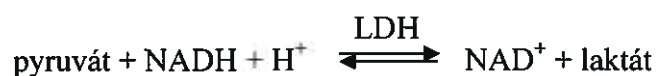
Test používající neutrální červeň je založen na inkorporaci barviva do lyzozómů živých buněk. Příjem barviva přes plazmatickou membránu se děje prostřednictvím pinocytózy.

Akumulace barviva uvnitř lyzozómů je umožněna vazbou neutrální červeně na fixované kyselé skupiny, jako jsou polysacharidy, uvnitř lyzozomální matrix, nebo vycitáváním uvnitř kyselého prostředí lyzozómů.

Mrtvé buňky nebo ty s poškozenou plazmatickou či lyzozomální membránou nejsou schopny při promytí udržet barvivo a dochází k jejich odbarvení. Hodnocení je prováděno okometricky (agar difúzní test) nebo je neutrální červeň z intaktních živých buněk vyextrahována a její množství je stanoveno spektrofotometricky. Kvantita vyextrahovaného barviva je přímo úměrná počtu živých buněk [7].

2.2.2.3 Měření aktivity laktátdehydrogenázy

Laktátdehydrogenáza (E.C.1.1.1.27: LDH) je enzym, který je prakticky obsažen ve všech buňkách, ze kterých je při jejich poškození uvolňován. Měření aktivity LDH v supernatantu nad buněčnou kulturou poskytuje kvantitativní hodnoty pro úbytek buněčné životaschopnosti.



Aktivita LDH může být měřena jako redukce pyruvátu na laktát. Tato redukce je spojená s oxidací NADH na NAD⁺. NADH má ve srovnání s NAD⁺ při 340 nm vyšší absorpenci, proto je reakce měřena jako rychlost poklesu absorbance při 340 nm [7].

2.2.3 Stanovení koncentrace celkové bílkoviny

Jednou z možností kvantifikace celkové bílkoviny ve vzorku je Bradfordova metoda.

Princip je založen na skutečnosti, že některé aminokyseliny přítomné v bílkovinách, především arginin, selektivně vážou barvivo Coomassie Brilliant Blue, označované také jako Bradfordova reagensie.

Po navázání barviva dochází ke změně jeho barvy z červenohnědé na modrou, a tedy zároveň ke změně absorpčního maxima z hodnoty 465 nm na 595 nm. Zvýšení absorbance při 595 nm je přímo úměrné množství navázaného barviva, a tedy koncentraci celkové bílkoviny ve vzorku [8].

2.2.4 Stanovení množství DNA

Nejčastějším způsobem stanovení celkového množství DNA je použití 4',6-diamidino-2-phenylindolu (DAPI). DAPI je fluorescenční barvivo, které se váže na dvouvláknovou DNA a tvoří s ní silně modře fluoreskující komplex.

Značení je zprostředkováno vazbou tohoto fluorochromu do malého žlábků DNA, kde se nachází oblast bohatá na A a T báze.

Po vazbě DAPI na DNA se intenzita fluorescence fluorochromu až 20x zvýší. Toto je zřejmě zapříčiněno interakcí, při které dochází k vmezeření DAPI mezi oba řetězce DNA a k následnému vytlačení molekul vody jak z DAPI, tak z DNA.

Kvantifikaci navázaného DAPI je možno provést měřením fluorescence s použitím vhodného fluorimetru nebo počítáním fluoreskujících jader pomocí fluorescenčního mikroskopu [9].

2.2.5 Měření metabolické aktivity

Poškození buňky nevyhnutelně směřuje ke ztrátě schopnosti udržovat a dodávat energii pro metabolické funkce a buněčný růst a na tomto předpokladu jsou založeny testy metabolické aktivity [5].

Tento způsob měření buněčné proliferace využívá schopnosti buněk štěpit tetrazoliové soli.

Nejčastěji používanou solí je 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid (MTT). Test je založen na schopnosti mitochondriálních dehydrogenáz v životaschopných buňkách přeměňovat žlutý, ve vodě rozpustný substrát (MTT), na nerozpustný tmavě modrý formazan. Formazan je pak rozpuštěn dimethyl sulfoxidem, případně jiným organickým rozpouštědlem. Absorbance barevného produktu je měřena fotometricky. Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk [10].

Mezi další používané tetrazoliové soli se řadí 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazolio-5-yl]-benzo-1,3-disulfonát sodný (WST-1) a 3,3'-{5-[(fenylamino)karbonyl]-tetrazolium}-2,3-bis(4-methoxy-6-nitro-benzosulfonát) sodný (XTT). Jejich výhodou je, že jsou životaschopnými buňkami přeměňovány přímo na rozpustné barevné formazany. Na rozdíl od MTT nejsou metabolizovány všemi typy buněk.

Předností těchto testů je možnost provedení na 96-jamkové destičce a tedy kvantifikace velkého počtu vzorků v krátkém čase. Nevýhodou je, že ne všechny buňky v dané kultuře jsou metabolicky aktivní, tudíž nám tato metoda nepodává přesnou informaci o buněčné proliferaci, ale pouze o metabolické aktivitě [5].

2.2.6 Měření DNA syntézy

Jelikož buněčné dělení vyžaduje replikaci jaderné DNA, monitorování DNA syntézy je dalším vhodným parametrem pro měření proliferace [11].

Tato technika využívá schopnosti buněk zainkorporovat značený prekurzor do DNA během S-fáze buněčného cyklu [7].

2.2.6.1 Radioaktivní měření DNA syntézy

Jako DNA prekurzory se tradičně užívají radioaktivně značené nukleotidy, zejména $[^3\text{H}]$ -thymidin. Množství $[^3\text{H}]$ -thymidinu inkorporovaného do buněčné DNA je kvantifikováno pomocí scintilačního počítače [5].

Nevýhodou práce s $[^3\text{H}]$ -thymidinem jsou vysoké nároky na cenu a čas, potřeba radioizotopů, problémy s likvidací radioaktivního odpadu, požadavky na speciální vybavení a riziko spojené se zacházením s radioaktivním materiálem a scintilační tekutinou [12].

2.2.6.2 Neradioaktivní měření DNA syntézy

Vhodnou neradioaktivní alternativou měření buněčné syntézy se ukázalo použití thymidinového analogu 5-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU), který je do buněčné DNA inkorporován místo thymidinu. Detekce inkorporovaného BrdU se provádí pomocí monoklonální protilátky specificky rozeznávající BrdU. Měření DNA syntézy je možno provést s využitím imunocytochemie, kdy počítáme značená jádra pod mikroskopem, nebo pomocí BrdU - enzymové imunoanalýzy [13].

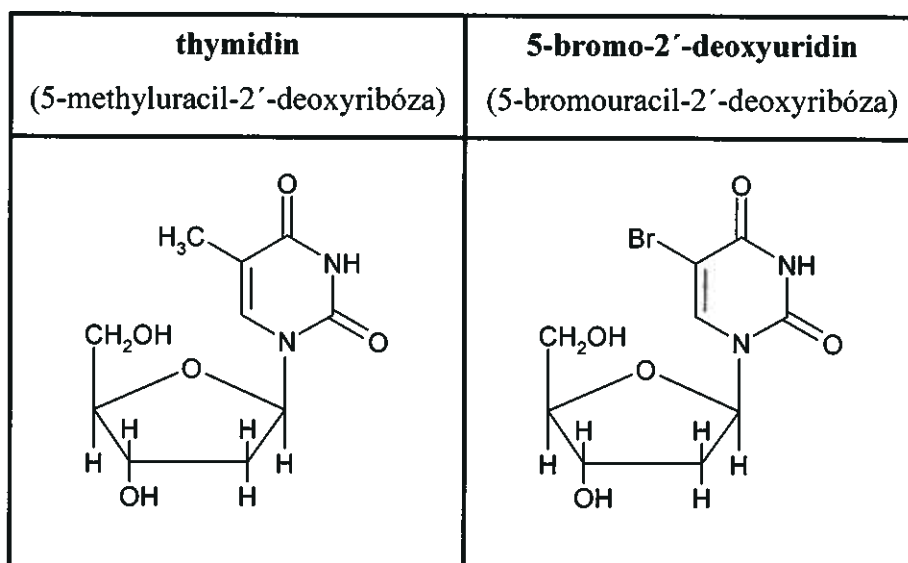
Užití BrdU pro testování buněčné proliferace obchází nevýhody spojené s použitím radioaktivního thymidinu. Tato metoda není tak časově a finančně náročná, je méně pracná a především nevyžaduje použití radioaktivních izotopů a speciálního vybavení [14].

Nezanedbatelnou předností této technologie je možnost provedení celé metody, od počátečního nasazení buněk až po měření proliferace, na jediné mikrotitrační destičce [12]. Toto uspořádání dovoluje relativně rychlou kvantifikaci DNA syntézy u velkého počtu vzorků [13].

2.3 BrdU – enzymová imunoanalýza (ELISA)

Klasické značení nově syntetizované DNA pomocí radioaktivně značeného thymidinu bylo v minulosti nejčastější používanou metodou pro stanovení buněčné proliferace. Dnes je tento způsob nahrazován neradioaktivním značením pomocí BrdU [15].

Jak již bylo uvedeno, 5-bromo-2'-deoxyuridin je chemický analog thymidinu, který je inkorporován proliferujícími buňkami do nově vzniklé DNA během S-fáze buněčného cyklu a je užíván jako alternativa pro značení proliferujících buněk [^3H]-thymidinem [16].



Obr. 4 Chemická struktura thymidinu a 5-bromo-2'-deoxyuridinu

2.3.1 Protilátka proti BrdU

Inkorporovaný BrdU je detekován kvantitativní buněčnou enzymovou imunoanalýzou (ELISA) užívající monoklonální protilátku proti BrdU.

Protilátka použitá v této práci se váže k BrdU inkorporovanému do DNA po předchozí fixaci, denaturaci a částečné degradaci DNA. Specificky rozeznává BrdU, nereaguje s endogenními buněčnými molekulami jako je thymidin či uridin [11].

Jedná se o primární protilátku, jež je konjugovaná s enzymem – křenovou peroxidázou (POD), který štěpí použitý substrát. Konjugace s POD umožňuje přímou detekci inkorporovaného BrdU [17].

2.3.2 Substráty pro BrdU-ELISA

Inkorporovaný BrdU může být detekován s použitím chemiluminiscenčního nebo kolorimetrického substrátu [13].

Chemiluminiscenční substrát

Chemiluminiscenční substrát použitý v této práci obsahuje peroxid vodíku, luminol a 4-iodofenol.

Křenová peroxidáza v přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje oxidaci diacylhydrazidů jako je luminol. Touto reakcí vzniká produkt v excitovaném stavu, který se navrácí do stavu základního emisí světelné energie. Silné zesílení světelné emise je dosaženo pomocí 4-iodofenolu, jež funguje jako přenašeč radikálů mezi vznikajícím radikálem kyslíku a luminolem [17].

Kolorimetrický substrát

Jako kolorimetrický substrát byl použit 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidin (TMB).

Původně žlutý TMB je v přítomnosti křenové peroxidázy přeměňován na modrý produkt. Pro získání optimální citlivosti, může být enzymatická reakce po

stanovené době zastavena použitím kyseliny sírové a barva produktu se změní opět na žlutou [18].

2.4 Absorpční fotometrie

Absorpční fotometrie je optická metoda, která se zabývá kvantitativním hodnocením změny intenzity záření určité vlnové délky po průchodu analytickým prostředím [19].

Prochází-li homogenním prostředím elektromagnetické záření definované vlnové délky, zeslabuje se jeho počáteční intenzita o podíl, který je tímto prostředím absorbován. Absorpcí záření se zvýší energie molekuly, čímž se dostává ze svého základního stavu o nejmenší energii do stavu excitovaného o vyšší energii.

