

# **KBB/BB2 Buněčná biologie II - cvičení (LS)**

## **Hodnocení cytotoxicity *in vitro* na modelu lidské buněčné linie A2780**

### **TEORETICKÝ ÚVOD**

#### **Buněčné systémy v molekulární a buněčné toxikologii**

Toxikologie je multidisciplinární obor, využívající poznatky fyziologie, biochemie, chemie, farmakologie, biologie, imunologie a spousty dalších odvětví. Toxikologie zahrnuje řadu subdisciplín:

- environmentální toxikologie – studuje toxikanty ve vodě, půdě a ovzduší
- orgánová toxikologie – studuje toxicitu v jednotlivých orgánech; např. hepatotoxicita, nefrotoxicita, neurotoxicita, kardiotoxicita apod.
- forenzní, analytická a klinická toxikologie – studium přítomnosti a koncentrace léčiv či toxinů v lidském těle, tělních tekutinách (therapeutic drug monitoring – TDM), v důkazním materiálu (forenzní aplikace)
- aplikovaná toxikologie – využití poznatků z dílčích toxikologických disciplín k aplikaci v praxi
- „regulatory toxicology“ – legislativní disciplína, aplikace poznatků z toxikologie do právního a správního systému
- **Molekulární a buněčná toxikologie** – studuje toxicitu a mechanismy toxicity na buněčné úrovni v *in vitro* systémech různého stupně biologické complexity

V molekulární a buněčné toxikologii se studují účinky většinou nízkomolekulárních látek na buněčné systémy a subcelulární entity včetně organel, nukleových kyselin, receptorů, enzymů, membrán apod. Pro studium se využívají systémy různého stupně biologické complexity a integrity. V buněčném uspořádání *in vitro* se v molekulární a buněčné toxikologii využívají izolované (perfundované) orgány, tkáňové kultury, tkáňové řezy, a nejčastěji izolované buňky.

Každé uspořádání má své výhody a nevýhody; vyšší stupeň biologické complexity blíže reprezentuje skutečný fyziologický stav systému, ale na druhou stranu nastávají problémy technické, analytické a interpretační, neboť do hry vstupuje mnoho faktorů. Izolované buňky představují nejjednodušší *in vitro* buněčný systém, ovšem mají řadu limitací a rozdílů oproti reálnému stavu v lidském či živočišném organismu.

Buněčné systémy pro molekulárně toxikologické studie využívají několik druhů experimentálního uspořádání:

**Suspenní buněčné kultury** – obvykle se jedná o krevní buňky, které za podmínek *in vitro* často proliferují a lze je kultivovat i dlouhodobě. Dále se může jednat o buňky izolované z orgánů, např. hepatocyty, které se využívají pro krátkodobé studie (řádově hodiny), často metabolické. Výhodou systému je možnost dobrého promíchávání suspenze a zajištění homogenních koncentračních vztahů. Nevýhodou je nutnost separace média od buněk pro další analýzy, resp. krátkodobost studií.

**Imobilizované buňky** – různé typy buněk se fixují např. do dutých vláken, perliček, pomocí sorbentů gelů apod. Hovoříme často o tzv. bioreaktoru, kdy lze optimálně zajistit přívod živin pro buňky, včetně plynů, a odvod metabolických zplodin a rovněž metabolitů v případě metabolických studií. Z hlediska studia metabolismu se jedná o unikátní systém simulující cirkulaci v krevním řečišti nebo orgánu. Nevýhodou je technická náročnost neumožňující masovější využití modelu. Za optimálních podmínek a při přidavku antibiotik lze systém často udržovat funkční po dobu několika dnů. Využívá se jak fixace izolovaných buněk z orgánů (hepatocyty), tak proliferujících nádorových buněk – např. v uspořádání dutých vláken.

**Adherentní buněčné kultury** – nejčastějším experimentálním uspořádáním pro práci s buněčnými kulturami lidských a živočišných buněk *in vitro* jsou tzv. adherentní buněčné kultury. Buňky jsou kultivovány většinou v plastových kultivačních lahvích, na deskách nebo vícejamkových deskách. Je nutné, aby buňky ke kultivačnímu podkladu přilnuly (adherence); každý buněčný typ vyžaduje specifické podmínky. Pro většinu nádorových linií postačují k adhezenci elektrostaticky nabitě plasty. Některé typy buněk vyžadují fixaci na substrát, jako je např. kolagen, laminin, elastin apod. Pro kultivaci většiny typů buněk byla vyvinuta a jsou komerčně dodávána speciální kultivační média, obsahující vhodné kombinace nutrietů, hormonů, vitamínů, esenciálních substrátů atd. Do médií pro kultivace se většinou přidává fetální telecí sérum (FBS), které obsahuje řadu růstových faktorů nutných pro proliferaci a diferenciaci buněk. Dále se do média přidávají acidobazické indikátory pro snadnou kontrolu kvality kultivačního média (odpadní produkty jsou často kyselé povahy a následně mění barvu média). Buňky se často kultivují v přítomnosti antibiotik (penicilin, streptomycin), ale tento faktor je třeba vzít v potaz při interpretaci experimentálních dat. Buněčné kultury se udržují ve speciálních inkubátorech, nejčastěji při 37°C a v atmosféře 5% oxidu uhličitého.

