

Buněčné kultury, metody hodnocení buněčného poškození

Moderní techniky studia buňky

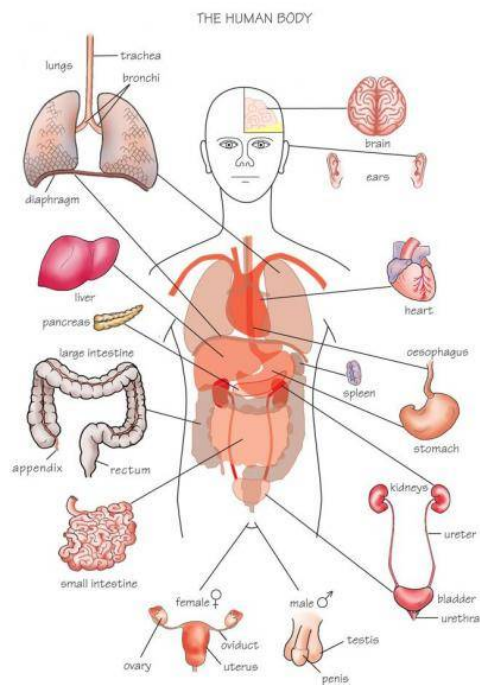
Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D

Význam buněčných kultur

- Francouzský lékař a laureát Nobelovy ceny Alexis Carrel (1873–1944) – buňky kuřecího srdce (27 let)
- Studium regulace buněčného cyklu a diferenciacie buněk
- Studium procesů vedoucích ke vzniku a progresi nádorových chorob
- Produkce monoklonálních protilátek, které jsou nezbytné při diagnostice mnoha onemocnění
- Testování účinků léčiv a jiných chemických látek, které by mohly ohrozit zdraví člověka, stanovení genotoxicity
 - nahrazení pokusů s laboratorními zvířaty?
- Klinická genetika
 - prenatální vyšetření (amniocyty z plodové vody, buňky choriových klků)
 - postnatální vyšetření (kultury lymfocytů periferní krve)
 - chromozomové vyšetření nádorových buněk
- Virologie – kultivace a izolace virů

Primární buněčné kultury

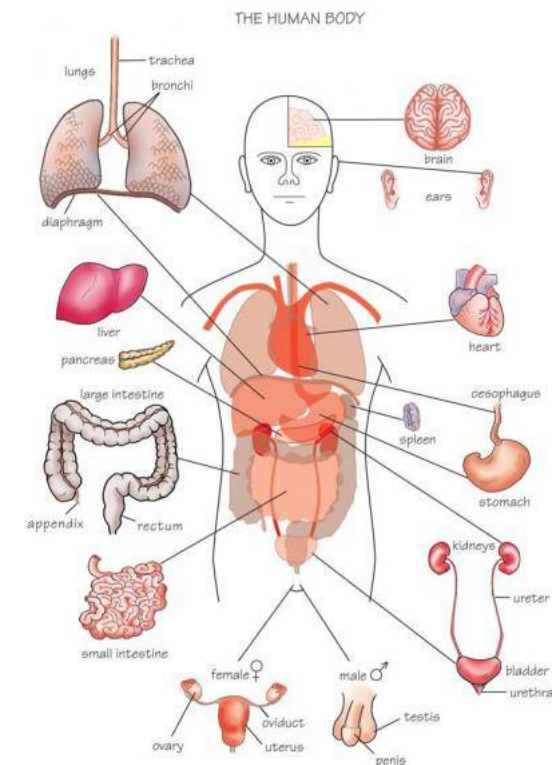
- PRIMOKULTURY a BUNĚČNÉ LINIE
- Izolované z orgánů a tkání živých tvorů (myš, krysa, prase, člověk)
- Fragmentu tkáně nebo z materiálu , který vznikne po enzymovém či mechanickém rozrušení tkáně
- Často ve stavu tzv. G0 fáze – nedělí se, existuje pouze několik dní
- Dělení buněk – první subkultivace (pasážování) = vznik buněčné linie



Primární buněčné kultury - primokultury

- Hepatocyty (játra), kardiomyocyty (srdce), gingivální fibroblasty (dásně), placentární syncytiotrofoblasty apod.
- Technicky náročná izolace – zdokonalení technologie diferenciacie embryonálních a zejména indukovaných pluripotentních kmenových buněk poskytlo fyziologicky relevantní model pro testování bezpečnosti léčiv

- Právní aspekty – člověk, odlišná legislativa v různých zemích (EU, USA, Japonsko, Čína)
- Řízená komercializace buněk nebo buněčných kultur
- Problémy se skladováním – kryoprezervace – ztráta životnosti a funkcí
- Interindividuální variabilita
- Studium toxicity a metabolismu xenobiotik
- Obecné biologické, fyziologické, biochemické studie apod.
- Terapeutický potenciál
- Biotechnologie



Buněčné linie

- Vznikají z první úspěšné subkultivace (pasáž) z primokultury
- Dva typy:
 - 1) Buněčné kmeny
 - 2) Imortalizované/kontinuální buněčné linie

Buněčné kmeny

- Kultury normálních diploidních buněk, které byly již alespoň jednou pasážovány
- vznikají z buněk, které se v podmínkách *in vitro* začaly rozmnožovat
- Inhibice produkce telomerázy a zkracování telomer
- Zanikají po 40-50 pasážích

Imortalizované/permanentní buněčné linie

- Jsou plně adaptovány na podmínky *in vitro*
- Neomezeně se dělí a lze je přechovávat libovolně dlouho
- Vznikají transformací buněčných kmenů anebo jde o buňky původně izolované z nádorů (= nádorové buněčné linie)
- Opičí polyomavirus SV-40 – inaktivace tumor supresorových genů (p53, RB.), indukce telomerasové aktivity

Komerční buněčné linie

- většinou nádorové buňky s definovaným fenotypem
- odvozené od určitého orgánu či nádoru, specifické podmínky kultivace
- specifické uplatnění při testování toxicity
- ATCC = American Tissue and Cultures Collection (založena r. 1925; více 3400 lidských, zvířecích a rostlinných buněčných linií)



- ECACC = European Collection of Cell Cultures (založena r. 1984, přes 40 000 buněčných linií)



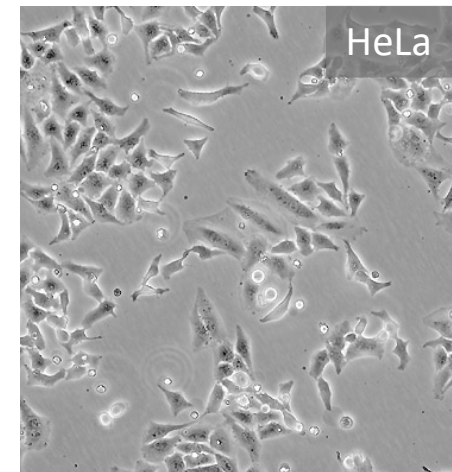
- Dodávány ve zmrazené formě, dlouhodobé skladování
- Studium toxicity – lidské buněčné linie; použity by měly být pouze lidské linie, které byly získány eticky a odebrány přísně kontrolovanými postupy

Přehled nádorových buněčných linií

- buněčná linie HeLa

- Na počátku jedinou dostupnou kontinuální lidskou buněčnou linií
- Izolována americkým biologem Georgem Otto Geyem v říjnu roku 1951 z karcinomu děložního krčku Henrietty Lacksové
- Zemřela ve 31 letech, 8 měsíců od objevení nádoru, na následky metastáz

Případ Henrietty Lacksové vyústil v soudní spor, jelikož G. O. Gey odběr buněk provedl bez konzultace a ani Henriettina rodina dlouho nevěděla, že jsou její buňky používány v laboratořích po celém světě.
Nesmrtelný život Henrietty Lacksové - kniha (r. 2010), film (r. 2017)