Základním vztahem pro absorpční fotometrii je Lambertův-Beerův-Bouguerův zákon:

$$\log I_0 / I = A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

I_0intenzita světelného paprsku vstupujícího do měřeného prostředí

Iintenzita světelného paprsku z měřeného prostředí vystupujícího

Aabsorbance

ε molární absorpční koeficient [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

cmolární koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

ldélka optické dráhy (tloušťka vrstvy) [cm]

Z tohoto zákona vyplývá, že absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce absorbující vrstvy.

Lambertův-Beerův-Bouguerův zákon platí pouze pro monochromatické záření, tedy záření úzkého spektrálního charakteru, které je možné získat pomocí monochromátorů nebo spektrálními filtry [20].

Přístroje, které se používají k měření intenzity záření, se nazývají fotometry nebo spektrofotometry. Fotometry jsou jednodušší a k vymezení úzkého pásma vlnových délek používají spektrální filtry, které z původního polychromatického záření propouštějí jenom více nebo méně širokou část. Takto získané světlo není přísně monochromatické. Lze tedy měřit jen při těch vlnových délkách, které nám filtry umožňují separovat. Spektrofotometry používají monochromátor (mřížka nebo hranol), který dovoluje kontinuálně měnit vlnovou délku měření v širokém

intervalu. Mimoto má spektrofotometr zpravidla citlivější detektor než fotometr a obvyklé jsou zde také dva zdroje světla (zvláště pro ultrafialovou a zvláště pro viditelnou oblast světla).

Všechny fotometry a spektrofotometry se stávají ze tří základních částí. Mezi ně patří zdroj zářivé energie, filtr nebo mřížka či hranol pro izolaci úzkého pásma zářivé energie a detektor měřící energii propuštěnou vzorkem.

Současné absorpční fotometry jsou vždy jednopaprskové, zatímco spektrofotometry mohou být jednopaprskové nebo dvoupaprskové. U dvoupaprskových spektrofotometrů paprsky procházejí jak roztokem vzorku, tak roztokem slepé zkoušky (blanku) [19].

2.5 Chemiluminiscence

Luminiscence obecně vzniká vyzářením kvant světla (fotonů) při přechodu světélkující látky (luminoforu) z energeticky bohatšího (excitovaného) stavu do stavu základního [20].

V případě chemiluminiscence je vznik a vyzáření světla podmíněno chemickou reakcí.

Při chemické reakci musí vznikat dostatek energie, aby došlo k excitaci elektronů, proto musí být reakce exotermní, obvykle se jedná o oxidaci.

Excitovaný produkt musí být schopný ztrácet svoji energii buď ve formě fotonu, nebo ji převádět na fluoreskující sloučeniny. Přímá emise fotonu z excitovaného produktu obvykle poskytuje krátké záblesky světla, zatímco transfer energie na fluoreskující sloučeniny se většinou projevuje jako dlouhodobá (v minutách) světelná emise.

Kvantový výtěžek (poměr celkového počtu emitovaných fotonů a celkového počtu zreagovaných molekul) se pohybuje u chemiluminiscence v rozmezí 0.1 až 10 %. Citlivost chemiluminiscenčních metod je přesto obvykle významně vyšší než u izotopových metod.

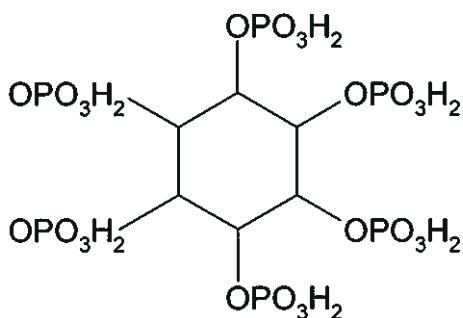
Přístrojové vybavení pro tuto techniku je pestré: od jednoduchých luminometrů až po vysoce automatizované chemiluminiscenční analyzátory, ve

kterých se provádí imunochemické reakce s chemiluminiscenční detekcí. Standardní luminometry nemají žádný zdroj světla ani filtr [19].

2.6 Inositolhexafosfát

Přes veškerý pokrok v poznání onkologické patofyziologie zůstává rakovina jedním z hlavních zdravotních problémů v rozvinutých zemích světa [21]. Veškeré úsilí vědy je zaměřeno především na hledání nových možností v oblasti terapie a prevence tohoto onemocnění [22].

Předmětem výzkumu je celá řada látek, z nichž některé mohou tvořit součást přirozené stravy. V poslední době je mezi jinými v popředí také inositolhexafosfát (IP_6), jehož role v oblasti onkologické terapie a prevence se stala podnětem k řadě studií [23].



Obr. 5 Chemická struktura inositolhexafosfátu

2.6.1 Výskyt

Inositolhexafosfát (IP_6) neboli kyselina fytová je přirozeně se vyskytující polyfosforylovaný uhlovodík, ester kyseliny fosforečné a alkoholu inositolu.

IP_6 se vyskytuje v celé řadě rostlin. Ve vysokých koncentracích je obsažen především v obilovinách a luštěninách, dále pak v sojových bobech, kukuřici, oříšcích, semenech atd. U klíčících rostlin představuje IP_6 primární zdroj energie [24].

Inositolhexafosfát a inositolfosfáty s nižším stupněm fosforylace (IP₁₋₅) se také nacházejí ve většině savčích buněk, kde jejich role spočívá v regulaci rozmanitých buněčných funkcí, jako je přenos signálu, buněčná proliferace a diferenciace [25].

2.6.2 Spektrum účinku

Detailní výzkum úlohy inositolhexafosfátu v organismu postupně odhalil řadu prospěšných biologických účinků, z nichž nejpřekvapivější bylo objevení jeho protinádorové aktivity, jenž byla prokázána prostřednictvím *in vitro* případně *in vivo* studií (na zvířecím modelu) u různých typů nádorů [23, 26].

Kromě antikancerogenního účinku vykazuje IP₆ další biologické vlastnosti. Má schopnost vyvazovat nadbytečné minerály a tím umožňuje snížení kalcie a redukci rizika urolitiázy. Jeho inhibiční účinek na agregaci krevních destiček poukazuje na významnou roli v oblasti kardiovaskulárních chorob. Další účinky IP₆ zahrnují hypocholesterolemický efekt, modulaci uvolňování inositolu a inhibici replikace HIV-1 viru [27].

2.6.3 Mechanismus protinádorového účinku

Přesný mechanismus protinádorového působení IP₆ není dosud zcela znám. Předpokládá se, že existuje několik možných způsobů, kterými IP₆ vykonává svou antikancerogenní aktivitu [25, 28].

IP₆ ovlivňuje typické charakteristické vlastnosti nádorových buněk, jako je nekontrolovatelná buněčná proliferace, schopnost adheze, migrace a invaze [29, 30]. Dále inhibuje angiogenezi, indukuje apoptózu, stimuluje imunitní systém a působí jako antioxidant [31, 32, 33, 34].

2.6.3.1 Inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy

Perorálně podaný IP_6 je rychle absorbován buňkami gastrointestinálního traktu. V nich je poté defosforylován na inositolfosfáty s nižším stupněm fosforylace (IP_{1-5}), jejichž zapojení v přenosu buněčného signálu může mít vliv na regulaci buněčného cyklu, růst a diferenciaci nádorových buněk. Takto vzniklé IP_{1-5} jsou z buněk gastrointestinálního traktu transportovány krevní cestou k ostatním buňkám organismu, ať už zdravým či nádorovým [35, 36].

Podáním IP_6 tedy dochází ke zvýšení intracelulárních zásob inositolfosfátů, což může být jednou z příčin antikancerogenního působení IP_6 . Touto cestou IP_6 nejspíš snižuje nekontrolovanou buněčnou proliferaci, hlavní charakteristický znak nádorových buněk. IP_6 může regulovat buněčný cyklus blokadou buněčného dělení a zvýšením diferenciace buněk nebo vyvoláním apoptózy. Zvýšení diferenciace může vyústit v reverzi k normálnímu fenotypu. IP_6 významně omezuje S-fázi buněčného cyklu a způsobuje zablokování buněk v G_0 -fázi, čímž se znemožní jejich přechod do fáze G_1 [30].

2.6.3.2 Inhibice vzniku metastáz

Další důležitou charakteristikou rakoviny je schopnost infiltrovat zdravou normální tkáň. Bylo prokázáno, že inositolhexafosfát významně ovlivňuje adhezi, migraci a invazi nádorových buněk.

IP_6 inhibuje sekreci matrixových metaloproteináz, proteolytických enzymů vyžadujících ke své aktivitě zinek. Tyto enzymy umožňují přestup nádorových buněk do cévního systému, čímž dochází k jejich migraci do okolních tkání a k tvorbě metastáz [37].

2.6.3.3 Inhibice angiogeneze

Nádory také produkují velké množství vaskulárního endoteliálního faktoru, který podněcuje angiogenezi, utváření nových cév. Tyto cévy zajišťují přísun živin

k vzniklému nádoru a tím umožňují jeho růst. IP₆ snižuje růst a diferenciaci endoteliálních buněk a inhibuje sekreci vaskulárního endoteliálního faktoru z nádorových buněk [31].

2.6.3.4 Stimulace imunitního systému

Zvýšení intracelulární zásoby inositolfosfátů také zesiluje cytotoxický účinek natural killer buněk (NK buňky). Posílení aktivity NK buněk zvyšuje imunitní reakci organismu na hrozbu představovanou rakovinou, neboť tyto buňky působí destrukci buněk nádorových [32].

2.6.3.5 Antioxidační aktivita

Další možností, jak IP₆ ovlivňuje vznik a rozvoj rakoviny, se jeví jeho antioxidační aktivita. Fosfátové skupiny v pozici 1, 2 a 3 (v poloze axiální-ekvatoriální-axiální) umožňují inositolhexafosfátu specifické interakce s dvojjaznými kationty jako je železo, zinek, magnesium, měď atd. [33].

Chelatací železa IP₆ inhibuje jeho schopnost katalyzovat vznik volných hydroxylových radikálů a dalších reaktivních forem kyslíku, jež jsou zodpovědné za buněčné poškození a kancerogenezi [34, 38].

Schopnost IP₆ chelatovat magnesium a zinek může významně ovlivnit progresi daného nádoru, neboť oba tyto dvojjazné kationty jsou nezbytné pro buněčnou proliferaci [39].

3 CÍL PRÁCE

3 CÍL PRÁCE

Cíle stanovené pro tuto práci:

1. Optimalizovat stanovení inkorporace BrdU do DNA syntetizované *de novo*.
2. Porovnat výhody a nevýhody použití dvou různých substrátů v metodě inkorporace BrdU s ohledem na jejich chemiluminiscenční a kolorimetrickou detekci.
3. Aplikovat metodu inkorporace BrdU pro stanovení proliferace buněk *in vitro* po ovlivnění inositolhexafosfátem.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a pomůcky

96-jamkové transparentní mikrotitrační destičky (kat. č. 167 008),

Nunclon

96-jamkové černé mikrotitrační destičky s transparentním plochým dnem

(kat. č. 655 090), Greiner Bio-One

Analytické váhy HA-180M, HASeries

Autokláv Ecosteri, BMT

Automatické pipety Finnpiette a jednorázové špičky

Injekční stříkačka + filtr (0,20 μm), Sartorius

Invertovaný mikroskop CK 2, Olympus

Laminární box BSB 48, ICN Flow

Magnetická míchačka RH-KT/C, IKA

Neubauerova komůrka

Pasážovací láhve, Nunclon

pH metr pH 212, HANNA instruments

Skleněné pipety

SPEKTRAFUOR PLUS, Tecan

Termostat IG 150, JOUAN

Vodní lázeň, Memmert

4.2 Chemikálie

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (kat. č. 16 880-1G), Fluka

Anti-bromodeoxyuridine-POD, Fab fragments (kat. č. 1 585 860), Roche

Blocking reagent for ELISA (kat. č. 1 112 589), Roche

BM blue, POD substrate, soluble (kat. č. 1 484 281), Roche

BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD) (kat. č. 1 582 950), Roche

Dulbecco's Modified Eagles medium (D-MEM), Sevapharma

Hydrogenuhličitan sodný (kat. č. 823), Sevapharma

Fetální telecí sérum (FTS) (kat. č. 1502-P206008), PAN™
PBS bez Ca a Mg iontů (fosfátový pufr) (kat.č. P04-53500), PAN™
Penicilin/Streptomycin (kat. č. P06-07100), PAN™
Trypsin 0,05 % + EDTA (kat. č. P10-22100), PAN™
Aqua pro injectione, Ardeapharma a.s.
Bovinní sérový albumin (BSA) (kat. č. A 8022), Sigma
L-glutamin (kat. č. G 7513), Sigma
Nutrient Mixture F-12 Ham (F12) (kat. č. N 4888), Sigma
Phytic acid dipotassium salt (inositolhexafosfát) (kat. č. P 5681), Sigma
Triton X-100 (kat. č. T 9284), Sigma
Ethanol, Lachema a.s.
Formaldehyd, Lachema a.s.
Hydroxid sodný, Lachema a.s.
Kyselina chlorovodíková, Lachema a.s.
Kyselina sírová, Lachema a.s.
Methanol, Lachema a.s.