Nejčastěji využívanými buněčnými kulturami *in vitro* jsou komerční nádorové linie. V současné době jako dva hlavní zdroje linií jsou organizace ECACC (European Collection of Cell Cultures) a ATCC (American Tissue and Cultures Collection).

Linie mají definovaný fenotyp a doporučené kultivační podmínky. Jejich použití v buněčné toxikologii je dáno žádaným sledovaným parametrem; např. hepatomové linie – indukce jaterních biotransformačních enzymů, neuroblastomové linie – blokáda kalciových kanálů apod. Často se využívají upravené nádorové linie – v laboratořích nebo komerčně. Nejčastěji se jedná o genové manipulace zahrnující stabilně transfekované linie pro tzv. gene reporter assays, nebo manipulace vedoucí k vyššímu stupni diferenciaci linie v daný buněčný typ.

**V rámci praktické výuky budeme využívat linii A2780 odvozenou od lidského karcinomu vaječníků.**

Druhou hlavní skupinou buněčných kultur pro *in vitro* studie cytotoxicity jsou tzv. **primární kultury**. Jedná se o buňky izolované ze zvířecích (myš, potkan, pes, prase, opice, králík) či lidských orgánů (jaterní, ledvinové, kožní, pankreatické, placentární, srdeční apod.). Oproti nádorovým liniím mají primární kultury velkou výhodu v tom, že velmi blízce reprezentují fyziologickou situaci *in vivo*, nejsou transformované, jsou vysoce diferencované, mají specifické funkce apod. Na druhou stranu práce s těmito kulturami přináší i řadu úskalí:

- 1) Existuje odlišná legislativa a etická pravidla týkající se využití lidských orgánů, což limituje zdroj experimentálního materiálu.
- 2) Buňky v primární kultuře se nacházejí často v tzv. fázi G0 buněčného cyklu (quiescence) a nedělí se, tedy množství experimentálního materiálu je od počátku dané a nelze jej navýšit. Experiment v zásadě nelze v jedné kultuře zopakovat. V poslední době se na trhu objevují např. geneticky upravené hepatocytové kultury, kdy jsou buňky reversibilně či ireversibilně imortalizovány a opět se v kultuře mají schopnost dělit.
- 3) Jelikož jsou buňky izolovány z orgánů lidských jedinců, vyskytuje se v následně připravených primárních kulturách zřetelná interindividuální variabilita, která si vyžaduje opakování experimentu ve vyšším počtu nezávislých kultur.
- 4) V podmínkách *in vitro* dochází často k tzv. dediferenciaci buněk, tj. k postupnému vymizení původního fenotypu. Vhodnou suplementací kultivačního média lze tento proces podstatně zpomalit. Při dlouhodobých kultivacích rovněž někdy dochází k tzv. přerůstání kultury kontaminujícími proliferujícími buňkami – často fibroblasty.
- 5) Primární buněčné kultury je většinou třeba využít bezprostředně po jejich přípravě, tzn. dochází k určitému časově-organizačnímu tlaku. Běžným způsobem skladování proliferujících nádorových buněk je kryoprezervace; tyto techniky ale většinou nejsou vhodné pro primární kultury.

### **Mechanismy buněčného poškození – toxiny**

Na buněčné úrovni mohou různé látky (toxikanty) vyvolávat poškození buňky různými mechanismy. Jako buněčné poškození definujeme odchýlení se buňky od normálního fyziologického stavu do stavu abnormálního, kdy se většinou jedná o ireversibilní děj (pozn. existují reparační mechanismy).

První typ buněčného poškození je přímé destruktivní poškození buněčných struktur – oxidační poškození lipidů, proteinů, nukleových kyselin – a následné narušení integrity buněčných membrán nebo intracelulárních struktur (cytoskeletu). Poškození vyvolávají látky reaktivní – chinony (anthrachinon), radikálové sloučeniny (peroxydy, hydroperoxydy), volné radikály (ROS, RNS), elektrofilní sloučeniny, alkylační činidla (cis-platina), organická rozpouštědla (tetrachlormetan, toluen), silné kyseliny (kyselina sírová) a zásady (hydroxid sodný), těžké kovy (Pb, Hg) apod.