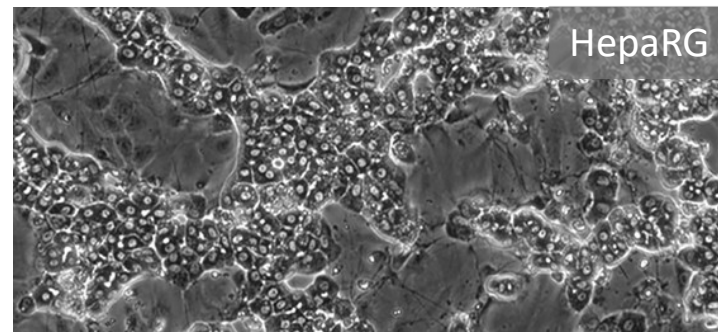
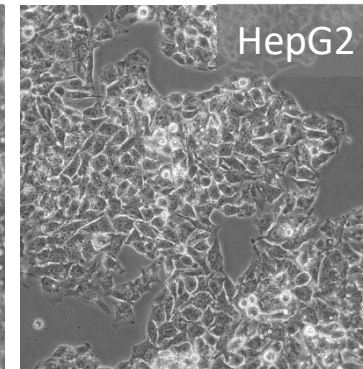
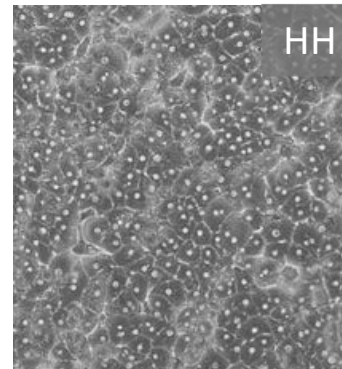
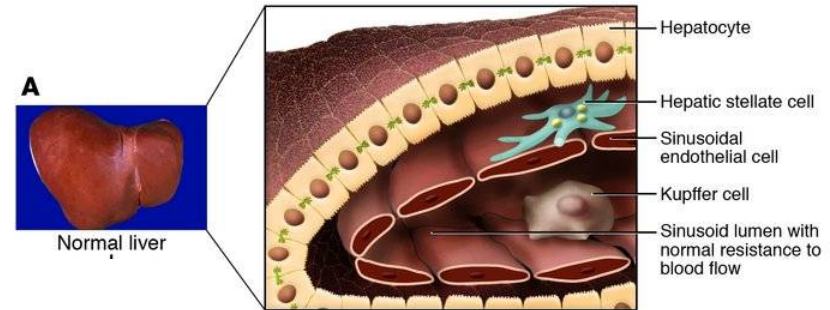
Přehled nádorových buněčných linií

– hepatomové buněčné linie

- Stabilní fenotyp, zaznamenaná genotypová nestabilita,
- Uchovávají si jen některé, pro hepatocyty specifické funkce
- Lidské, potkaní, prasečí hepatocyty
- Měření hepatotoxicity, hodnocení toxicity chem. látek a léčiv, testování genotoxicity

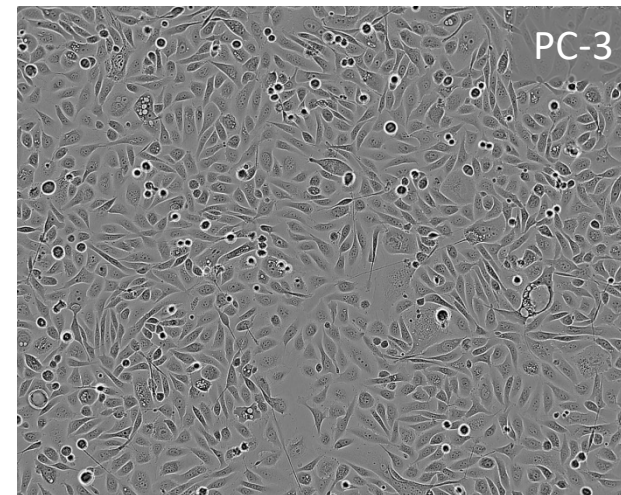
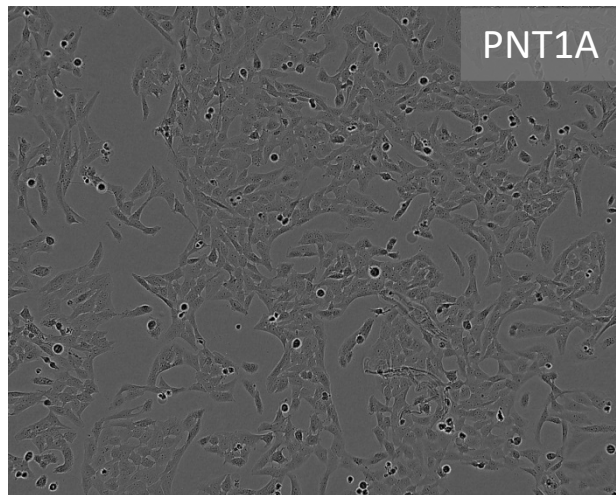
HepG2 – r. 1980 z primárního hepatoblastomu, 50x nižší exprese hlavních jaderných transportérů a metabolických enzymů

HepaRG – izolovaná z hepatocelulárního karcinomu, znaky dobře diferenciovaného hepatocytu, vysoké hladiny cytochromů p450, enzymů II.fáze, jaderných receptorů



Přehled nádorových buněčných linií – prostatické buněčné linie PNT1A a PC-3

- PNT1A - získaná imortalizací normálních epitelových buněk prostaty dospělého jedince transfekcí s plasmidem obsahujícím genom SV40
- PC-3 - nádorová buněčná linie odvozená ze 4. stupně adenokarcinomu prostaty; odebrána z metastáz v kosti



Dělení dle původu a vlastností

PRIMOKULTURY	PERMANENTNÍ LINIE
Heterogenní	Klon
Omezená životnost	Nesmrtelné
Většinou náročnější na kultivaci	Obecně snadno kultivovatelné
Variabilita izolací	Genetická nestabilita

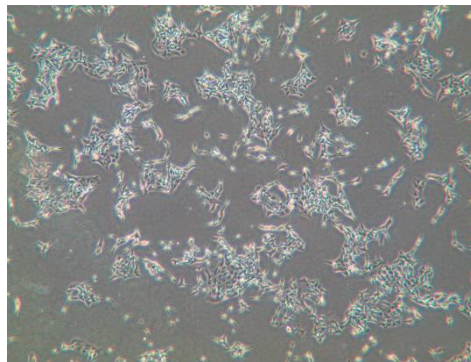
Dělení podle způsobu kultivace

- Suspenzní
- Imobilizované
- Adherentní

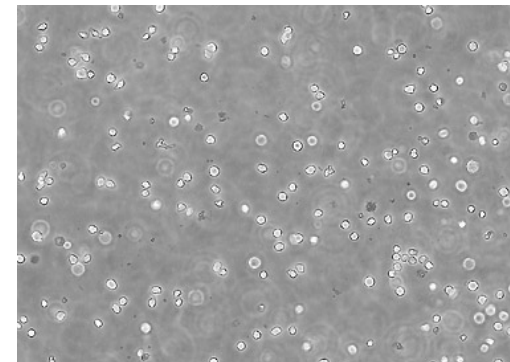
Suspenzní buněčné kultury

- Volně se vznášejí v mediu
- Obvykle buňky krve a jejich deriváty – lze kultivovat i dlouhodobě, proliferující buňky
- Studie toxicity, molekulární mechanismy, proliferace
- Krátkodobé kultivace (řádově hodiny)
- Studie toxicity a metabolismu xenobiotik