4.3 Biologický materiál

Buněčná linie SW 620 (Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha,
Dr. Šloncová)

- původ: lidský kolorektální adenokarcinom
metastázující v lymfatické uzlině
- charakteristika: stacionární linie

4.4 Příprava reagensů pro pasážování buněk

PBS bez Ca a Mg iontů: koncentrovaný roztok před použitím 10x naředit
Aqua pro injectione

Trypsin 0,05 % + EDTA: koncentrovaný roztok před použitím 10x zředit
PBS bez iontů

D-MEM + 10 % FTS (500 ml): 50 ml FTS
45 ml D-MEM
7 ml NaHCO₃
5 ml penicilinu/streptomycinu
do 500 ml doplnit Aqua pro injectione

4.5 Pasážování buněk

Buněčná linie SW 620 byla pasážována v pravidelných intervalech 2x týdně. Před každým pasážováním byl nejprve pod invertovaným mikroskopem zkontrolován nárůst monolayeru (jedna souvislá vrstva buněk na dně kultivační láhve), kondice jednotlivých buněk a případná přítomnost kontaminace. Poté bylo z kultivační láhve odstraněno spotřebované kultivační médium do sterilní skleněné lahvičky. Za účelem uvolnění buněk ze dna láhve byly buňky 3x opláchnuty 2 ml 0,05 % trypsinu + EDTA. Láhev s malým množstvím 0,05 % trypsinu + EDTA byla uložena na 5 minut do termostatu. Po uvolnění buněk ze dna kultivační láhve byly buňky oplachovány a resuspendovány v 10 ml média (D-MEM + 10 % FTS). 0,05 % trypsin + EDTA i médium byly před použitím vytemperovány ve vodní lázni na teplotu 37 °C. V láhvi bylo ponecháno 2 ml buněčné suspenze a ta byla doplněna do 10 % objemu láhve médiem. Po promíchání média s buněčnou směsí kývavým pohybem byla láhev umístěna do termostatu. Do dalšího pasážování byly buňky kultivovány v termostatu při 37 °C ve vlhké atmosféře s příměsí 5 % CO₂.

4.6 Příprava roztoků pro BrdU-ELISA

Roztok	Příprava	Uchovávání / Stabilita
BrdU (zásobní roztok) (10 mM)	rozpustit 20 mg BrdU (Mr 307,1) v 6,5 ml PBS bez iontů, přefiltrovat přes 0,2 µm filtr, rozpipetovat po alikvotech	uchovávat v alikvotech při -15 až -25°C
BrdU (pracovní roztok) (100 µM)	zředit zásobní roztok se sterilním kulturním médiem (1 díl média + 99 dílů BrdU)	BrdU (pracovní roztok) je stabilní 1 měsíc, pokud je uchováván při 2-8°C bez přístupu světla
Anti-BrdU-POD (zásobní roztok) (15 U/ml)	rozpustit v 1 ml Aqua pro injectione, rozpipetovat po alikvotech	roztok je stabilní 6 měsíců, je-li uchováván při 2-8°C
Anti-BrdU-POD (pracovní roztok) (0,2 U/ml)	zředit zásobní roztok s PBS bez iontů obsahujícím 1 % BSA (20 µl Anti-BrdU-POD + 1480 µl PBS)	připravit krátce před užitím
Blocking reagent (zásobní roztok)	rozpustit ve 100 ml Aqua pro injectione, 30 minut míchat při pokojové teplotě, autoklávovat, rozpipetovat po alikvotech	roztok je stabilní 6 měsíců, pokud je uchováván při -15 až -20°C
Blocking reagent (pracovní roztok)	zředit s Aqua pro injectione (1 díl Blocking reagent + 9 dílů Aqua pro injectione)	připravit krátce před užitím
BM Chemiluminiscence ELISA Substrate (POD) (pracovní roztok)	smíchat roztok A a roztok B (99 dílů A + 1 díl B), míchat 15 minut	roztok je stabilní 1 týden, pokud je uchováván při 2-8°C bez přístupu světla

4.7 Optimalizace pracovního postupu

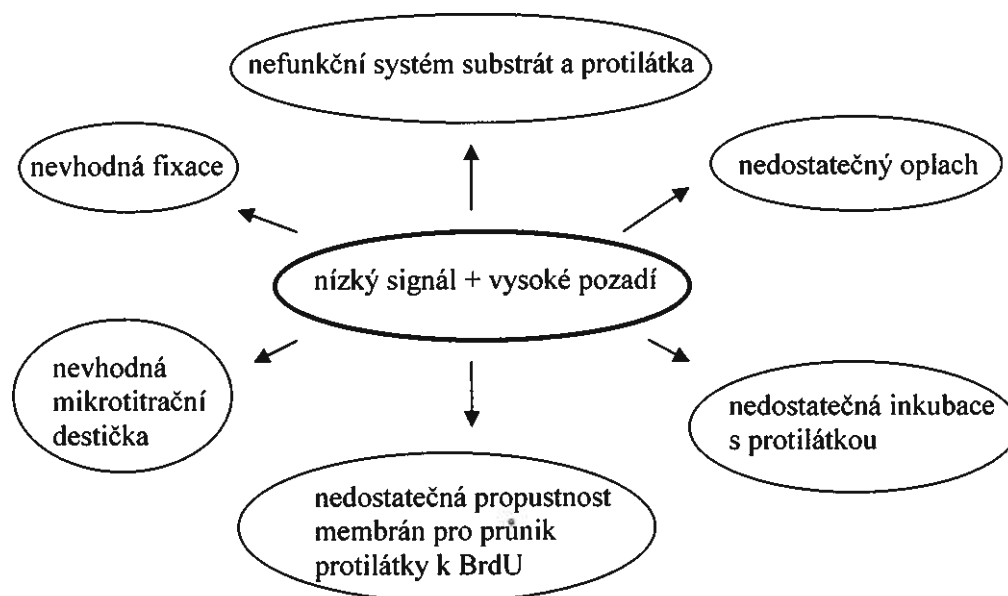
Pracovní postup byl nejprve proveden podle návodů firmy Roche dodaných společně s jednotlivými reagensy.

číslo kroku		objem/ jamku	podmínky inkubace
1	nasadit buněčnou suspenzi na mikrotitrační destičku	200 μ l	
	kultivovat 24 hodin v termostatu		37°C, vlhká atmosféra s příměsí 5 % CO ₂
2	přidat BrdU (pracovní roztok)	20 μ l	
	inkubovat 24 hodin v termostatu		37°C, vlhká atmosféra s příměsí 5 % CO ₂
3	odstranit kultivační médium z jamek mikrotitrační destičky		
4	jemně opláchnout pomocí PBS bez iontů	200 μ l	
5	přidat MeOH	100 μ l	
	inkubovat 5 minut		15-25°C
	odstranit MeOH vyklepnutím		
6	1 x opláchnout PBS bez iontů	200 μ l	
7	přidat blocking reagent (pracovní roztok)	200 μ l	
	inkubovat 15 minut		15-25°C
	odstranit blocking reagent vyklepnutím		
10	3x opláchnout PBS bez iontů	200 μ l	
11	přidat Anti-BrdU-POD (pracovní roztok)	50 μ l	

	inkubovat 30 minut		15-25°C
	odstranit Anti-BrdU-POD vyklepnutím		
12	3x opláchnout PBS bez iontů (PBS nechat v jamce působit 5 minut)	200 µl	
13	osušit mikrotitrační destičku na buničině		
14	přidat BM chemiluminescence ELISA substrate (prac. roztok)	100 µl	
	inkubovat na třepače 3 minuty		15-25°C
15	měřit chemiluminiscenci na přístroji SPECTRAFLUOR PLUS		

Tímto postupem nebyly získány uspokojivé výsledky, neboť hodnoty chemiluminescence v měřených jamkách se nelišily od hodnot blanku (buňky bez přidání BrdU).

4.7.1 Možné příčiny nízkého signálu a vysokého pozadí



- **Nevhodná mikrotitrační destička**

Při použití transparentní destičky pronikalo vznikající světlo do sousedních jamek, proto byla pro měření chemiluminiscence nahrazena transparentní destička černou destičkou s transparentním plochým dnem.

- **Nefunkční systém protilátka + substrát**

Pro ověření funkčnosti systému protilátka + substrát byla změřena kinetika enzymatické reakce BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD) + Anti-BrdU-POD. Do 5 jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μ l BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD) (pracovní roztok) a 0,5 μ l Anti-BrdU-POD (pracovní roztok). Poté byla měřena kinetika probíhající enzymatické reakce. Tímto způsobem byla ověřena aktivita testovaného systému.

- **Nedostatečná inkubační doba s protilátkou**

Inkubace s Anti-BrdU-POD byla prodloužena na 2 hodiny.

- **Nedostatečný oplach**

Počet oplachů po odstranění Anti-BrdU-POD byl zvýšen ze tří na pět, avšak tato úprava nepřinesla požadovaný výsledek.

- **Nevhodná fixace**

Postupně byly testovány různé způsoby fixace:

MeOH (100 μ l na jamku, 5 minut)

10 % HCHO (100 μ l na jamku, 10 minut)

70 % EtOH (100 μ l na jamku, 5 minut)

Jako nejvhodnější se ukázala fixace 70 % EtOH

- **Nedostatečná propustnost membrán pro průnik protilátky k BrdU**

Pro zvýšení propustnosti membrán byl nejprve použit 0,1 % Triton (100 μ l/jamku, 5 minut), avšak tato permeabilizace byla nedostatečná, proto se přistoupilo k permeabilizaci pomocí 2,3 M HCl.