Druhým způsobem demonstrace toxicity *in vitro* je nedestruktivní interakce se subcelulárními entitami, tj. inhibice enzymů, blokace iontových kanálů, antagonismus receptorů nebo interference s cytoskeletem či DNA. Tudíž buňka uhynie např. v důsledku inhibice proteosyntézy, inhibice replikace DNA, narušení dynamiky mikrotubulů, inhibice ATP-dependentních iontových pump apod. Ve vlastní buněčné toxikologii pak stejně jako v prvním případě hodnotíme soubor parametrů vypovídajících o toxickém poškození buňky.

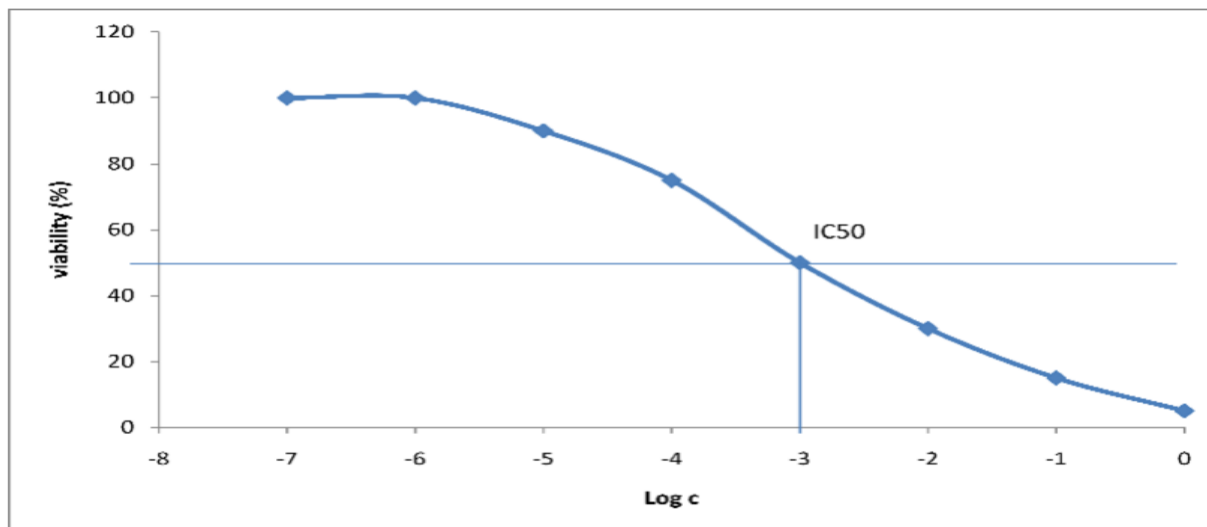
## Hodnocení cytotoxicity *in vitro*

**Parametry hodnocení *in vitro* cytotoxicity:** Na základě mechanismu buněčného poškození volíme v praxi nejvhodnější experimentální parametr pro hodnocení cytotoxického účinku noxy. Nejčastěji se jedná zejména o hodnocení:

- 1) integrity buněčné membrány – influx barviv (Trypanová modř, propidium jodid), resp. únik (leakage) intracelulárních enzymů mimo buňku (laktátdehydrogenasa, aspartátaminotransferasa apod.)
- 2) funkce mitochondrií – MTT a XTT testy, syntéza ATP, membránový potenciál
- 3) funkce lysozomů – barvení neutrální červení
- 4) proteosyntézy, obsah celkových proteinů (biuretová reakce, Lowryho metoda, Bradfordova metoda apod.), exprese specifických proteinů (western blotting, imunohistochemie), sekrece specifických proteinů (albumin – imunodifuze dle Manciniové apod.)
- 5) obsahu a syntézy nukleových kyselin - stanovení DNA a RNA, analýza genové exprese, flow-cytometrie; BrDU – proliferační assay apod.
- 6) specifické funkční eseje

**Hodnocení *in vitro* cytotoxicity:** Důležitá je vhodná volba experimentálního modelu. V našem praktickém cvičení využijeme lidské hepatomové buňky A2780 pro studium toxicity. Z důvodu možnosti zpracování velkých sérií vzorků a následného vyhodnocení dat se často volí experimentální uspořádání na mnohojamkových (96) kultivačních deskách. U cytotoxicity *in vitro* hodnotíme tři základní profily:

- 1) **mechanismus účinku** - pro hodnocení musíme zvolit vhodný modelový toxin (tzv. pozitivní kontrola), který mimikuje způsob buněčného poškození studovanou noxou. Např. tert-butylhydroperoxid (radikálové poškození), tetrachlormetan (oxidační poškození po metabolické aktivaci), D-galaktosamin (virální poškození), paracetamol (elektrofilní poškození) apod. Paralelně je důležité zvolit i tzv. negativní kontrolu – tj. rozpouštědlo (vehikulum) pro eliminaci jeho vlivu na buněčné funkce. Nejčastěji se volí voda, dimethylsulfoxid, vzácněji ethanol, aceton, dimethylformamid apod.
- 2) **časová závislost cytotoxicity** - v podmínkách *in vitro* hodnotíme tzv. akutní cytotoxicitu (ne chronickou). Volíme buď krátké časové intervaly (1/2 hod – 6 hod) nebo delší časové intervaly 24 hod – 72 hod. Časová závislost cytotoxicity často vypovídá o mechanismu poškození, sekundárních dějích vedoucí k poškození apod. (např. paracetamol je v krátkých časech netoxický, ale po vyčerpání intracelulárního poolu glutationu se projeví masivní toxicita); dále jde obecně o metabolické aktivace vedoucí k cytotoxicitě.
- 3) **koncentrační závislost cytotoxicity** – tzv. dose-response analýza. Na buňky se působí zkoumanou látkou v koncentrační škále, často velmi široké, proto se volí logaritmické odstupňování koncentrací. O toxicitě látky za daných experimentálních podmínek, v daném čase a v daném buněčném typu vypovídá tzv. hodnota IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration), což je koncentrace noxy, která vyvolá 50% maximálního buněčného poškození/smrti (vztaženo k modelovému toxinu). Čím je tedy substance toxičtější, tím nižší vykazuje hodnotu IC<sub>50</sub>. Grafické vyjádření dose-response závislosti představuje hyperbolická křivka; v logaritmickém vynesení koncentrace potom dostáváme sigmoidní křivky nejružnějšího charakteru. Hodnota IC<sub>50</sub> se potom vypočte jako inflexní bod na sigmoidě. Při sledování časové závislosti toxicity se potom IC<sub>50</sub> hodnoty uvádějí pro daný čas.



### ÚKOL

Stanovit časovou a koncentrační cytotoxicitu vybraných přírodních látek *in vitro* v lidské nádorové buněčné linii A2780.

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

### **Kultivace buněk**

Buněčná linie A2780 patří mezi tzv. adherentní buněčné linie a je rutinně kultivována v plastových nádobách a na plastových kultivačních deskách. Buňky rostou v monovrstvě. Jako kultivační médium je využito komerčně dodávané RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute -1640), obohacené o antibiotika (penicilin, streptomycin), glutamin a 10% fetální bovinní sérum (FBS). Kultivace se provádí v termostatovaném inkubátoru v atmosféře 5% oxidu uhličitého.

**Techniky kultivace nádorových buněk za sterilních podmínek, demonstrace laboratorních pomůcek a nádobí a demonstraci kultivace A2780 buněk vysvětlí a názorně předvede vyučující.**

### **Trypsinizace a pasážování buněk**

Buněčný cyklus A2780 buněk trvá přibližně 15h. Obecně, buňky se nesmí nechat dorůst do 100% konfluency, protože následně, díky kontaktní inhibici, dochází k umírání buněk. Konfluenci se hodnotí odhadem mikroskopicky. Při cca 80 - 90% konfluenci buněk se kultura tzv. pasáží. Jedná se o rozrušení mezibuněčných kontaktů a kontaktů buněk s kultivačním povrchem pomocí proteasy trypsinu, proto se často hovoří o tzv. trypsinizaci buněk.

**Vyučující vysvětlí postup trypsinizace a pasážování buněk. Studenti pracují ve dvojicích a každá dvojice provede trypsinizaci a pasážování dle návodu.**

### **Návod:**

Z kultivační láhve s téměř konfluentní kulturou A2780 buněk odsajeme za sterilních podmínek kultivační médium. Kulturu opláchneme sterilním roztokem PBS (cca 5 ml) a tento roztok opět odsajeme. Na kulturu aplikujeme 1 mL pracovního roztoku trypsinu, lahev uzavřeme a opatrným nakláněním a poklepáváním láhve docílíme rovnoměrného rozprostření roztoku trypsinu po celé kultivační ploše láhve. Láhev vložíme na 2-5 minut do termostatovaného (37°C) inkubátoru. Desku vytáhneme z inkubátoru a opakovaným nakláněním láhve a poklepáváním docílíme odlepení se buněk (detachment) od kultivačního podkladu. Působení trypsinu zastavíme přidávkou 9 mL kultivačního média obsahujícího 10% fetální telecí sérum a buňky resuspendujeme důkladným, ale opatrným opakovaným promícháním pomocí nasávání do pipety a zpětným vypouštěním. Buňky jsou nyní připraveny na počítání a na vysetí do kultury.