LLC-PK1



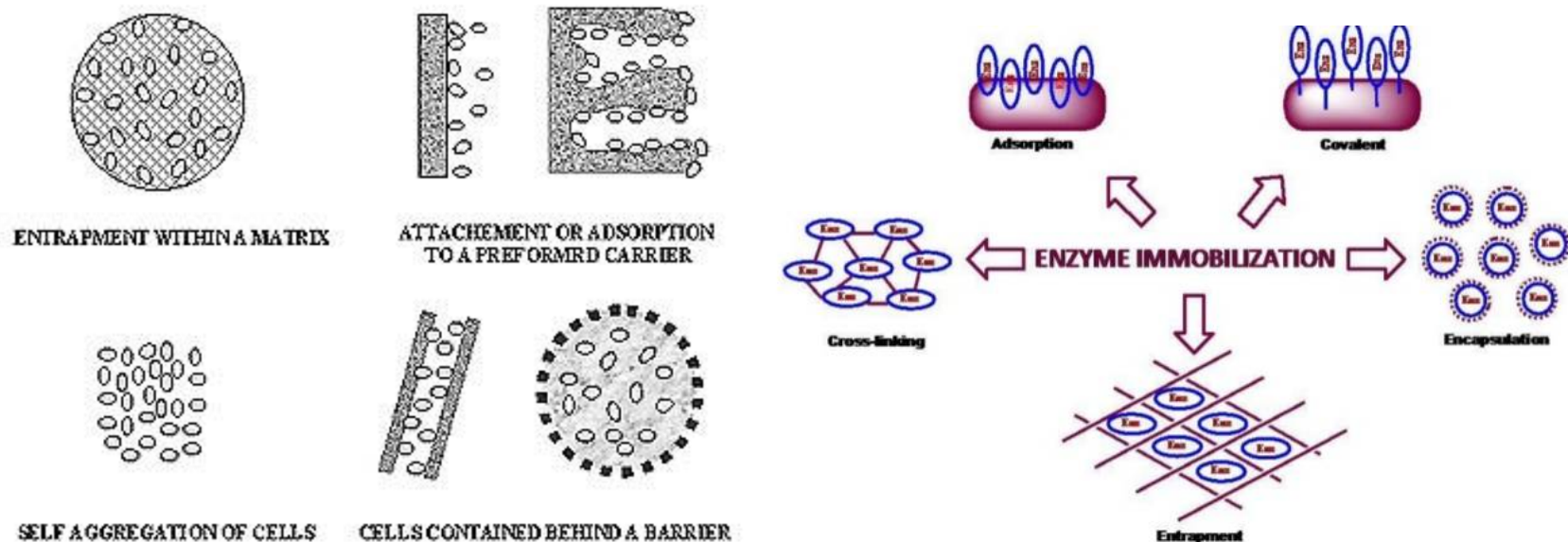
HL-60



Imobilizované buněčné kultury

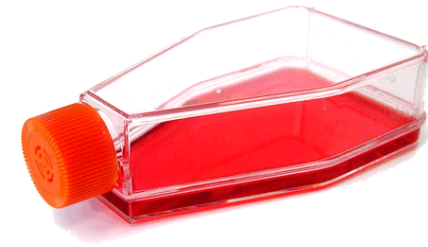
- Dutá vlákna, polymerové perličky apod.
- Bioreaktor - přívod živin pro buňky, včetně plynů, a odvod metabolických zplodin a rovněž metabolitů
- Systém simulující cirkulaci v krevním řečišti nebo orgánu
- Krátkodobé studie toxicity a metabolismu xenobiotik
- Technická náročnost, několik dnů

Typy buněčné imobilizace:

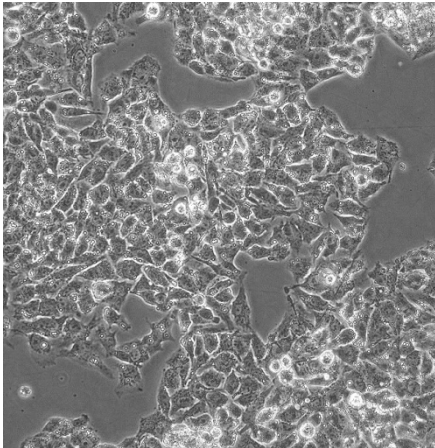


Adherentní buněčné kultury

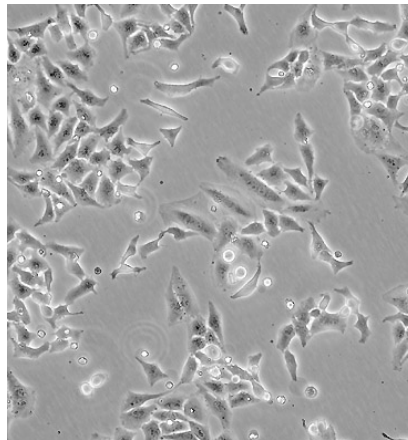
- Většina, rostou přichyceny k podkladu
- Kultivace v monovrstvě – plastové lahve, desky
- K adhezenci je často důležitý substrát – kolagen, laminin, elastin, upravené plastové povrchy (elektricky nabitě) atd.



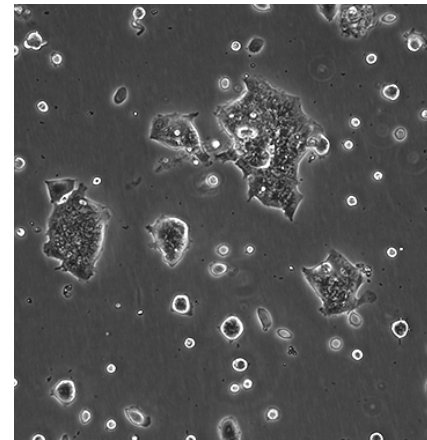
HepG2



HeLa



LS180



Upravené buněčné linie

KOMERČNÍ BUNĚČNÉ LINIE

- stabilní transfekce vektorů, reportérových genů
- high-throuput assays, screening, výzkumné účely
- certifikace, validované techniky a linie
- environmentální a klinické aplikace

VALIDOVANÉ ESEJE CALUX -www.biodetectionsystems.com

- Chemical Activated LUCiferase gene eXpression (CALUX)
- původně detekce aktivátorů AhR receptoru – dioxiny, PCB, PAU atd.
- hepatomové linie stabilně transfekované DRE-LUC reporterem (**H4IIE**)
- nověji detekce xenobiotik, steroidních hormonů (estrogeny, glukokortikoidy)
- PXR-RE, GRE-LUC, ER-LUC
- přísné licenční podmínky, neustálý vývoj nových linií šitých na míru

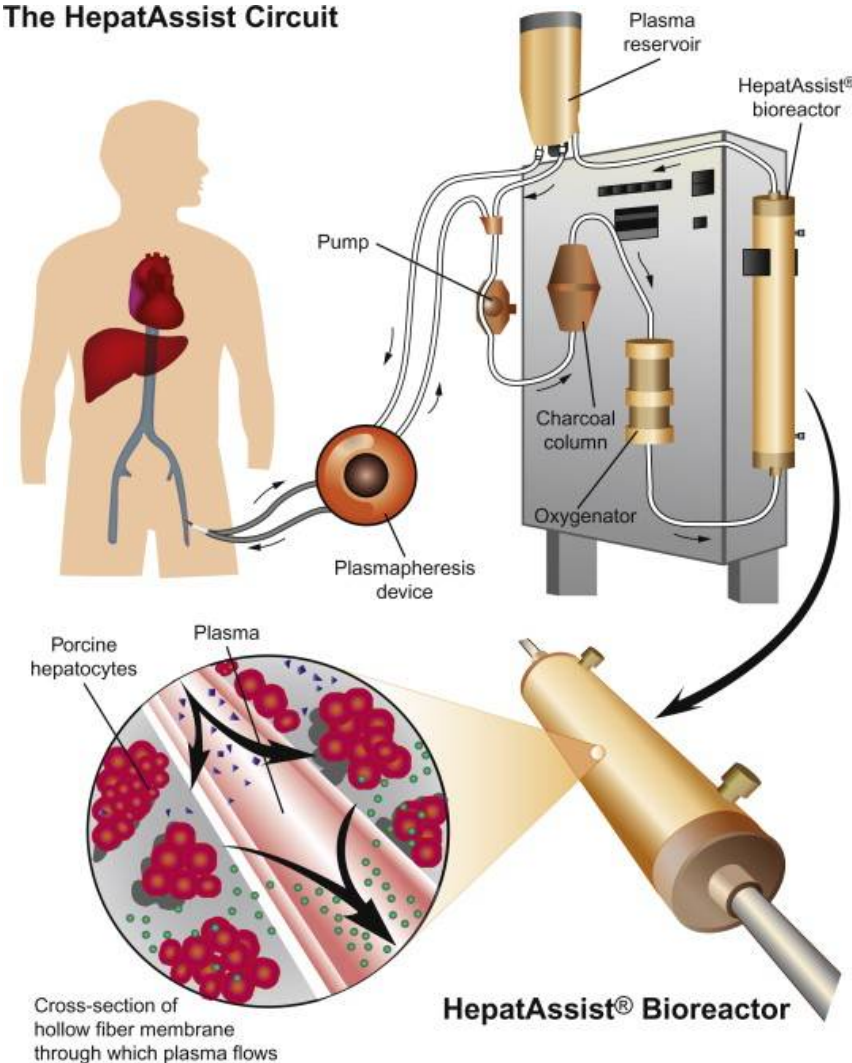
Tkáně a orgány

- Tkáně umíme kultivovat / připravovat jen velice omezeně, většinou jde pouze o uchování po určitou dobu, podobně jako orgány.
- Orgány - přívod živin, kyslíku a odvodu metabolitů a CO₂. Orgány je tedy třeba mít metabolicky utlumeny (podchlazením) a nebo napojeny na oběh s živinami simulující krevní zásobení.
- V současné době je zvládnutá problematika krve (lze zamrazit), částečně pak epidermis / kůže a jaterní tkáně.
- Využití buněk pankretu (Langerhansových ostrůvků) z prasat
- Transplantace - buňky a tkáně připravené z kmenových buněk
- Epidermis – primokultury prasečích / lidských keratinocytů pěstované na syntetických nosičích se používají k regeneraci poškození epidermis po popáleninách apod.