4.8 Optimalizovaný postup BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí

číslo kroku		objem/ jamku	podmínky inkubace
1	nasadit buněčnou suspenzi na černou mikrotitrační destičku	200 μ l	
	kultivovat 24 hodin v termostatu		37°C, vlhká atmosféra s příměsí 5 % CO ₂
2	přidat BrdU (pracovní roztok)	20 μ l	
	inkubovat 24 hodin v termostatu		37°C, vlhká atmosféra s příměsí 5 % CO ₂
3	odstranit kultivační médium z jamek mikrotitrační destičky		
4	jemně opláchnout pomocí PBS bez iontů	200 μ l	
5	přidat 70 % EtOH	100 μ l	
	inkubovat 5 minut		15-25°C
	odstranit 70 % EtOH vyklepnutím		
6	1 x opláchnout PBS bez iontů	200 μ l	
7	přidat 2,3 M HCl	100 μ l	
	inkubovat 30 minut		15-25°C
	odstranit 2,3 M HCl vyklepnutím		
8	2x opláchnout PBS bez iontů	200 μ l	
9	přidat blocking reagent (pracovní roztok)	200 μ l	

	inkubovat 15 minut		15-25°C
	odstranit blocking reagent vyklepnutím		
10	3x opláchnout PBS bez iontů	200 µl	
11	přidat Anti-BrdU-POD (pracovní roztok)	50 µl	
	inkubovat 2 hodiny		15-25°C
	odstranit Anti-BrdU-POD vyklepnutím		
12	3x opláchnout PBS bez iontů (PBS nechat v jamce působit 5 minut)	200 µl	
13	osušit mikrotitrační destičku na buničině		
14	přidat BM chemiluminescence ELISA substrate (pracovní roztok)	100 µl	
	inkubovat na třepače 3 minuty		15-25°C
15	měřit chemiluminiscenci na přístroji SPECTRAFLUOR PLUS		

4.9 Optimalizovaný postup BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí

číslo kroku		objem/ jamku	podmínky inkubace
1	nasadit buněčnou suspenzi na transparentní mikrotitrační destičku	200 μ l	
	kultivovat 24 hodin v termostatu		37°C, vlhká atmosféra s příměsí 5 % CO ₂
2	přidat BrdU (pracovní roztok)	20 μ l	
	inkubovat 24 hodin v termostatu		37°C, vlhká atmosféra s příměsí 5 % CO ₂
3	odstranit kultivační médium z jamek mikrotitrační destičky		
4	jemně opláchnout pomocí PBS bez iontů	200 μ l	
5	přidat 70 % EtOH	100 μ l	
	inkubovat 5 minut		15-25°C
	odstranit 70 % EtOH vyklepnutím		
6	1 x opláchnout PBS bez iontů	200 μ l	
7	přidat 2,3 M HCl	100 μ l	
	inkubovat 30 minut		15-25°C
	odstranit 2,3 M HCl vyklepnutím		
8	2x opláchnout PBS bez iontů	200 μ l	
9	přidat blocking reagent (pracovní roztok)	200 μ l	

	inkubovat 15 minut		15-25°C
	odstranit blocking reagent vyklepnutím		
10	3x opláchnout PBS bez iontů	200 µl	
11	přidat Anti-BrdU-POD (pracovní roztok)	50 µl	
	inkubovat 2 hodiny		15-25°C
	odstranit Anti-BrdU-POD vyklepnutím		
12	3x opláchnout PBS bez iontů (PBS nechat v jamce působit 5 minut)	200 µl	
13	osušit mikrotitrační destičku na buničině		
14	přidat BM blue, POD substrate	100 µl	
	inkubovat 5 minut		15-25°C
15	přidat 1M H₂SO₄	25 µl	
	inkubovat 1 minutu na třepačce		15-25°C
16	měřit absorbanci na přístroji SPECTRAFLUOR PLUS		

4.10 Optimalizace koncentrace Anti-BrdU-POD

Na 96-jamkovou mikrotitrační destičku byla nasazena buněčná suspenze SW 620 v D-MEM + 10 % FTS o koncentraci 20 000, 10 000, 5 000 a 2 500 buněk na jamku, a to vždy dva sloupce po 6 jamkách pro danou koncentraci. K jednomu sloupci bylo v pokusu přidáno 50 μ l na jamku protilátky Anti-BrdU-POD o koncentraci 0,20 U/ml a ke druhému 50 μ l na jamku o koncentraci 0,80 U/ml. Pro koncentrace 20 000 a 2 500 buněk na jamku byl nasazen blank (buňky bez přidání BrdU). Pro další koncentrace byl blank vypočítán z kalibrační křivky, která byla vytvořena z výše zmíněných dvou buněčných koncentrací.

Optimalizace koncentrace protilátky byla z finančních důvodů provedena pouze u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí.

4.11 Citlivost

Na 96-jamkovou mikrotitrační destičku byla nasazena buněčná suspenze SW 620 o různé koncentraci buněk: 20 000, 10 000, 5 000, 2500, 625 a 313 buněk na jamku a to vždy 6 jamek pro danou koncentraci. Pro koncentrace 20 000 a 312,5 buněk na jamku byl nasazen blank (6 jamek), pro další koncentrace byl blank vypočítán z kalibrační křivky.

Citlivost byla měřena u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční i kolorimetrickou detekcí.

4.12 Kinetika reakce

Průběh reakce byl sledován u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční i kolorimetrickou detekcí pro koncentrace 20 000 a 5 000 buněk na jamku (vždy 6 jamek pro danou koncentraci). Ke každé koncentraci byl nasazen blank (6 jamek). Signál byl měřen v intervalu 2 minuty. Celkový počet měřených cyklů byl 31.

4.13 Opakovatelnost

Opakovatelnost u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční a kolorimetrickou detekcí byla měřena celkem šestkrát. Stanovení se provádělo jednou týdně.

Na destičku byla nasazena buněčná suspenze SW 620 o koncentraci 6 000 buněk na jamku (5 jamek) a blank (5 jamek).

4.14 Kvantitativní stanovení buněčné proliferace po ovlivnění buněk inositolhexafosfátem

4.14.1 Příprava reagensí

F12 + 1 % FTS + 1 mM Gln (100 ml): 1 ml 1 % FTS

1 ml penicilinu/streptomycinu

0,5 ml 200 mM Gln

do 100 ml doplnit F12

Zásobní roztok IP₆ (50 mM) (10 ml):

navážit 368,11 mg Phytic acid dipotassium salt a rozpustit v 9,5 ml PBS bez iontů, přidat 400 μ l 5M NaOH, upravit pH na hodnotu 7,4 pomocí 0,5M NaOH a doplnit do 10 ml PBS bez iontů, zfiltrovat přes 0,2 μ m filtr

4.14.2 Příprava médií o různé koncentraci IP₆

médium	koncentrace IP ₆ (mM)	F12 + 1 % FTS + 1 mM Gln	zásobní roztok IP ₆ (50 mM)	PBS bez iontů
1	0 (kontrola + blank)	10,5 ml	-	1 500 μ l
2	0,2	7,875 ml	36 μ l	1 089 μ l
3	1	7,875 ml	180 μ l	945 μ l
4	5	7,875 ml	900 μ l	225 μ l

4.14.3 Postup

Na tři 96-jamkové destičky byla nasazena buněčná suspenze SW 620 v D-MEM + 10 % FTS o koncentraci 6 000 buněk na jamku. Po 24-hodinové inkubaci v termostatu (37°C, vlhká atmosféra s příměsí 5 % CO₂) bylo z jamek každé destičky odsáto médium a buňky byly opláchnuty PBS bez iontů (200 µl na jamku). Poté bylo do 3 sloupců po 5 jamkách (2 sloupce pro kontrolu a 1 pro blank) přidáno médium 1 (200 µl na jamku), do 2 sloupců médium 2, do 2 sloupců médium 3 a do dalších 2 sloupců médium 4. Tento krok byl proveden s každou ze tří destiček. Potom byly destičky opět uloženy v termostatu.

Po 20-hodinové inkubaci byl k buňkám první destičky přidán BrdU (pracovní roztok) a buňky byly opět umístěny do termostatu. Po uplynutí 4 hodin byla provedena BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí. Druhá destička byla před přidáním BrdU inkubována v termostatu 44 hodin a třetí 68 hodin.

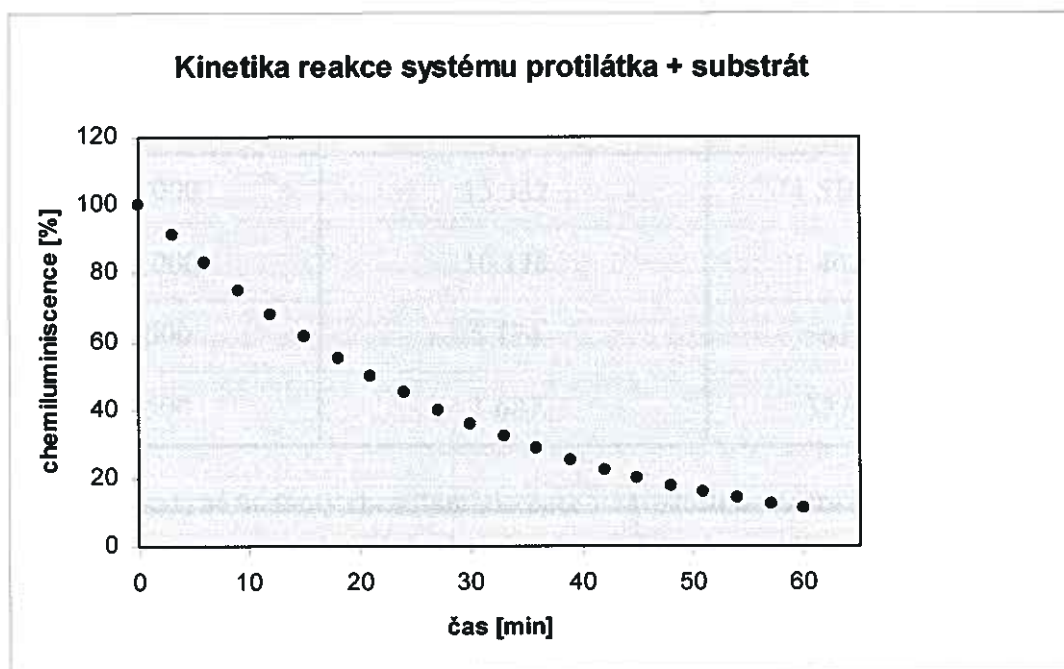
Délka inkubace s BM chemiluminescence ELISA substrate (POD) (pracovní roztok) byla v tomto případě prodloužena na 6 minut.

5 VÝSLEDKY

5.1 Kinetika reakce systému protilátka + substrát

Podmínky měření na přístroji SPEKTRAFLUOR PLUS: délka integrace: 1 000 ms

výtěžek: 100



Graf 1 Kinetika reakce systému Anti-BrdU-POD a BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD)

Proměřením kinetiky reakce systému protilátka (Anti-BrdU-POD) + substrát (BM Chemiluminescence ELISA Substrate) byla ověřena funkčnost tohoto systému. Zároveň byl také sledován pokles hodnoty chemiluminiscence v čase. Hodnoty chemiluminiscence byly přepočteny na procenta, přičemž hodnota 100 % byla přiřazena hodnotě chemiluminiscence v čase 0 minut.