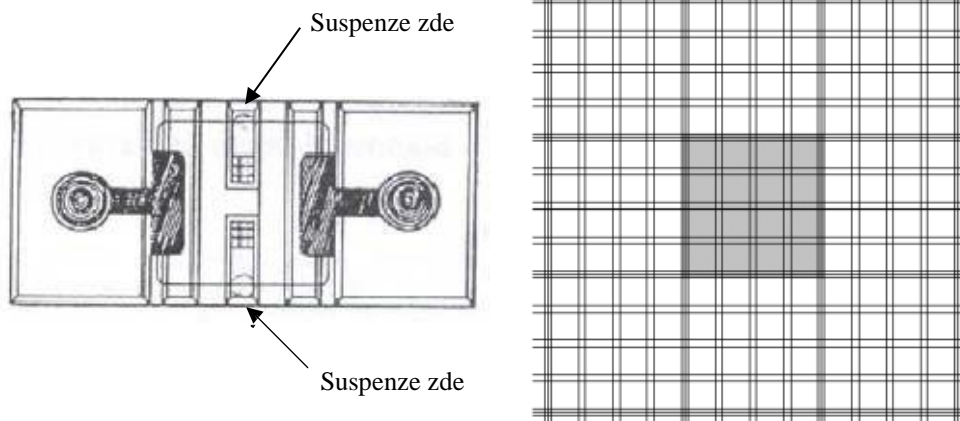
## Trypan Blue Exclusion Assay – počítání buněk, stanovení viability a vyšetí buněk

V buněčné suspenzi získané při pasážování buněk (viz výše) je třeba stanovit koncentraci (počet) buněk a jejich životnost (viabilitu). Nejčastěji se využívá tzv. Trypan Blue Exclusion test založený na skutečnosti, že zdravá (živá) buňka, pokud je vystavena okolnímu prostředí se specifickým barvivem (např. Trypanová modř), nepustí barvivo do intracelulárního prostoru díky integritě buněčné membrány a funkčnosti transportních systémů. Naopak buňky mrtvé či poškozené se nabarví Trypanovou modří. Buněčnou suspenzi v roztoku Trypanové modři hodnotíme mikroskopicky v tzv. Bürkerově komůrce, kdy určíme jak počet buněk v daném objemu buněčné suspenze, tak i podíl živých (nenabarvených) buněk v celkové buněčné populaci.

**Vyučující vysvětlí postup počítání buněk a stanovení viability. Studenti pracují ve dvojicích a každý student provede barvení a počítání buněk ve vlastním vzorku. Studenti ve dvojicích pak získané výsledky zprůměrují.**

### Návod:

Smísíme 10  $\mu$ l dobře promíchané buněčné suspenze a 90  $\mu$ l roztoku Trypanové modři. Přichystáme si Bürkerovu komůrku, kterou překryjeme krycím sklíčkem. Následně aplikujeme 2 x 10  $\mu$ l obarvené suspenze do Bürkerovy komůrky pipetou takovým způsobem, že se suspenze dostane do prostoru pod krycí sklíčko kapilárními silami.



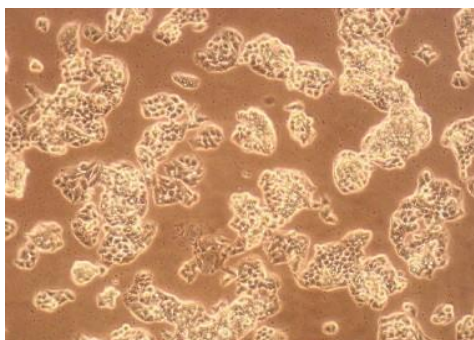
Bürkerova komůrka má přesně definovaný objem a je systémem **trojitých** čar rozdělena na 9 velkých čtvercových polí (3 x 3) a každé velké pole je rozděleno systémem **dvojitých** čar na 16 malých čtvercových polí (4 x 4).

Provedeme počítání buněk pod mikroskopem. Spočítáme počet buněk v 5-ti náhodně vybraných velkých čtvercových polích v horní části Bürkerovy komůrky a poté v 5-ti náhodně vybraných velkých čtvercových polích v dolní části Bürkerovy komůrky. Počítáme zvlášť bezbarvé (živé) a nabarvené (modré - mrtvé) buňky. Vypočteme aritmetický průměr z počtů buněk v 10-ti polích. Následně vypočteme viabilitu a koncentraci buněk:

$$Viabilita (\%) = \frac{\text{počet živých buněk}}{\text{počet živých buněk} + \text{počet mrtvých buněk}}$$

Koncentrace (mil./ml) = průměrný počet živých buněk ve velkém čtverci

Každá dvojice studentů provede vyšetří buněk. Pracovní buněčnou suspenzi naředíme sérovým kultivačním médiem tak, abychom získali požadované množství suspenze (40 ml) o koncentraci 150 000 buněk/ml. Následně pomocí multikanálové pipety vysejeme suspenzi na 3 kultivační 96-ti jamkové desky, 200 µl suspenze na jamku, tj. 30000 buněk na jamku. Desky s buňkami umístíme do inkubátoru (37°C) a kultivujeme je přes noc.