Tkáně a orgány – přístrojová podpora akutně selhávajících jater

- Částečné úspěchy jsou při přípravě umělých jater - kombinace biologických tkání s využitím nebiologických materiálů
- Separované hepatocyty jsou immobilizovány do reaktoru v systému dutých vláken
- Bioreaktor připomíná skutečná játra s krevním oběhem a odvodem žluči
- Hepatocyty se však zatím nedaří dostatečně efektivně zamrazovat k dlouhodobému uskladnění a tak využití podle potřeby.

The HepatAssist Circuit



Provozování tkáňových kultur spočívá v zajištění optimálních podmínek pro růst a přežívání kultivovaných buněk / tkání!

- **FYZIKÁLNÍ, CHEMICKÉ a BIOLOGICKÉ** faktory, které je třeba regulovat za běžných laboratorních podmínek.

Na **CHEMICKÉ** faktory lze nahlížet jako na média (jejich komponenty) ve kterých buňky rostou a plyny, které tato média obklopují případně jsou v nich rozpuštěny

Složení médií

- **Veškeré komponenty použité pro přípravu médií musí být vysoké kvality, s minimem nežádoucích příměsí**
- Základem je **voda** a v ní rozpuštěné **anorganické soli**. Soli jsou zdrojem nezbytných iontů, a hrají významnou úlohu v zajištění vhodného **pH** (optimum většinou **7.2-7.4**) a **osmotického tlaku / Osmomolarita** (optimum většinou **280-320 mOsmol/L**). Nejzákladnější ionty obsažené v médiích jsou: **Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻, HCO³⁻**.

Esenciální látky pro růst buněk

- Sacharidy (většinou glukózu, jako zdroj energie), aminokyseliny (esenciální, neesenciální), vitaminy a stopové prvky.
- Insulin (příjem glukózy), transferin (příjem železa), selen (nezbytný pro funkci oxidačně-redukčních enzymů)—také tzv. minimální přídavek do médií

Další doplňky

- Lipidy (mastné kyseliny), steroidní látky, hormony, cytokiny, peptidy, proteiny extracelulární matrix, proteiny séra, nukleosidy,...

Mnohé z těchto látek jsou suplovány přídavkem séra (5 -10-20%),

Ochranné látky: 2-β-merkaptóetanol (snižuje oxidativní stres a může sloužit i jako zdroj síry) a antibiotika (ochrana proti mikroorganismům případně selekční agens)

Sérum

- **nejčastěji boviní fetální***, ale i jiné zdroje
- lidské, koňské, kozí, myší,...
- Embryonální (fetální), novorozenecká, dospělá
- **fetální => nízká hladina nízké afinitních imunoglobulinů (protilátek)*
- **Různé stupně kvality:** testy na přítomnost endotoxinů, na snášenlivost konkrétním typem buněk, na přítomnost virů
- **Různé země původu** (USA, Austrálie,...)
- **Různé šarže** (lot number)



Základní média v tkáňových kulturách

- Základem jsou tzv. **Earliho soli (Earle's Balanced Salts)**
- **BME with EBSS** – základní (basal) médium s Earliho solemi
- **Alfa MEM** – alfa modifikované Eaglovo médium
- **DMEM** – Dulbekovo MEM, běžné pro adherentní buněčné linie
- **RPMI 1640** – zejména buňky hematopoetického původu
- **IMDM** – Iscovovo modifikované Dulbeccovo médium, vhodné pro rychle rostoucí buňky
- **HamovoF12** – médium bohaté živinami, často v kombinaci 1:1 s DMEM jako základ pro kultury bez séra

pH



- Při přípravě médií je pH nastaveno/doladěno HCl (1M) a NaOH (1M).
- pH v kultuře se mění v důsledku metabolismu buněk, zejména produkcí laktátu a CO_2
- V průběhu kultivace je udržováno:
 - 1) Přítomnými ionty, zejména fosfátovými (z fosforečnanů)
 - 2) Proteiny s pufracími schopnostmi
 - **3) Systémem $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{CO}_2$**
 - 4) Alternativně silně pufrujícími látkami jako je HEPES, BES, TES
- K orientační detekci pH média v kultuře slouží fenolová červeň přidávaná do médií

Biologické faktory—v kultuře roste ještě něco navíc než požadujeme = čistota kultury / sterilita

- **Jiné buněčné linie** (zkreslení výsledků buněčnou specializací, dominance invazní buněčné linie = zánik původní buněčné linie)
- **Plísně, kvasinky, bakterie** (toxiny, vyčerpání média = zkreslení výsledků, úhyn buněk, ohrožení experimentátora)
- **Viry** (zkreslení výsledků, úhyn buněk, ohrožení experimentátora)

Mycoplasmata

- Běžným VIS mikroskopem prakticky nejsou vidět
- Intracelulární bezestěnné bakterie (trojvrstevná cytoplasmatická membrána)

DETEKCE (je třeba kultivovat bez antibiotik – možné přežívání na pozadí):

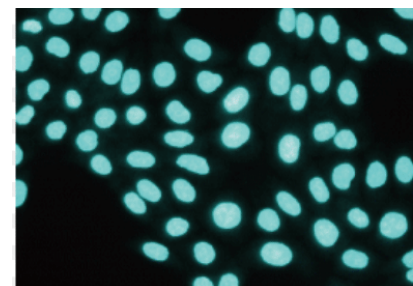
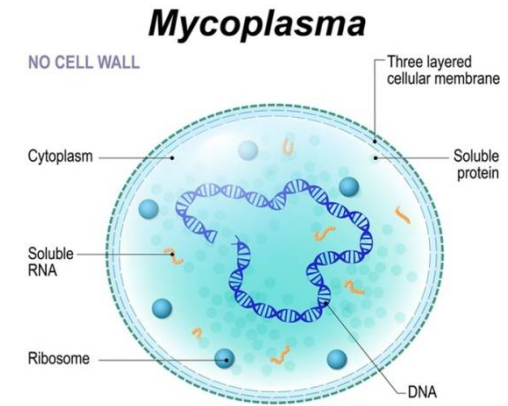
- Vitální barvení na DNA (Hoechst)
- Detekce specifických DNA sekvencí pomocí PCR
- *In situ* hybridizace (RNA , DNA)
- Měření enzymatické aktivity, systémy s transgenními buňkami

ZDROJE:

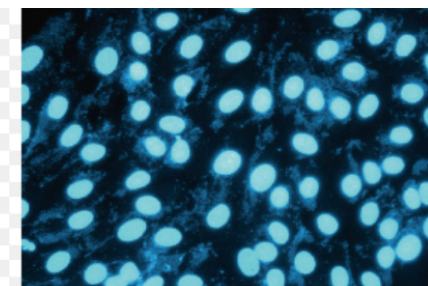
- Infikované buňky v TC!
- práce se zvířaty v laboratoři TC
- pracovníci laboratoře TC

LÉČENÍ:

- Kombinací antibiotik



Kontaminace mycoplasmou



Růst buněk

A) Buňky se v kultuře nedělí – je třeba periodicky měnit kultivační médium (terminálně diferencované, post mitotické buňky)

B) Buňky se v kultuře dělí = proliferují – je třeba je pasážovat (většina buněk primokultur i permanentních linií)

Pasážování – periodické „ředění buněk“, obecně spojené i s výměnou média

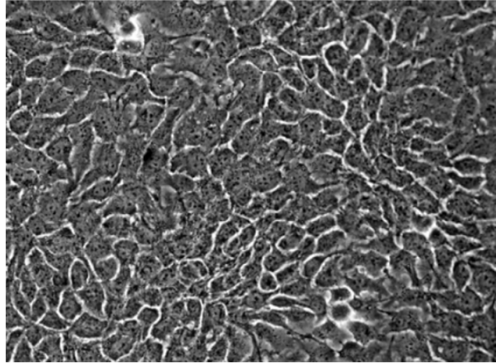
Adherentní linie – mechanicky nebo enzymatickým štěpením vazeb buňky / substrát; buňka / buňka