5.2 Optimalizace koncentrace Anti-BrdU-POD

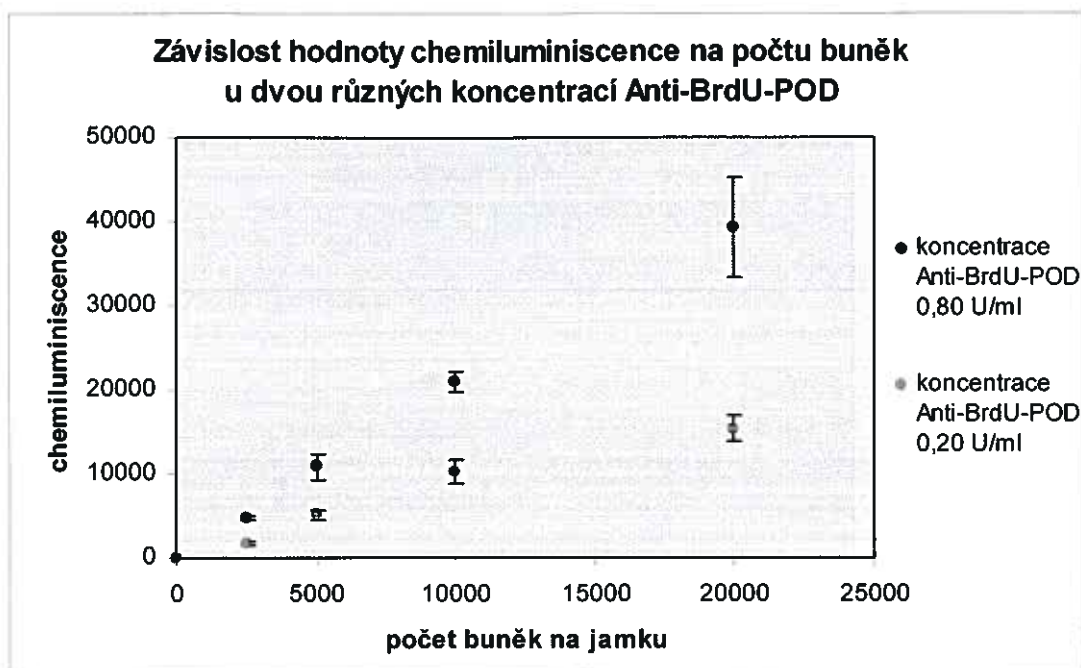
Podmínky měření na přístroji SPEKTRAFUOR PLUS: délka integrace: 1 000 ms
výtěžek: 120

počet buněk na jamku	chemiluminiscence (průměr)	SD
20 000	15 332	1 518
10 000	10 178	1 442
5 000	5 174	561
2 500	1 687	337

Tab. 1 Průměrné hodnoty chemiluminiscence v závislosti na počtu buněk na jamku u koncentrace Anti-BrdU-POD 0,20 U/ml

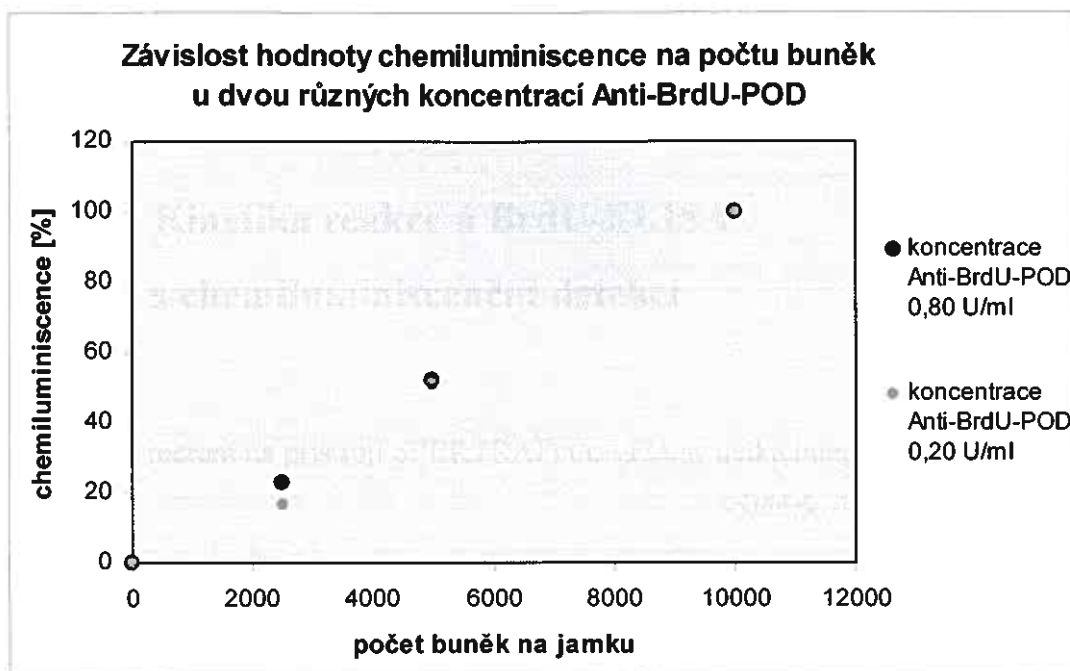
počet buněk na jamku	chemiluminiscence (průměr)	SD
20 000	39 336	5 981
10 000	20 912	1 202
5 000	10 857	1 560
2 500	4 749	288

Tab. 2 Průměrné hodnoty chemiluminiscence v závislosti na počtu buněk na jamku u koncentrace Anti-BrdU-POD 0,80 U/ml



Graf 2 Závislost hodnoty chemiluminiscence na počtu buněk u dvou různých koncentrací Anti-BrdU-POD

Cílem optimalizace koncentrace Anti-BrdU-POD bylo posoudit, jak koncentrace použité protilátky ovlivňuje rozsah linearitu a průběh reakce ve vztahu k počtu buněk. Z grafu vyplývá, že v případě použití koncentrace 0,20 U/ml je metoda lineární pouze do počtu 10 000 buněk.



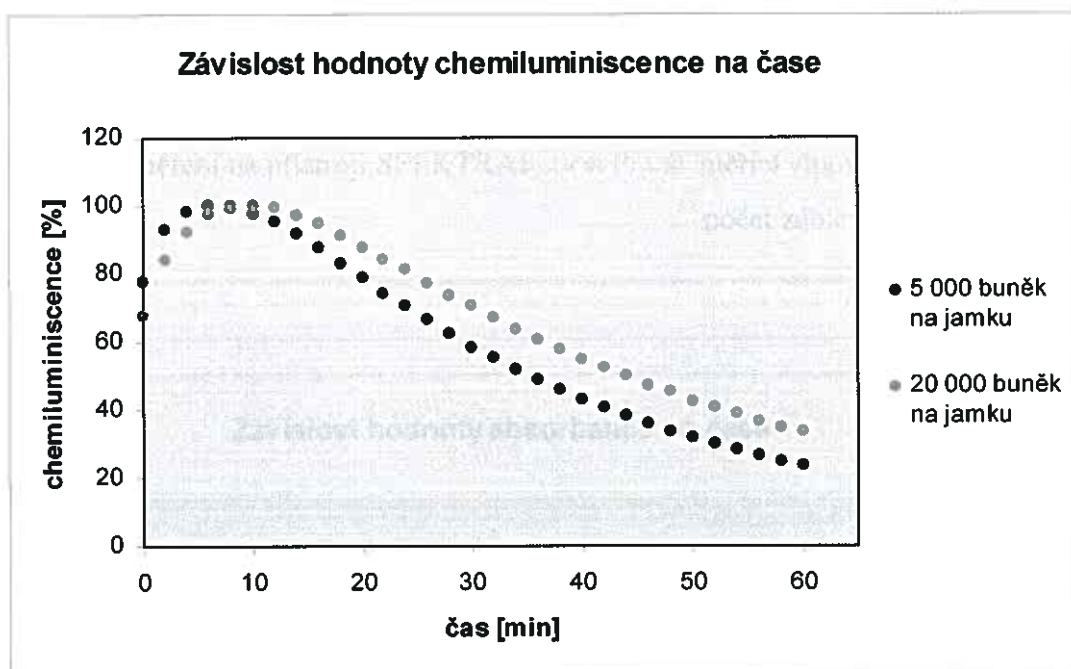
Graf 3 Závislost hodnoty chemiluminiscence na počtu buněk u dvou různých koncentrací Anti-BrdU-POD (chemiluminiscence vyjádřena v procentech)

V případě vyjádření chemiluminiscence v procentech je průběh reakce u obou zvolených koncentrací do hodnoty 10 000 buněk na jamku přibližně stejný. Hodnota 100 % procent byla přiřazena hodnotě chemiluminiscence při počtu 10 000 na jamku.

5.3 Kinetika reakce

5.3.1 Kinetika reakce u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí

Podmínky měření na přístroji SPEKTRAFUOR PLUS: délka integrace: 1 000 ms
výtěžek: 130



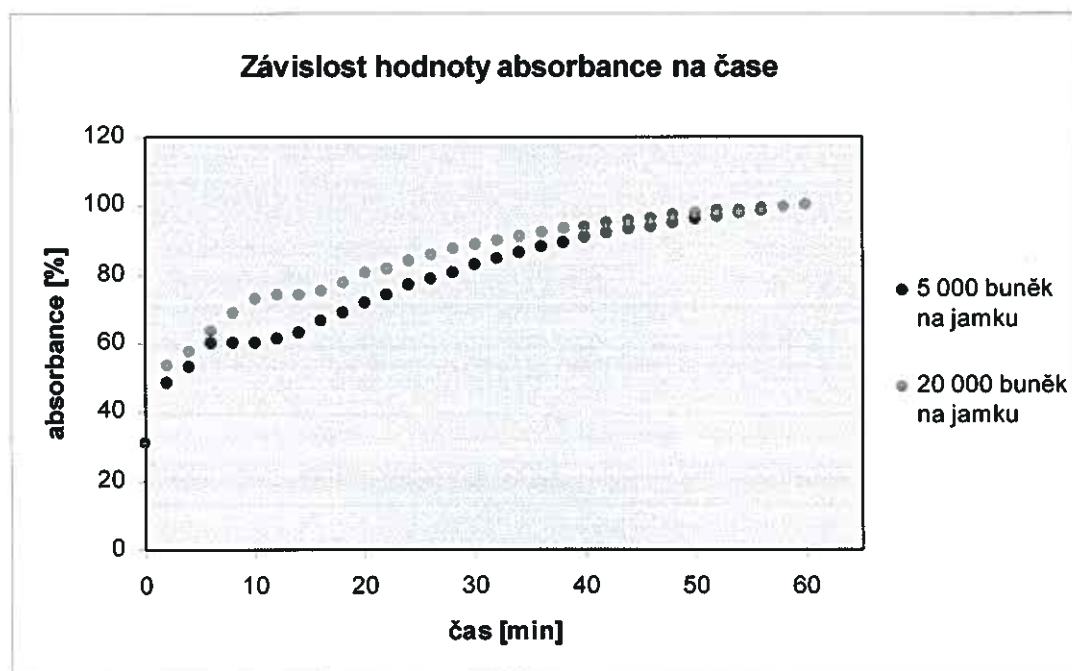
Graf 4 Závislost hodnoty chemiluminiscence na čase u koncentrace 5 000 a 20 000 buněk na jamku

Závislost chemiluminiscence na čase byla stanovena u koncentrace 5 000 a 20 000 buněk na jamku. Kinetika byla měřena ihned po přidání BM chemiluminiscence ELISA substrate (POD). Bylo prokázáno, že chemiluminiscence klesá v čase. Z kinetické křivky bylo stanoveno optimum reakce, a tedy zároveň délka inkubace s BM chemiluminiscence ELISA substrate (POD). Optimální

inkubační doba pro koncentraci 5 000 buněk na jamku byla na základě grafu stanovena na 6 minut a pro koncentraci 20 000 buněk na jamku na 10 minut. Dále byl sledován procentuální pokles chemiluminiscence v čase u obou zvolených koncentrací. Bylo zjištěno, že u obou koncentrací je průběh reakce přibližně stejný. Hodnota 100 % byla přiřazena maximální hodnotě chemiluminiscence.

5.3.2 Kinetika reakce u BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí

Podmínky měření na přístroji SPEKTRAFUOR PLUS: měřicí vlnová délka: 360 nm
počet záblesků na jamku: 5



Graf 5 Závislost hodnoty absorbance na čase u koncentrace 5 000 a 20 000 buněk na jamku

Závislost absorbance na čase byla stanovena u koncentrace 5 000 a 20 000 buněk na jamku. Reakce nebyla zastavena pomocí 1 M H₂SO₄ a kinetika byla měřena ihned po přidání BM blue, POD substrate. Bylo prokázáno, že absorbance vzrůstá v čase. Z kinetické křivky bylo stanoveno optimum reakce, a tedy zároveň délka inkubace s BM blue, POD substrate. Optimální inkubační doba pro obě koncentrace byla na základě grafu stanovena na 30 minut. Dále byl sledován procentuální nárůst absorbance v čase u obou zvolených koncentrací. Bylo zjištěno, že u obou koncentrací je průběh reakce přibližně stejný. Hodnota 100 % byla přiřazena hodnotě absorbance v čase 60 minut.