## Příprava roztoků testovaných látek a médií

V praktickém cvičení provedeme testování cytotoxicity vybraných látek. Jako rozpouštědlo (vehikulum) bude využit dimethylsulfoxid (DMSO). Testované látky budou kofein a kuchyňská sůl (NaCl).

Kultivační média včetně aditiv budou zajištěna z komerčních zdrojů dle doporučení výrobce. Pro kultivaci A2780 buněk využijeme RPMI 1640 obsahující antibiotika (penicilin, streptomycin), glutamin a 10 % fetální bovinní sérum.

### Návod:

Připravíme si zásobní roztoky testovaných látek v RPMI 1640, které poté budeme aplikovat na buňky v 96-ti jamkové destičce. Zásobní roztok o nejvyšších koncentracích kofeinu (62,5 mM) a NaCl (2M) připraví vedoucí cvičení. Ty použijeme k přípravě roztoků o požadovaných koncentracích, které budeme testovat. Připravíme koncentrační škálu v logaritmickém měřítku, tzn. dvě sousední koncentrace lišící se 10 x (viz tabulka č. 1 a 2). Látky skladujeme do příštího bloku praktik při 4°C.

Připravíme následující koncentrace látek:

Tab. č. 1: Ředění NaCl

Zkumavka	Množství média	Množství roztoku NaCl	Výsledná koncentrace NaCl
1	2,5 ml	2,5 ml 2M	1 M
2	1,5 ml	1,5 ml 1M	0,5 M
3	2,7 ml	300 µl 0,5M	0,05 M
4	2,7 ml	300 µl 0,05M	0,005 M
5	2,7 ml	300 µl 0,005M	0,0005 M
6	2,7 ml	300 µl 0,0005M	0,00005 M

Tab. č. 2: Ředění kofeinu

Zkumavka	Množství média	Množství roztoku kofeinu	Výsledná koncentrace kofeinu
1	2,5 ml	2,5 ml 62,5mM	31,25 mM
2	1,5 ml	1,5 ml 31,25mM	15,625 mM
3	2,7 ml	300 µl 15,625mM	1,56 mM
4	2,7 ml	300 µl 1,56mM	0,156 mM
5	2,7 ml	300 µl 0,156mM	0,0156 mM
6	2,7 ml	300 µl 0,0156mM	0,00156 mM

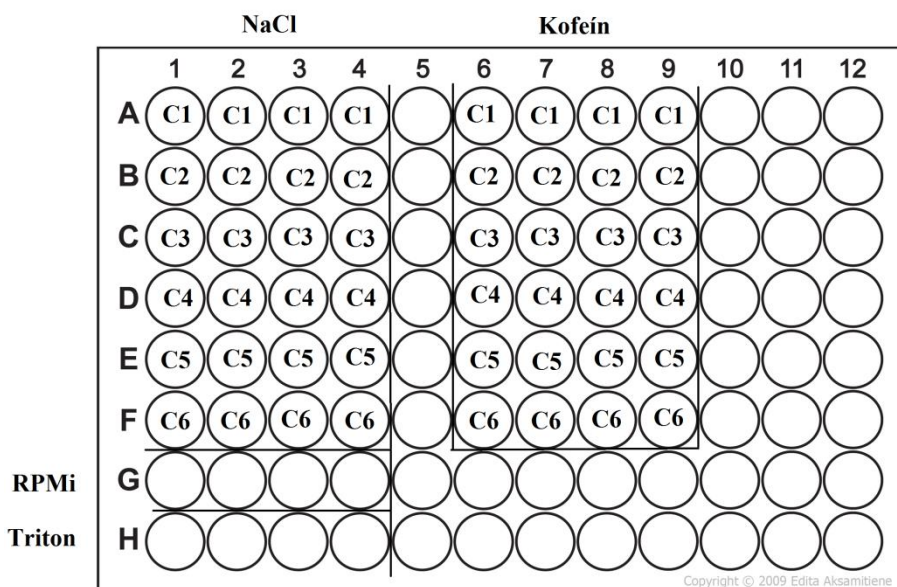
## Sledování časové a koncentrační závislosti cytotoxicity *in vitro*

V druhém bloku praktických cvičení provedeme inkubace testovaných látek připravených v minulém bloku s A2780 buňkami vyšetými na 96-ti jamkové desky. Sledovat budeme časovou a koncentrační toxicitu těchto látek pomocí metodiky MTT testu.