- Enzymy-trypsin, collagenáza,..; inaktivace spec. inhibitory, vyředěním,
- Nadbytkem proteinů (např. sérem)
- Podpůrné látky – EDTA (zejména vychytávání Ca^{2+})

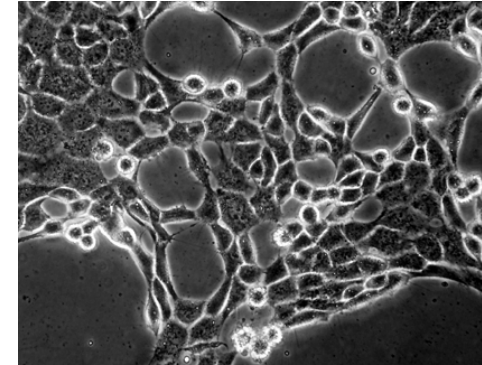
Suspenzní linie – prostým ředěním

Pasážování buněk pomocí tzv. trypsinizace (enzymatické rozvolnění)

Konfluentní buňky (100%)



Rozvolněné konfluentní buňky



*Rozvolnění buněk deplecí
 Ca^{2+} iontů (chelatony např. EDTA)*

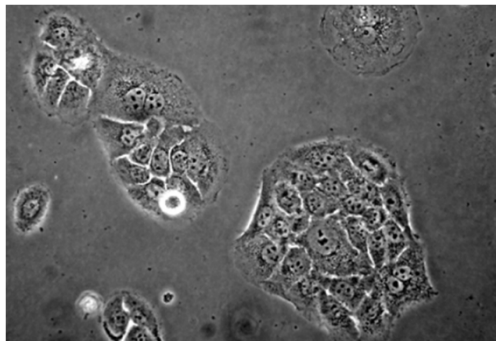


Růst kultury

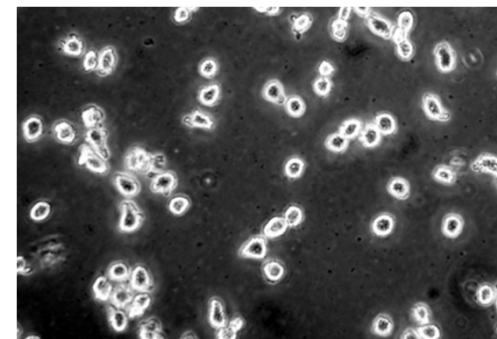
*Enzymatické štepení
např. trypsinem*



Nová pasáž (confluence ~20%)



Enzymaticky rozvolněné buňky (suspenze)

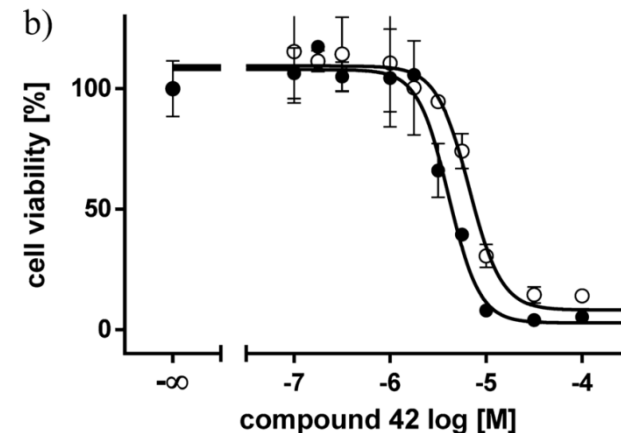
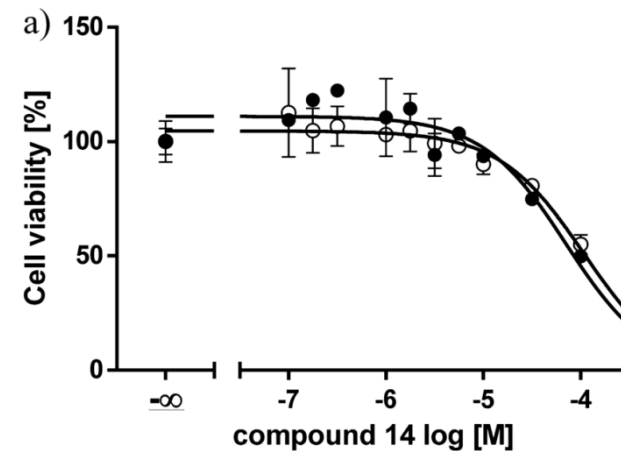


*Část buněk na novou misku,
do nového média*



Hodnocení cytotoxicity *in vitro*

- Sleduje se koncentrační závislost toxicity
- Obvykle logaritmická řada koncentrací
- Dose-response závislost většinou reprezentuje sigmoidní křivka
- Stanovení koncentrace IC₅₀; tj. **koncentrace noxy při které je dosaženo 50 % maximálního buněčného poškození**
- Přesněji: **IC₅₀ = half maximal inhibitory concentration** tj. **koncentrace kdy dochází k 50 % inhibici dané biologické aktivity**
- Čím nižší IC₅₀ tím toxičtější substance



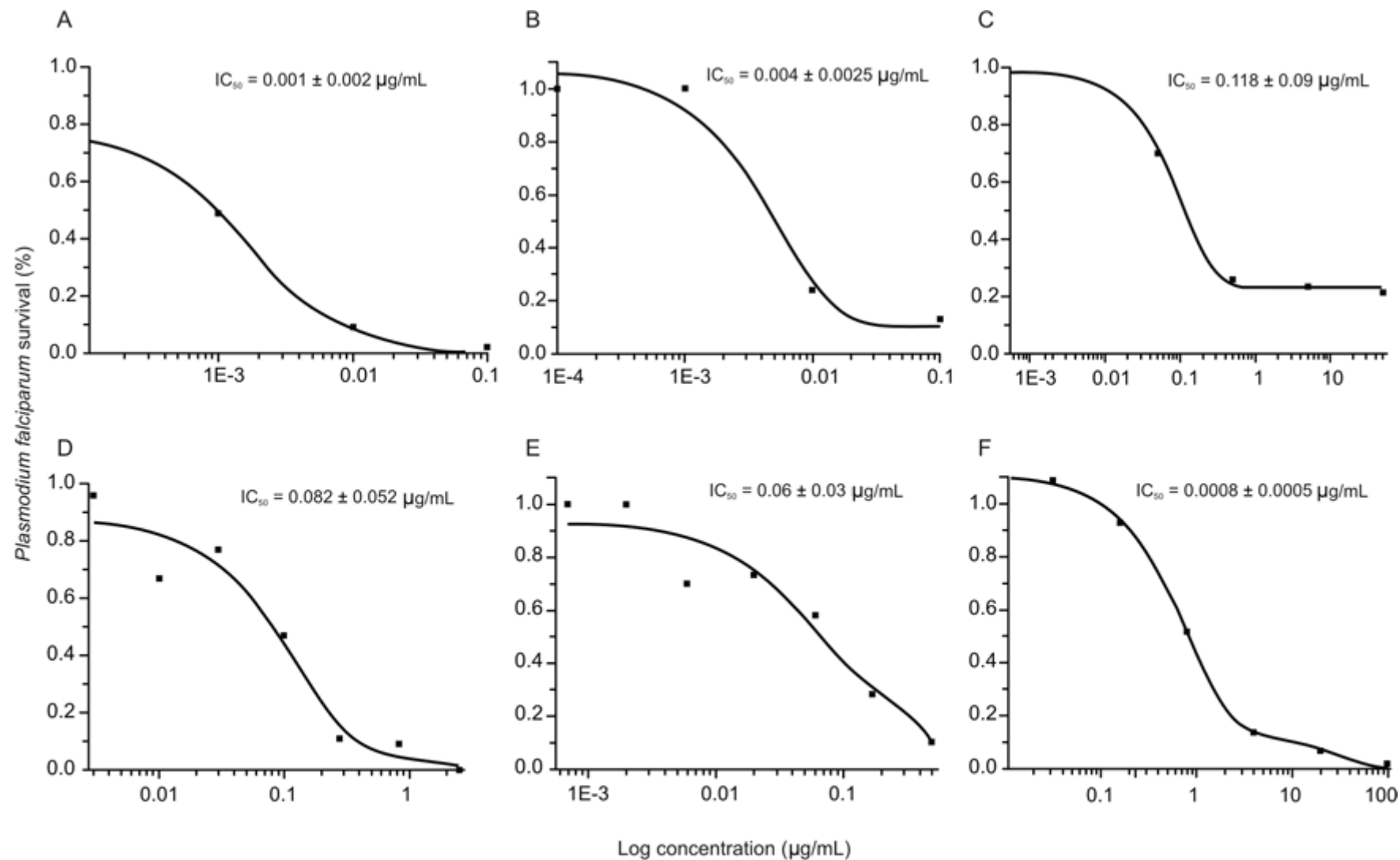


Fig. 4: dose-response curve from *Plasmodium falciparum* K1 parasite survival (chloroquine resistant) in the presence of various concentrations of quassinoid compounds and antimalarial drugs tested. A: isobrucein B (1); B: neosergeolide (2); C: di-acetylisobrucein B (3); D: chloroquine; E: quinine; F: artemisinin. Values are means $\pm$ SEM in representative experiment in duplicate. Significant differences in relation to controls by Mann-Whitney *U*-test with $p < 0.05$.