5.4 Citlivost

5.4.1 Stanovení citlivosti u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí

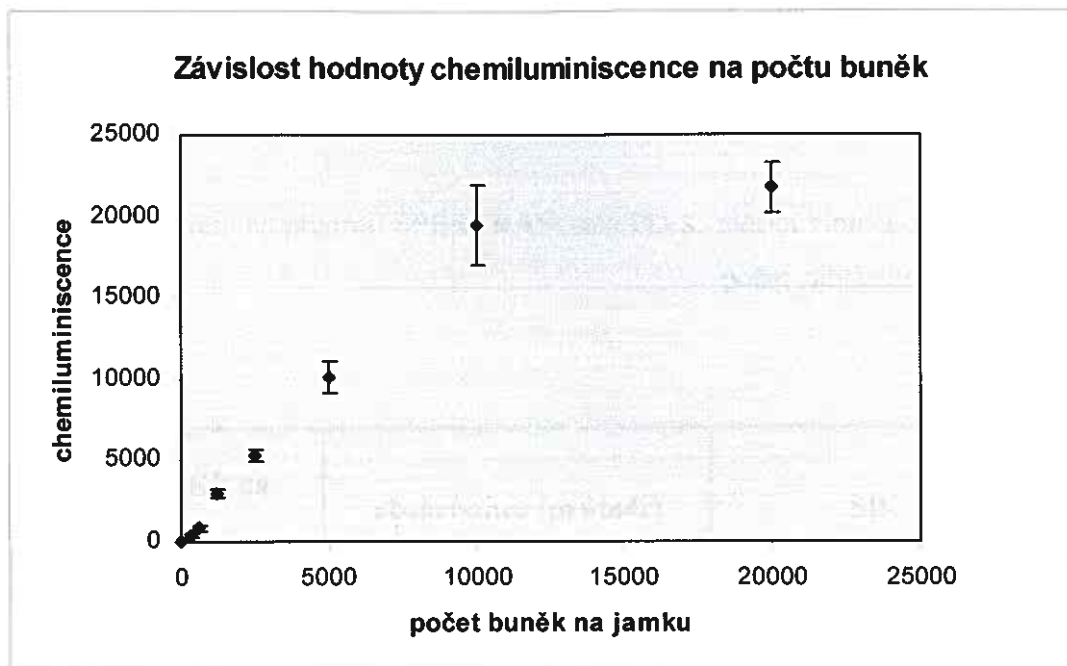
Podmínky měření na přístroji SPEKTRAFUOR PLUS: délka integrace: 1 000 ms
výtěžek: 130

počet buněk na jamku	chemiluminiscence (průměr)	SD
20 000	21 746	1 588
10 000	19 420	2 453
5 000	10 090	956
2 500	5 324	365
1 250	2 972	279
625	832	214
313	353	81

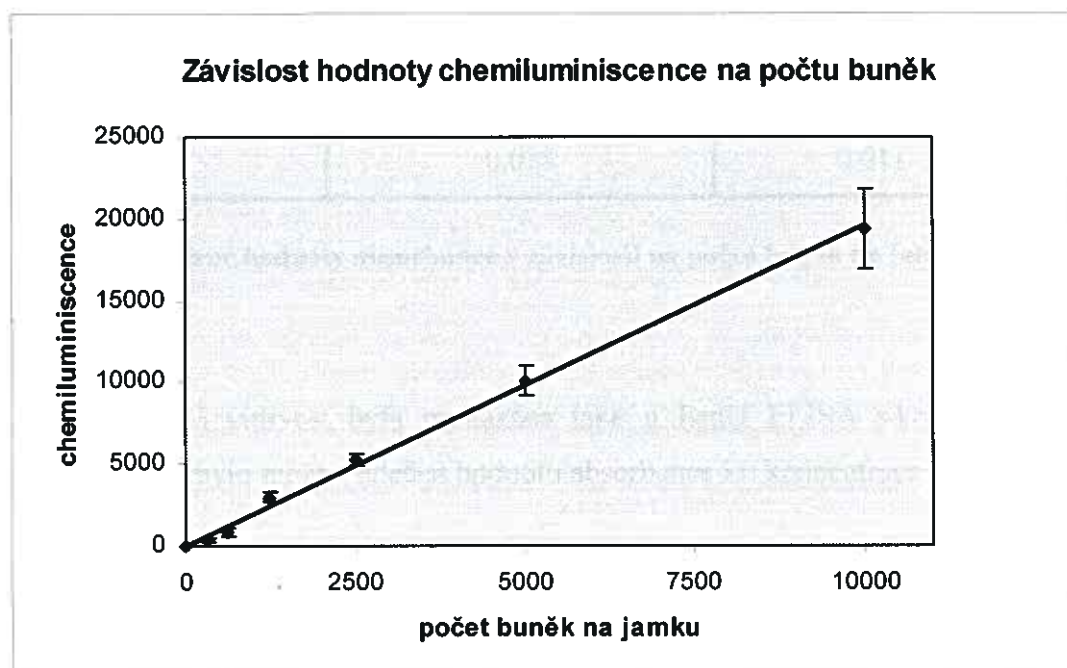
Tab. 3 Průměrné hodnoty chemiluminiscence v závislosti na počtu buněk na jamku

Stanovením závislosti hodnoty chemiluminiscence na počtu buněk byla prokázána vysoká citlivost této metody, neboť hodnotu chemiluminiscence bylo možno odečíst i u koncentrace 313 buněk na jamku.

Dále byla sledována linearita této závislosti. Z grafu na následující straně je patrné, že metoda je lineární přibližně do koncentrace 10 000 buněk na jamku.



Graf 6 Závislost hodnoty chemiluminiscence na počtu buněk



Graf 7 Závislost hodnoty chemiluminiscence na počtu buněk

Rovnice lineární regrese: $y = 1,9587x + 61,147$

5.4.2 Stanovení citlivosti u BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí

Podmínky měření na přístroji SPEKTRAFUOR PLUS: měřící vlnová délka: 450 nm
počet záblesků na jamku: 5

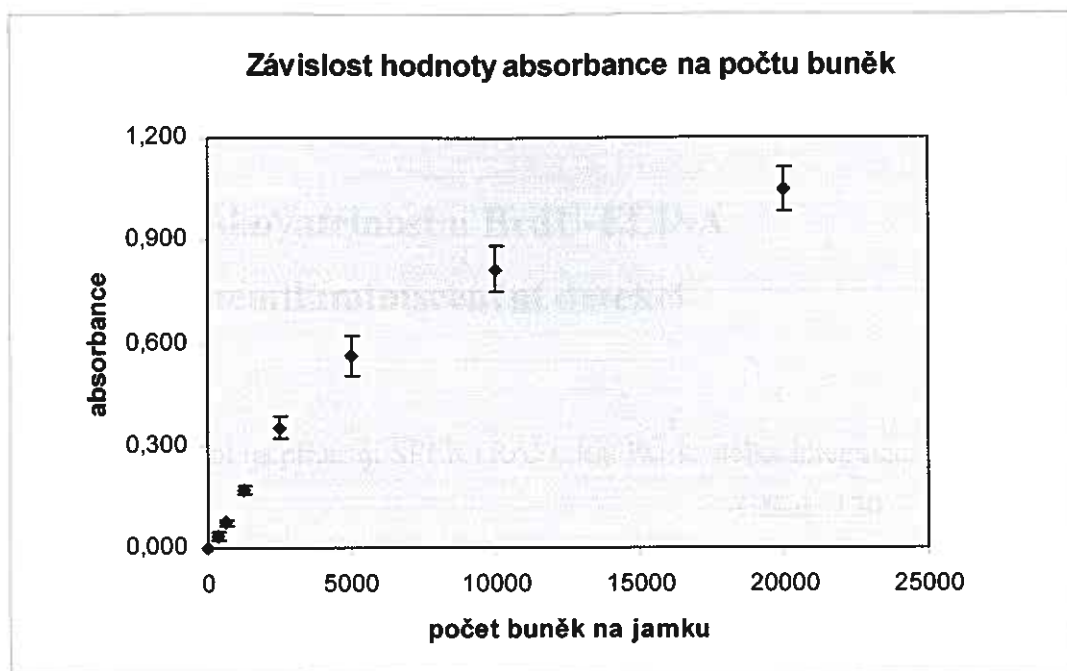
počet buněk na jamku	absorbance (průměr)	SD
20 000	1,048	0,066
10 000	0,816	0,066
5 000	0,562	0,057
2 500	0,353	0,032
1 250	0,170	0,010
625	0,074	0,009
313	0,035	0,011

Tab. 4 Průměrné hodnoty absorbance v závislosti na počtu buněk na jamku

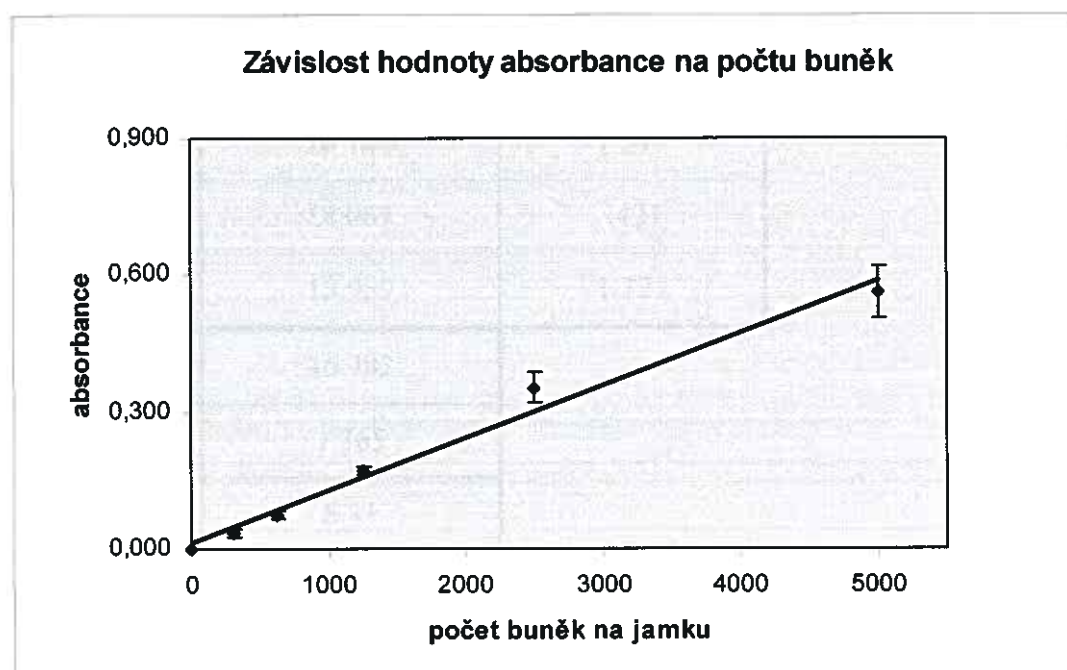
Vysoká citlivost byla prokázána také u BrdU ELISA s kolorimetrickou detekcí. Opět bylo možno odečíst hodnotu absorbance i u koncentrace 313 buněk na jamku.

Dále byla sledována linearita této závislosti. Z grafu na následující straně je patrné, že metoda je lineární přibližně do koncentrace 5 000 buněk na jamku.

Citlivost u BrdU ELISA s kolorimetrickou byla nejprve měřena po 30-minutové inkubaci s BM blue, POD substrate, soluble, ale získané hodnoty absorbance se pohybovaly nad rozsahem linearity přístroje. Proto byl při dalším měření snížen inkubační čas na 15 minut, avšak i poté byly hodnoty absorbance nad rozsahem linearity. Nakonec byl inkubační čas stanoven na hodnotu 5 minut.