### Návod:

Jako negativní kontrolu použijeme médium obsahující 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrolu médium obsahující 2% Triton-X100. Z kultivačních desek s A2780 buňkami vyšetými v předchozím bloku cvičení odsajeme za sterilních podmínek kultivační médium (předvede vyučující). Následně pomocí automatické pipety nasadíme za sterilních podmínek látky na buňky. Aplikujeme 200  $\mu$ l roztoku na jamku. Každý jednotlivý experiment (tzv. treatment) provedeme v tetraplikátu, tj. stejnou látku ve stejné koncentraci nasadíme paralelně do 4 kultivačních jamek. Testujeme 2 různé látky v 6-ti koncentracích a 4 paralelních vzorcích, plus 2x negativní a 2x pozitivní kontrola – tzn. nasazení provedeme celkem v 56-ti jamkách. Schéma nasazení látek bude vysvětleno vyučujícím. Každá dvojice studentů nasadí látky v identickém schématu paralelně na 3 kultivační desky. Pro studium časové a koncentrační závislosti cytotoxicity budou inkubace na těchto jednotlivých deskách ukončeny (a následně nasazen MTT test – viz níže) v časech 1 hod, 3 hod a 24 hod.

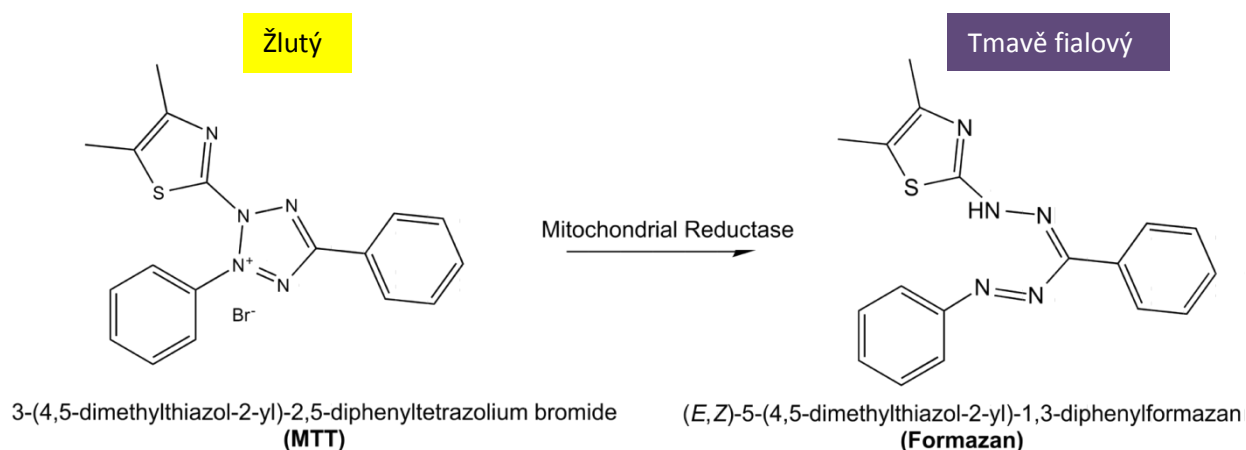
Obecné schéma vyšetí testovaných látek na kultivační desky:



Označení vzorku	NaCl [M]	Kofeín [mM]
C <sub>1</sub>	0,00005	0,00156
C <sub>2</sub>	0,0005	0,0156
C <sub>3</sub>	0,005	0,156
C <sub>4</sub>	0,05	1,56
C <sub>5</sub>	0,5	15,625
C <sub>6</sub>	1	31,25

## MTT test

Jedná se o test životnosti buněk. Vychází ze skutečnosti, že v živé buňce fungují mitochondriální dehydrogenasy, zatímco v buňce poškozené či mrtvé nikoliv. Buněčná kultura je inkubována s roztokem tzv. methyltetrazoliové soli (odtud MTT), což je sloučenina, která má v oxidovaném stavu žlutou barvu a ve stavu redukovaném tmavě fialovou barvu. Stupeň konverze MTT na fialový produkt je tedy přímo úměrný aktivitě mitochondriálních dehydrogenas a tedy životnosti buněk. Jak již bylo zmíněno výše, v experimentálním uspořádání se zařadí do kultury i tzv. negativní kontrola (rozpouštědlo = 100% životnost) a pozitivní kontrola (modelový toxin nebo tenzid Triton-X100 = 0% životnost).