Silva, E. C. et al. 2009 "Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae)."

Hodnocení toxicity – buněčné poškození

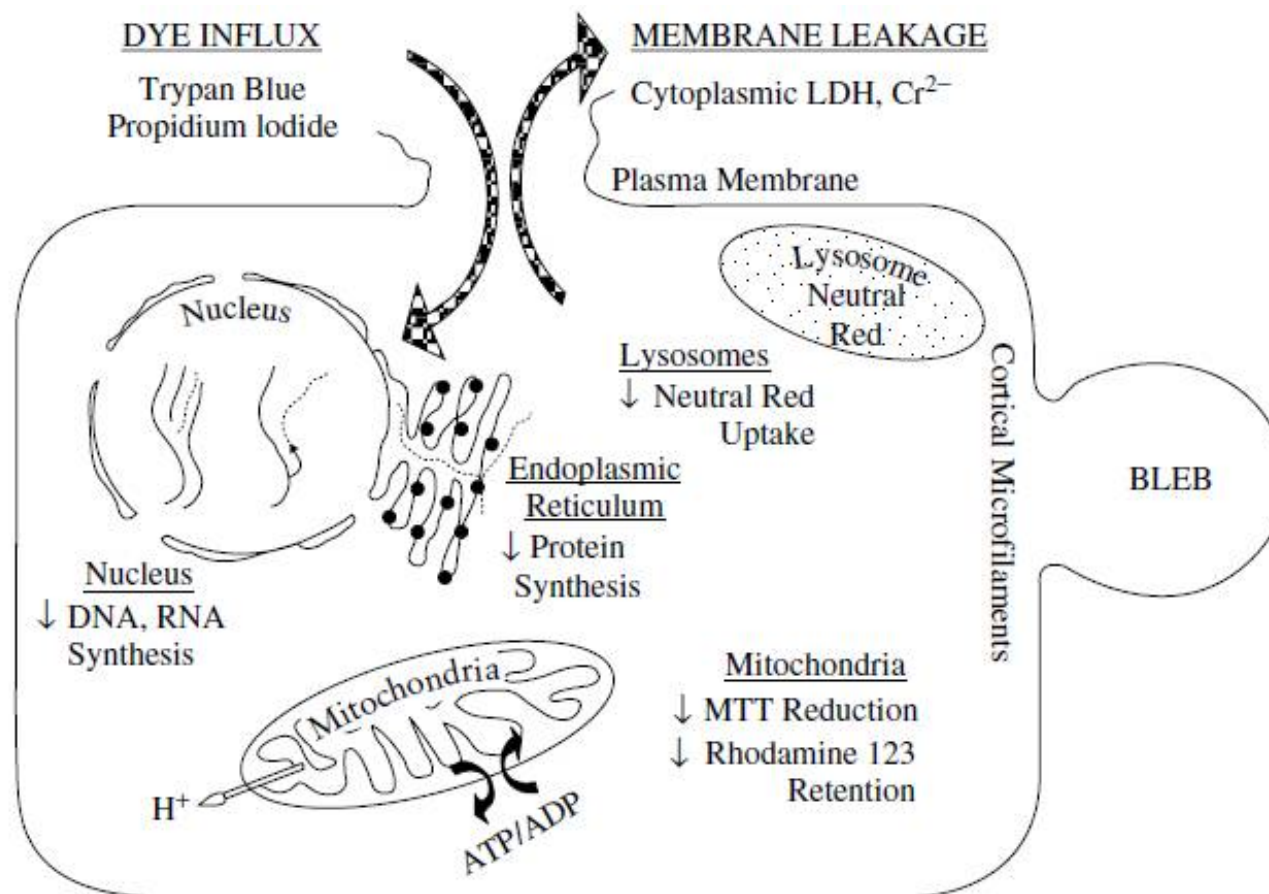


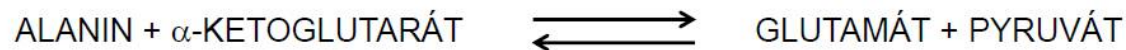
Figure 2.1 Idealized diagram of a cell to illustrate parameters often used to measure cytotoxicity and the corresponding affected subcellular organelle. (From *An Introduction to Biochemical Toxicology*, 3rd ed., E. Hodgson and R. C. Smart, eds., Wiley, 2001.)

Integrita buněčné membrány

- Mnoho typů buněčných poškození je doprovázeno narušením integrity buněčné membrány
- Oxidační poškození membránových lipidů; tenzidy apod.
- **Monitoring poškození buněčné membrány využívá stanovení katalytické aktivity intracelulárních enzymů** v kultivačním médiu (vně buňky); tj. enzym se dostane vně buňky je-li buněčná membrána poškozena

Laboratorní ukazatelé poškození jaterních buněk:

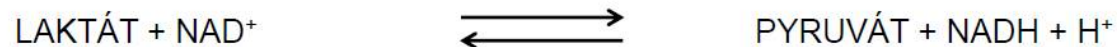
ALANINAMINOTRANSFERASA



ASPARTÁTAMINOTRANSFERASA



LAKTÁTDEHYDROGENASA



ALT, AST, LDH:

Při poškození daných buněk lze tyto enzymy detekovat v krevní plasmě

Warburgův optický test – stanovení aktivity enzymů



Dr. Otto Warburg (Oct 8, 1883 Aug 1, 1970)

Otto Heinrich Warburg
 * 8. 10. 1883, Německo
 NC 1931

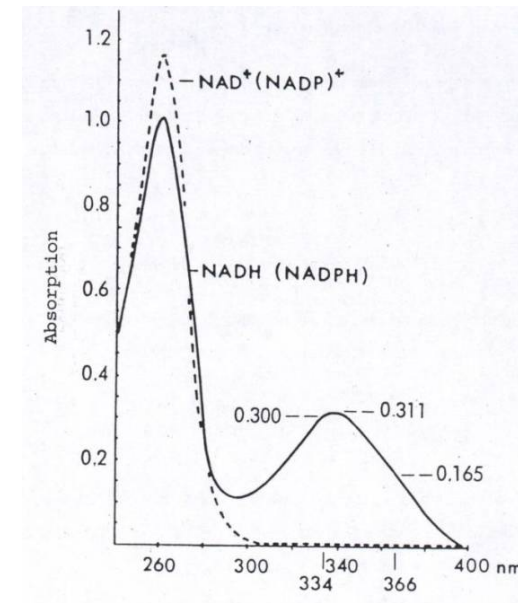
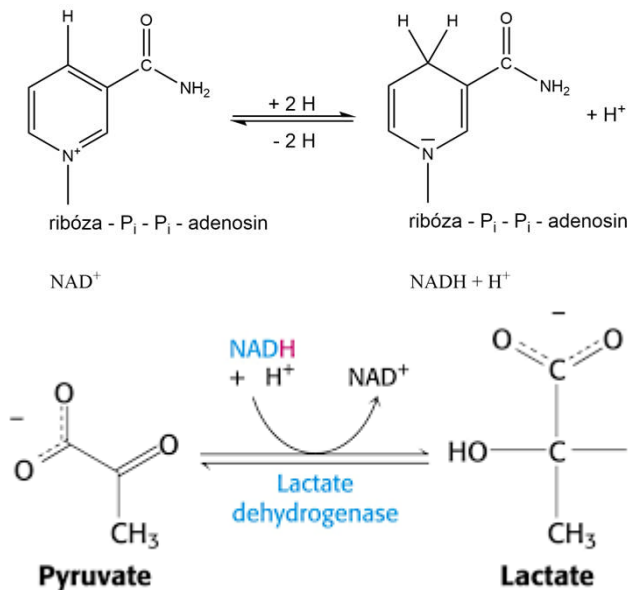
Otto Heinrich Warburg

Principem měření je přeměna NAD^+ na NADH , což se projeví změnou absorbance při 340 nm.