Graf 8 Závislost hodnoty absorbance na počtu buněk



Graf 9 Závislost hodnoty absorbance na počtu buněk

Rovnice lineární regrese: $y = 0,0001x + 0,013$

5.5 Opakovatelnost

5.5.1 Opakovatelnost u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí

Podmínky měření na přístroji SPEKTRAFUOR PLUS: délka integrace: 1 000 ms
výtěžek: 130

číslo měření	průměr	SD
1	15 031	713
2	18 676	861
3	16 210	675
4	16 746	1 297
5	18 067	421
6	15 959	1 323
průměr	16 782	
SD	1 365	
RSD [%]	8,31	

Tab. 5 Opakovatelnost u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí

Průměrná hodnota chemiluminiscence vypočtená z průměrů šesti opakovaných měření byla 16 782, směrodatná odchylka byla 1 365 a relativní směrodatná odchylka 8,31 %.

5.5.2 Opakovatelnost u BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí

Podmínky měření na přístroji SPEKTRAFUOR PLUS: měřící vlnová délka: 450 nm
počet záblesků na jamku: 5

číslo měření	průměr	SD
1	0,711	0,069
2	0,776	0,084
3	0,741	0,019
4	0,848	0,061
5	0,860	0,068
6	0,771	0,078
průměr	0,785	
SD	0,059	
RSD [%]	7,52	

Tab. 6 Opakovatelnost u BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí

Průměrná hodnota absorbance vypočtená z průměrů šesti opakovaných měření byla 0,785, směrodatná odchylka byla 0,063 a relativní směrodatná odchylka 7,52 %.

5.6 Kvantitativní stanovení buněčné proliferace po ovlivnění buněk inositolhexafosfátem

Podmínky měření na přístroji SPEKTRAFUOR PLUS: délka integrace: 1 000 ms
výtěžek: 130

koncentrace IP ₆ [mM]	chemiluminiscence (průměr)	SD
0 (kontrola)	3 874	1 549
0,2	2 785	388
1	1 433	543
5	134	93

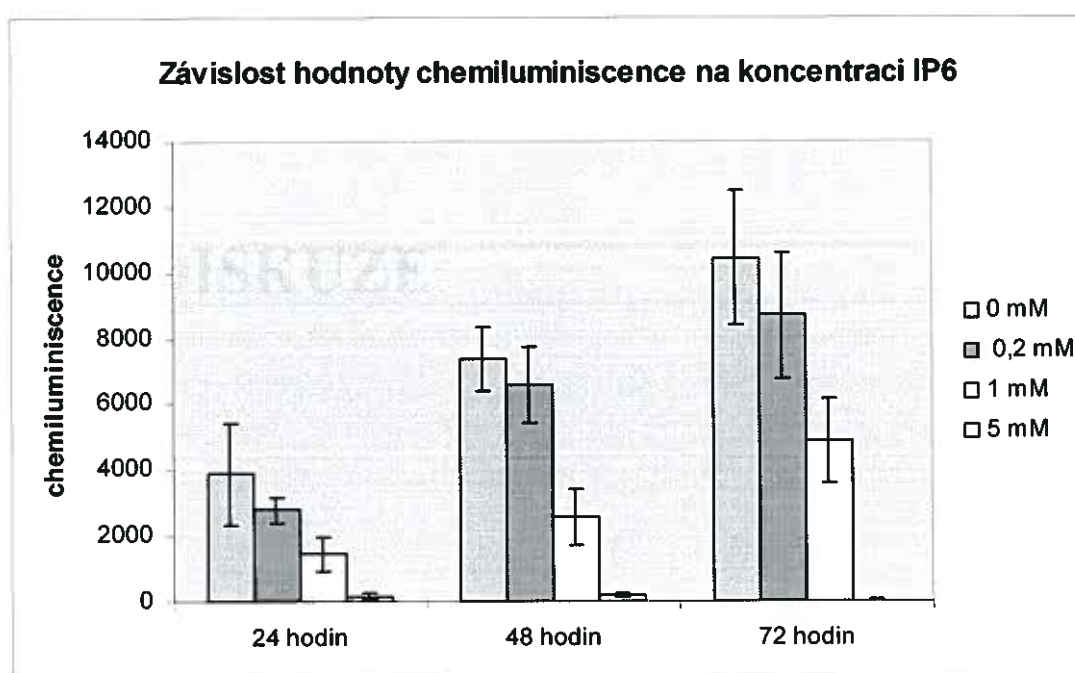
Tab. 7 Hodnoty chemiluminiscence po 24-hodinové inkubaci s IP₆

koncentrace IP ₆ [mM]	chemiluminiscence (průměr)	SD
0 (kontrola)	7 354	963
0,2	6 551	1 153
1	2 562	848
5	190	55

Tab. 8 Hodnoty chemiluminiscence po 48-hodinové inkubaci s IP₆

koncentrace IP ₆ [mM]	chemiluminiscence (průměr)	SD
0 (kontrola)	10 436	2 058
0,2	8 686	1 934
1	4 883	1 292
5	21	59

Tab. 9 Hodnoty chemiluminiscence po 72-hodinové inkubaci s IP₆



Graf 10 Závislost hodnoty chemiluminiscence na koncentraci IP₆

Graf závislosti chemiluminiscence na koncentraci IP₆ znázorňuje hodnoty chemiluminiscence naměřené pro jednotlivé koncentrace inositolhexafosfátu a pro různou délku inkubace s IP₆. Pomocí T-testu bylo prokázáno, že na hladině pravděpodobnosti 0,95 je statistický pokles chemiluminiscence významný až od hodnoty 1 mM IP₆ u 24, 48 i 72- hodinové inkubace.

6 DISKUZE

Prvním z cílů této práce bylo optimalizovat stanovení inkorporace BrdU do DNA syntetizované *de novo*.

Optimalizace pracovního postupu byla provedena u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí. Původní postup byl vypracován na základě návodů firmy Roche dodaných společně s jednotlivými reagensy, avšak tímto postupem nebyly získány uspokojivé výsledky, neboť hodnoty chemiluminiscence v měřených jamkách se nelišily od hodnot blanku. Bylo nutno zhodnotit možné příčiny nízkého signálu a provést změny v pracovním postupu.

V první řadě byla otestována aktivita systému protilátka + substrát a to změřením kinetiky reakce BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD) a samotné Anti-BrdU-POD. Z kinetické křivky je patrné, že reakcí vzniká dostatečně velký signál a obě reagensy jsou tedy v pořádku.

Poté se přistoupilo ke změnám v samotném postupu.

V případě BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí byla nahrazena transparentní mikrotitrační destička destičkou černou s plochým transparentním dnem, neboť se ukázalo, že při měření chemiluminiscence proniká vznikající světlo do sousedních jamek.

Dále byla prodloužena inkubace s Anti-BrdU-POD na maximální dobu uvedenou v návodu firmy Roche, tedy na 2 hodiny. Klíčovou změnou bylo použití 70 % EtOH jako fixačního činidla a 2,3 M HCl jako činidla permeabilizačního.

Příčinou nízkého signálu byla nedostatečná propustnost membrán pro vstup Anti-BrdU-POD do jádra k inkorporovanému BrdU, neboť teprve použití 2,3 M HCl přineslo požadované výsledky, tedy dostatečně vysoký signál.

Dalším úkolem bylo optimalizovat koncentraci Anti-BrdU-POD. Optimalizace koncentrace Anti-BrdU-POD byla z finančních důvodů provedena pouze u BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí. Byly testovány dvě koncentrace, 0,20 a 0,80 U/ml.

Ze získaných výsledků je patrné, že v případě použití koncentrace 0,80 U/ml je metoda lineární i pro počet 20 000 buněk na jamku, v případě použití nižší koncentrace do hodnoty 10 000 buněk na jamku. Z toho plyne, že pro vyšší počty

buněk je používaná koncentrace nedostatečná a je nutno zvolit koncentraci vyšší. Při procentuálním vyjádření chemiluminiscence je zřejmé, že průběh reakce do hodnoty 10 000 buněk na jamku je u obou koncentrací přibližně stejný a proto je možno pro nižší počty buněk používat koncentraci 0,20 U/ml. Používání koncentrace 0,80 U/ml by bylo příliš finančně náročné.

Dalším cílem bylo porovnat výhody a nevýhody použití dvou různých substrátů v metodě inkorporace BrdU s ohledem na jejich chemiluminiscenční a kolorimetrickou detekci. BrdU-ELISA s chemiluminiscenční a kolorimetrickou detekcí byly porovnávány z několika různých hledisek.

V první řadě byla hodnocena citlivost. Stanovením závislosti hodnoty chemiluminiscence, respektive absorbance, na počtu buněk byla prokázána vysoká citlivost metody u obou typů detekce, protože v obou případech bylo možno odečíst hodnoty i u nejnižšího zvoleného počtu buněk na jamku. U obou způsobů detekce byla porovnávána také linearita závislosti chemiluminiscence, respektive absorbance, na počtu buněk na jamku. U BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí byla prokázána linearita závislosti do hodnoty 10 000 buněk na jamku, u BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí pouze do hodnoty 5 000 buněk na jamku. Nelinearita u vyšších počtů buněk může být způsobena jednak nedostatečnou koncentrací protilátky, jednak zvoleným typem detekce.

Dále byla srovnávána opakovatelnost. V případě BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí byla hodnota vypočítané relativní směrodatné odchylky 8,31 %, v případě BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí 7,52 %. Vzhledem k tomu, že se jedná o práci s biologickým materiálem, tak obě hodnoty poukazují na dobrou opakovatelnost této metody.

Oba způsoby detekce byly porovnávány také z hlediska potřebného technického vybavení, pracnosti, finanční a časové náročnosti.

K měření chemiluminiscence a absorbance byl použit stejný přístroj, SPECTRAFLUOR PLUS, avšak měření absorbance vyžaduje navíc použití absorpčních filtrů.

Pracnost provedení BrdU-ELISA byla u obou metod srovnatelná, v případě kolorimetrické detekce bylo sice třeba připravit 1 M H₂SO₄, avšak u chemiluminiscenční detekce bylo naproti tomu nutno připravit substrát (smícháním roztoků A a B).

Celková hodnota reagensů pro BrdU ELISA (BrdU, Anti-BrdU-POD, Blocking reagent for ELISA a BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD), respektive BM blue, POD substrate, soluble) byla téměř shodná, v případě užití chemiluminiscenční detekce činila 0,318 euro na jamku, u kolorimetrické detekce 0,315 euro na jamku. Oba typy detekce se lišily pouze hodnotou použitého substrátu. Cena BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD) byla 0,070 euro na jamku a cena BM blue, POD substrate, soluble 0,067 euro na jamku. V případě BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí bylo ale nutno použít černou mikrotitrační destičku s plochým transparentním dnem, která je přibližně třikrát dražší než transparentní destička použitá pro měření absorbance, což navýšilo cenu tohoto způsobu detekce.

Z pohledu časové náročnosti jsou oba typy BrdU-ELISA srovnatelné. Doba samotné BrdU-ELISA (od odstranění média z jamek mikrotitrační destičky před fixací 70 % EtOH až po získání hodnot chemiluminiscence, respektive absorbance, na přístroji SPECTRAFLUOR PLUS) činila přibližně 3 a půl hodiny.

Z uvedeného vyplývá, že oba způsoby detekce vykazují dobré výsledky, přesto BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí lze zvolit jako výhodnější zejména z pohledu dosažené linearity. Nevýhoda BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí spočívá především v tom, že pokud je absorbance měřena po inkubační době s BM blue, POD substrate, která byla na základě proměření kinetiky zvolena jako optimální, tak se získané hodnoty pohybují nad rozsahem linearity přístroje. Omezená linearita však není způsobena pouze přístrojem, ale také samotnou metodou, neboť jak uvádí literatura, lineární vztah mezi naměřenými hodnotami absorbance a aktuální inkorporací BrdU existuje pouze do hodnoty absorbance 1,5 [14].