## Návod:

MTT test provedeme po ukončení inkubací A2780 buněk s testovanými látkami (po uplynutí požadovaného času). Obsah kultivační desky (96-jamkové) opatrně vyklepneme do výlevky a kapky média ulpělé na okrajích jamek odstraníme osušením buničinou. Za použití vícekanálové pipety aplikujeme do každé jamky na buňky 100  $\mu$ l pracovního roztoku MTT (0,3 mg/ml v RPMI) a desku umísíme do inkubátoru, dokud se nevytvoří viditelné fialové krystaly (0,5 – 1 hodina).

Po ukončení inkubace vylijeme obsah desky do výlevky a kapky média ulpělé na okrajích jamek odstraníme osušením buničinou. Fialové krystaly redukovaného MTT rozpustíme aplikací 100  $\mu$ l DMSO do každé jamky pomocí vícekanálové pipety. Doba působení DMSO je cca 5 minut za mírného protřepávání. V tento okamžik jsou vzorky připraveny buď ke skladování v lednici přes noc, nebo k následné spektrofotometrické analýze.

## Spektrofotometrie

Ke kvantitativnímu vyhodnocení MTT testu se využije metoda absorpční spektrofotometrie ve viditelné oblasti, neboť produkt reakce vykazuje tmavě fialové zbarvení. Jedná se o absorpční spektrální techniku, kdy měříme tzv. transmitanci (T) neboli propustnost, tj. poměr intenzity světla před vstupem do roztoku a vystupujícího z roztoku:

$$T = 100 \times (I/I_0)$$

$I_0$  = intenzita světla na vstupu do vzorku

$I$  = intenzita světla na výstupu ze vzorku

Transmitance není lineárně závislá na koncentraci analytu a vykazuje logaritmickou závislost:

$$T = 10^{-\epsilon \times c \times l}$$

kde  $c$  je molární koncentrace látky,  $l$  je délka dráhy procházejícího světla vzorkem v centimetrech a  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient dané látky, který závisí na povaze látky a použité vlnové délce světla ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Po konverzi exponenciální funkce získáme tzv. Lambert-Beerův zákon:

$$A = -\log T = \epsilon \times c \times l$$

Definujeme pak parametr absorbance (A), která je lineární funkcí koncentrace analytu. Ve spojení s MTT testem lze říci, že absorbance vzorku je přímo úměrná životnosti buněk.

### Návod:

Plastové destičky s rozpuštěnými krystaly produktu v DMSO vložíme do UV/VIS spektrofotometru (předvede a obsluhu přístroje vysvětlí vedoucí cvičení), který zatřepáním promíchá měřené vzorky a provede změření absorbance ve všech jamkách při vlnové délce 540 nm.



## Vyhodnocení

Měření absorbance byla prováděna paralelně v tetraplikátech. Nejprve vypočteme aritmetický průměr pro jednotlivé vzorky:

$$A_{\text{prům}} = (A_1 + A_2 + A_3 + A_4)/4$$

Od získaných hodnot průměrné absorbance při 540 nm odečteme průměrnou hodnotu pozadí:

$$A_{\text{corr}} = A_{\text{prům}} - A_{\text{BL-prům}}$$

Kde  $A_{\text{corr}}$  je korigovaná absorbance;  $A_{\text{prům}}$  je průměrná absorbance vzorku;  $A_{\text{BL-prům}}$  je průměrná absorbance pozadí.

MTT test je toxikologický parametr, kdy při dosažení maximálního buněčného poškození (např. inkubací s Tritonem-X100) je hodnota MTT testu blízká pozadí, tj. nepřichází v úvahu reziduální hodnoty MTT. Proto lze viabilitu buněk vypočítat ze zjednodušeného vzorce:

$$\text{Viabilita (\%)} = 100 \times \frac{A_{\text{corr-vzorek}}}{A_{\text{corr-DMSO}}}$$

Viabilitu vypočteme pro každý změřený vzorek.

**Koncentrační závislost cytotoxicity** – v daných inkubačních časech sestojíme křivky závislosti viability (osa Y) na koncentraci látky (osa X). Koncentraci látek vyjádříme v logaritmickém měřítku (log c) a získané závislosti by měly mít sigmoidní průběh (viz výše). Ze získaných grafických závislostí odečteme hodnoty koncentrací  $IC_{50}$  pro jednotlivé látky.

**Časová závislost cytotoxicity** – pro vybrané koncentrace testovaných látek sestojíme křivky závislosti viability (osa Y) na době inkubace v hodinách (osa X).

Příklad tabulky v protokolu pro NaCl:

Koncentrace [mol/l]	Koncentrace log	A1	A2	A3	A4	$A_{\text{průměr}}$	$A_{\text{triton}}$	$A_{\text{médiu}}$	Viabilita [%]
0,00005									
0,0005									
0,005									
0,05									
0,5									
1									

	A1	A2	A3	A4	$A_{\text{průměr}}$
Médiu					
Triton -pozadí					