- Redukovaná forma NADH má charakteristickou absorpci při 340 nm
- Oxidovaná forma NAD nevykazuje žádnou absorbanci při této vlnové délce
- V daném experimentálním uspořádání je absorbance přímo úměrná množství redukovaného NADH
- Mnoho analytických stanovení se převádí na sledování poměru NAD/NADH

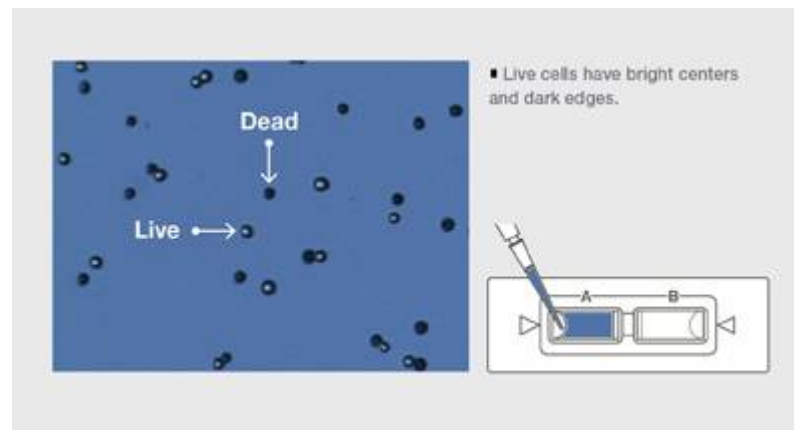
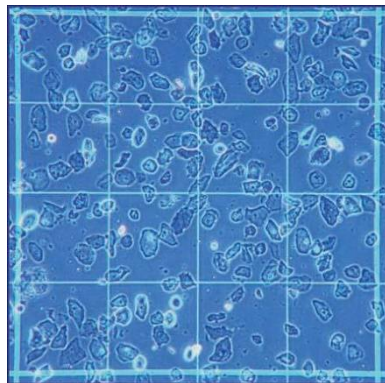
Měření se provádí v kinetickém módu $-\Delta A/\Delta t$

Provedení v kyvetách nebo v destičkách – automatizace



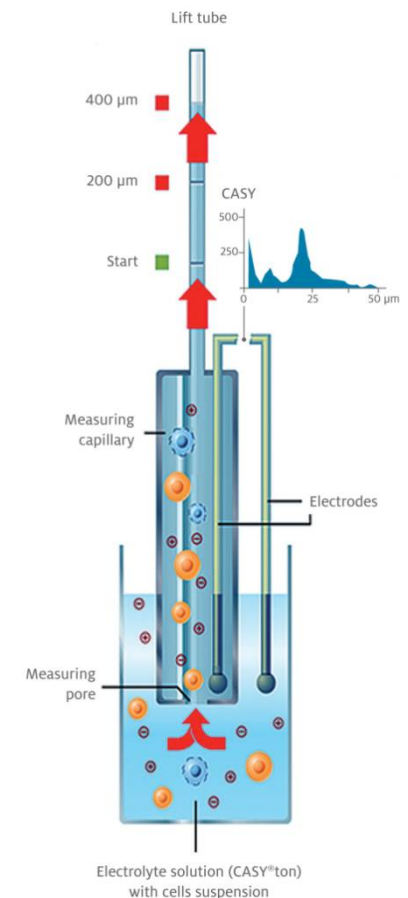
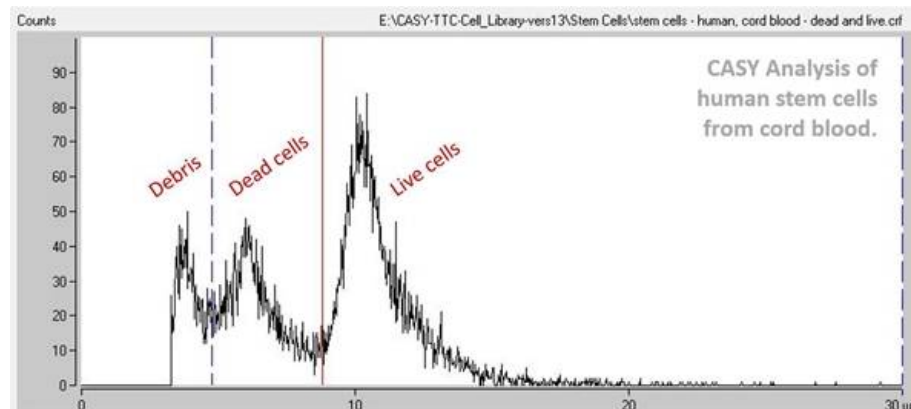
Integrita buněčné membrány

- Vstup cizorodých látek do buňky je přísně řízen vícerými mechanismy
- Integritu buněčné membrány lze sledovat pomocí influxu různých barviv
- Trypan Blue Exclusion Test: Založeno na principu, kdy živé buňky s neporušenou buněčnou membránou mají schopnost vypumpovat (nevpustit dovnitř) určité látky či barviva, např. propidium jodid, trypanovou modř apod.
- Buněčná suspenze se smísí s roztokem Trypanové modři a pod mikroskopem se hodnotí % zastoupení buněk, které mají zbarvenou cytoplazmu modře = viabilita



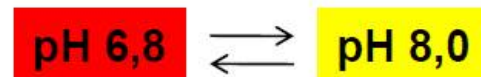
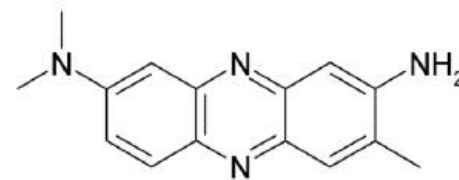
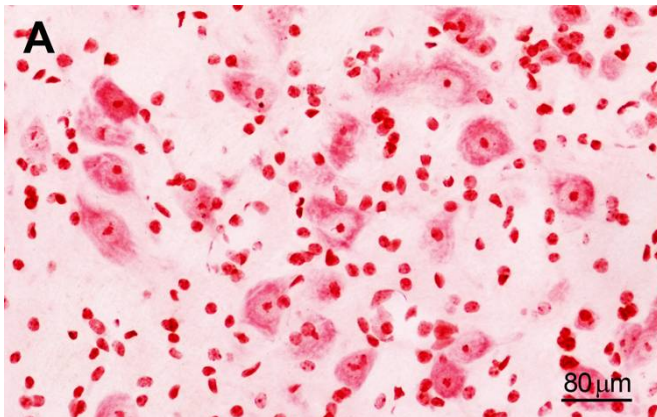
CASY technologie

- Neinvazivní metoda bez nutnosti značení
- Propouštění elektrického proudu (ECE – Electrical Current Exclusion) skrz buněčnou membránu živých a neživých buněk
- Vzorek buněk je odsáván přes měřicí pór, kterým prochází elektrický proud
- Živé buňky mají neporušenou membránu, přes kterou elektrický proud neprochází, díky tomu jsou zobrazeny ve své skutečné velikosti. Mrtvé buňky jsou z důvodu porušené membrány propouštějící elektrický proud zobrazeny ve velikosti svého buněčného jádra