Posledním cílem této práce bylo aplikovat metodu inkorporace BrdU pro stanovení proliferace buněk *in vitro* po ovlivnění inositolhexafosfátem. Jednou z vlastností této látky jako potenciálního protinádorového adjuvancia by mělo být snížení proliferace buněk jejich zablokováním v G0/G1 fázi. Tato studie měla ověřit antiproliferační působení IP₆. Byly testovány tři koncentrace (0,2; 1 a 5 mM IP₆) ve třech inkubačních časech (24, 48 a 72 h). Ke kvantitativnímu stanovení buněčné proliferace po ovlivnění buněk IP₆ byla použita BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí. Ze získaných výsledků je patrné, že IP₆ snižuje proliferaci buněčné linie SW 620. Z grafu je zřejmé, že pokles chemiluminiscence je pozorovatelný už u koncentrace 0,2 mM IP₆, avšak pomocí T-testu bylo prokázáno, že na hladině pravděpodobnosti 0,95 je statistický pokles chemiluminiscence významný až od hodnoty 1 mM IP₆ u 24, 48 i 72- hodinové inkubace.

7 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala optimalizací metody stanovení buněčné proliferace pomocí inkorporace BrdU do *de novo* syntetizované DNA, porovnáním užití dvou různých substrátů a aplikací této metody pro hodnocení účinku inositolhexafosfátu na buněčnou proliferaci *in vitro*.

Inkorporace BrdU do nově syntetizované DNA se jeví jako vhodná metoda pro stanovení buněčné proliferace, neboť výsledky dosažené v této práci poukazují na její vysokou citlivost a dobrou opakovatelnost.

Z výsledků srovnávání chemiluminiscenčního a kolorimetrického substrátu lze usuzovat, že oba způsoby detekce jsou dobré, přesto použití BrdU-ELISA s chemiluminiscenční detekcí je výhodnější, neboť v hodnocených bodech poskytuje srovnatelné nebo lepší výsledky než BrdU-ELISA s kolorimetrickou detekcí.

U inositolhexafosfátu, který byl v této práci testován jako potenciální protinádorové adjuvans, byl prokázán statisticky významný antiproliferační účinek u buněk SW 620.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Anti-BrdU-POD	Anti-bromodeoxyuridine-POD, Fab fragments
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagles medium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamitetraoctová kyselina
ELISA	enzymová imunoanalýza
EtOH	ethanol
F12	Nutrient Mixture F-12 Ham
FTS	fetální telecí sérum
Gln	L-glutamin
IP ₆	inositolhexafosfát
LDH	laktátdehydrogenáza
MeOH	methanol
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H- -tetrazolium bromid
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukována forma)
NK buňky	natural killer buňky
PBS bez iontů	PBS bez Ca a Mg iontů (fosfátový pufr)
POD	křenovou peroxidázou
RNA	ribonukleová kyselina
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
TMB	3,3'-5,5'-tetramethylbenzidin
WST-1	4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H- -tetrazolio-5-yl]-benzo-1,3-disulfonát sodný
XTT	3,3'-{5-[(fenylamino)karbonyl]-tetrazolium}-2,3- -bis(4-methoxy-6-nitro-benzosulfonát) sodný

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1 Fáze buněčného cyklu
- Obr. 2 Replikace DNA
- Obr. 3 Buněčná linie Hep-2 ovlivněna výluhem ze zubního implantátu, fotografie
byly pořízeny po 24 (1), 48 (2) a 72-hodinové (3) inkubaci
- Obr. 4 Chemická struktura thymidinu a 5-bromo-2'-deoxyuridinu
- Obr. 5 Chemická struktura inositolhexafosfátu

10 SEZNAM GRAFŮ A TABULEK

• SEZNAM GRAFŮ

- Graf 1 Kinetika reakce systému Anti-BrdU-POD a BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD)
- Graf 2 Závislost hodnoty chemiluminiscence na počtu buněk u dvou různých koncentrací Anti-BrdU-POD
- Graf 3 Závislost hodnoty chemiluminiscence na počtu buněk u dvou různých koncentrací Anti-BrdU-POD (chemiluminiscence vyjádřena v procentech)
- Graf 4 Závislost hodnoty chemiluminiscence na čase u koncentrace 5 000 a 20 000 buněk na jamku
- Graf 5 Závislost hodnoty absorbance na čase u koncentrace 5 000 a 20 000 buněk na jamku
- Graf 6 Závislost hodnoty chemiluminiscence na počtu buněk
- Graf 7 Závislost hodnoty chemiluminiscence na počtu buněk
- Graf 8 Závislost hodnoty absorbance na počtu buněk
- Graf 9 Závislost hodnoty absorbance na počtu buněk
- Graf 10 Závislost hodnoty chemiluminiscence na koncentraci IP₆

• SEZNAM TABULEK

- Tab. 1 Průměrné hodnoty chemiluminiscence v závislosti na počtu buněk na jamku u koncentrace Anti-BrdU-POD 0,20 U/ml
- Tab. 2 Průměrné hodnoty chemiluminiscence v závislosti na počtu buněk na jamku u koncentrace Anti-BrdU-POD 0,80 U/ml
- Tab. 3 Průměrné hodnoty chemiluminiscence v závislosti na počtu buněk na jamku
- Tab. 4 Průměrné hodnoty absorbance v závislosti na počtu buněk na jamku
- Tab. 5 Opakovanost u BrdU ELISA s chemiluminiscenční detekcí
- Tab. 6 Opakovanost u BrdU ELISA s kolorimetrickou detekcí
- Tab. 7 Hodnoty chemiluminiscence po 24-hodinové inkubaci s IP₆
- Tab. 8 Hodnoty chemiluminiscence po 48-hodinové inkubaci s IP₆
- Tab. 9 Hodnoty chemiluminiscence po 72-hodinové inkubaci s IP₆

11 POUŽITÁ LITERATURA

1. Nečas O. et al.: *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, H&H Vyšehradská s.r.o., 2000, s. 133, 264-270, 282-283
2. Pollard T.D., Earnshaw W.C.: *Cell biology*, Saunders, 2002, illustrations G.T.Johnson, s. 7, 675-677
3. Alberts B. et al.: *Základy buněčné biologie*, Espero Publishing s.r.o., 1998, s. 571
4. Bernstein R., Bernstein S.: *Biology*, WCB Publishers, 1996
5. <https://www.roche-applied-science.com/servlet/StoreFramesetView?langId=-1&krypto=azoH5jhJ2MUz73r0cs%2BPdV90cSWJVHwg5U%2F8MIWc8b4kpAjLDRkkDuchkECTAs71BoCKDhdyq5ke%0AETcYxzHvG156HGAL%2BBX7&ddkey=RCConfigureUser>
6. Stránský P., Červinka M.: *Statistical analysis of growth activity in cell culture assay*, *Advances in medical physics, biophysicis and biomaterials*, Bratislava, 1997, book of abstracts, s. 179-182
7. Doyle A., Griffiths J. B., Newell D. G.: *Cell & tissue culture: Laboratory procedures*, John Wiley & Sons Ltd, 1998, s. 4B:0.1-8.1
8. Bradford, M. M.: *A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, s. 248-254
9. Nirankar N. Mishra et al.: *On-chip micro-biosensor for the detection of human CD4⁺ cells based on AC impedance and optical analysis*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21(5), s. 696-704
10. http://www.linkos.cz/vzdelavani/zv12_00/05.php
11. <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1669915a.pdf>
12. Magaud J. P., Sargent I., Mason D. Y.: *Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake*, *Journal of Immunological Methods*, 1988, 106(1), s. 95-100
13. Hawker J. R.: *Chemiluminescence-based BrdU ELISA to measure DNA synthesis*, *Journal of Immunological Methods*, 2003, 274(1-2), s. 77-82
14. Huong P. L. T. et al.: *Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation*, *Journal of Immunological Methods*, 1991, 140(2), s. 243-248

15. Profit S., Unteregger G.: Quantitative measurement of cell proliferation using the BrdU ELISA: A comparison between colorimetric and chemiluminescent detection, *Biochemica*, 2001, č.4
16. Garrett W. M., Guthrie H. D.: Detection of bromodeoxyuridine in paraffin-embedded tissue sections using microwave antigen retrieval is dependent on the mode of tissue fixation, *Biochemica*, 1998, č.1
17. <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1582950a.pdf>
18. <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1484281a.pdf>
19. <http://www1.lfl.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm#k111>
20. Karlíček R. et al.: *Analytická chemie pro farmaceuty*, Karolinum, 2001, s. 216-224
21. Jernal A. et al.: Cancer statistics, 2003, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2003, 53(1), s. 5-26
22. Kelloff G. J. et al.: Progress in clinical chemoprevention, *Seminar in Oncology*, 1997, 24(2), 241-252
23. Shamsuddin A. M., Vucenik I., Cole K. E.: IP₆: A novel anti-cancer agent, 1997, *Life Sciences*, 61(4), s. 343-354
24. Barrett J. E., Klopfenstein C. F., Leipold H.W.: Protective effects of cruciferous seed meals and hulls against colon cancer in mice, *Cancer Letters*, 1998, 127(1-2), s. 83-82
25. Berridge M. J., Irvine R. F.: Inositol phosphates and cell signalling, *Nature*, 1989, 341, s. 197-205
26. Fox C. H., Eberl M.: Phytic acid (IP₆), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review, *Complementary Therapies in Medicine*, 2002, 10, s. 229-234
27. Inositol hexaphosphate, *Alternative Medicine Review*, 2002, 7(3), s. 244-248
28. Shamsuddin A. M., Vucenik I.: IP₆ & inositol in cancer prevention and therapy, *Current Cancer Therapy Reviews*, 2005, 1(3), s. 259-269
29. Jenab M., Thompson L. U.: Phytic acid in wheat bran affects colon morphology, cell differentiation and apoptosis, *Carcinogenesis*, 21, s. 1547-1552
30. El-Sherbiny Y. M. et al.: G₀/G₁ arrest and S phase inhibition of human cancer cell lines by inositol hexaphosphate (IP₆), *Anticancer Research*, 2001, 21, s. 2393-2403

31. Vucenik I. et al.: Anti-angiogenic activity of inositol hexaphosphate (IP₆), angiogenesis, 2004, 25(11), s. 2115-2123
32. Baten A. et al.: Inositol-phosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with tumor suppression, *Carcinogenesis*, 1989, 10(9), s. 1595-1598
33. Thomson L. U., Zhang L.: Phytic acid and minerals: effect of early markers of risk for mammary and colon carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 1991, 12, s. 2041-2045
34. Midorikawa K.: Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 288, s. 552-557
35. Vucenik I., Shamsuddin A. M.: Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP₆) and inositol: from laboratory to clinic, *Journal of Nutrition*, 2003, 133, s. 3778S-3784S
36. Deliliers G.L. et al.: Effect of inositol hexaphosphate (IP₆) on human normal and leukaemic haematopoietic cells, *British Journal of Hematology*, 117(3), s. 577-587
37. Tantivejkul K., Vucenik I., Shamsuddin A. M.: Inositol hexaphosphate (IP₆) inhibits key events of cancer metastases: I. In vitro studies of adhesion, migration and invasion of MDA-MB 231 human breast cancer cells, *Anticancer Research*, 2003, 23(5A), s. 3671-3679.
38. Graf E., Eaton J. W.: Antioxidant functions of phytic acid, *Free Radical Biology & Medicine*, 1990, 8(1), s. 61-69
39. Urbano G. et al.: The role of phytic acid in legumes antinutrient or beneficial function?, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2000, 56(3), s. 283-294