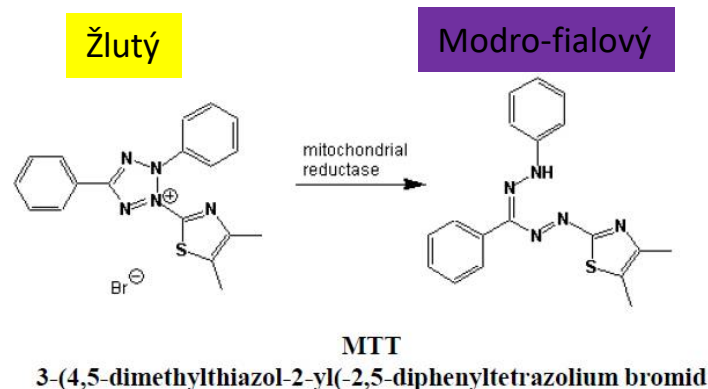
Lysosomy – barvení neutrální červení

- Neutrální červeň (NR) je pH indikátor
- Buňky jsou inkubovány s NR
- NR je v **lysozomech** konvertována na formu s červeným zbarvením
- Tj. pouze viabilní buňky se barví červeně
- Různá uspořádání testu: Mikroskopické pozorování nabarvených buněk
- Lýze a spektrofotometrické stanovení

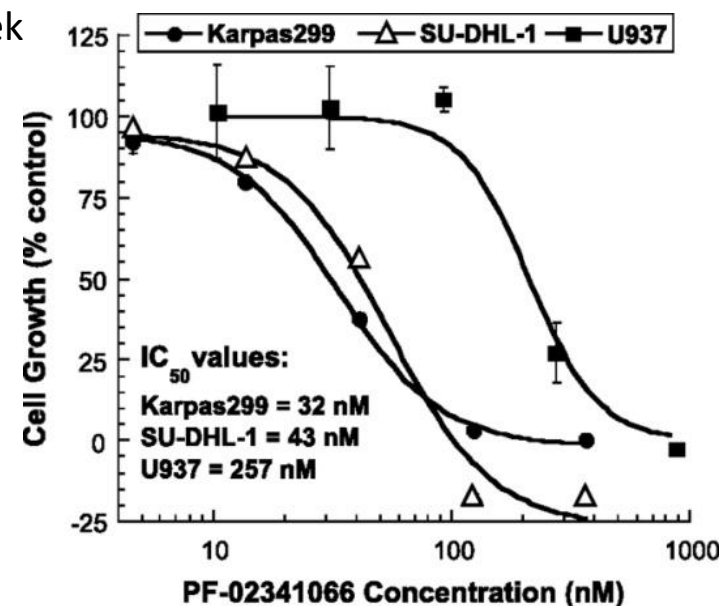
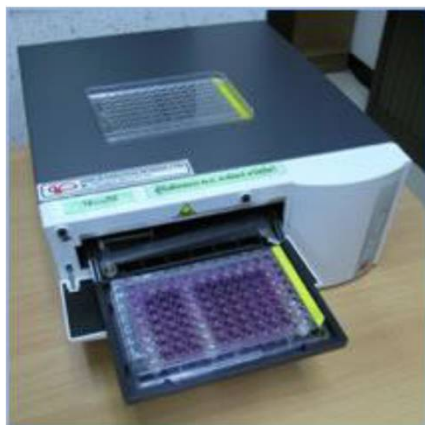
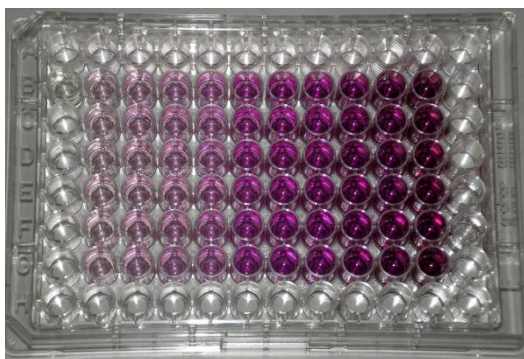


Mitochondrie – MTT test

- Viabilita buněk je monitorována jako aktivita mitochondriálních dehydrogenáz
- Živá buňka má aktivní dehydrogenázy
- MTT = methyltetrazoliová sůl
- Enzymy redukují žlutou formu MTT na modrofialový formazán

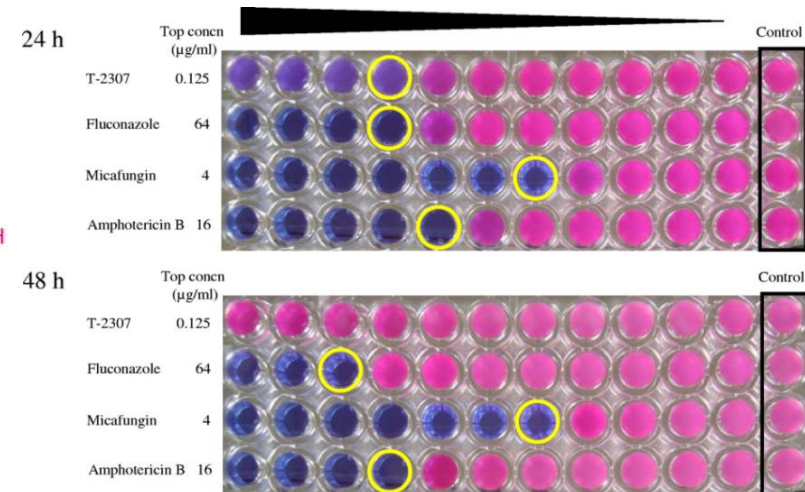
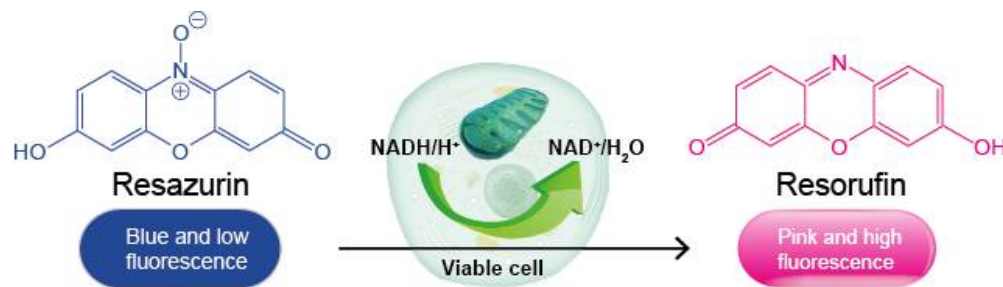


1. Inkubace s MTT cca 2 –4 hodiny při 37°C za definovaných podmínek
2. Lýza buněk a rozpuštění formazánu ve směsi DMSO + amoniak
3. Spektrofotometrické hodnocení – obvykle uspořádání na 96-jamkové destičce
4. Míra konverze MTT na formazán je úměrná % živých buněk
5. Dose-response analýza v logaritmickém měřítku



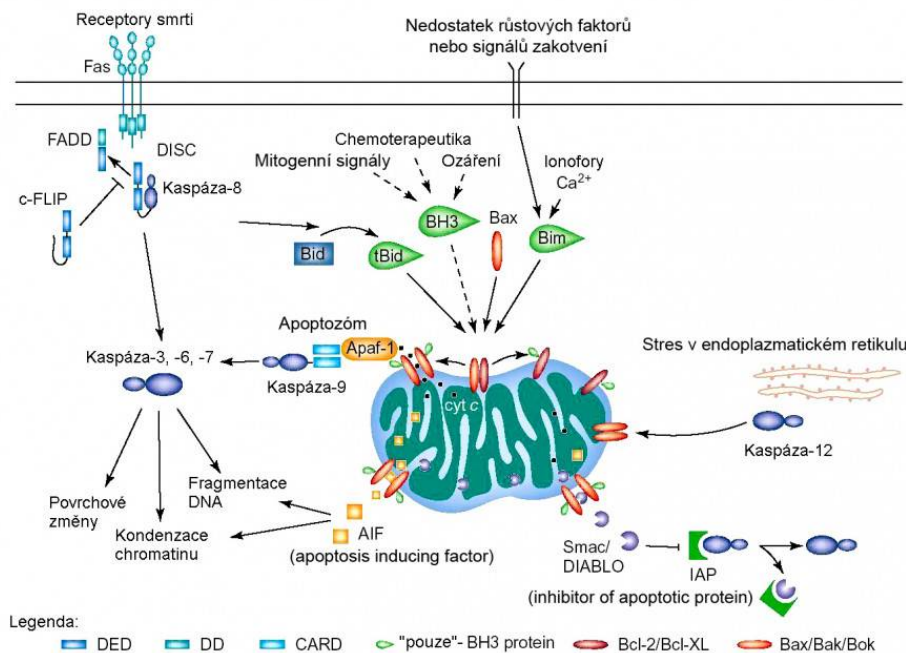
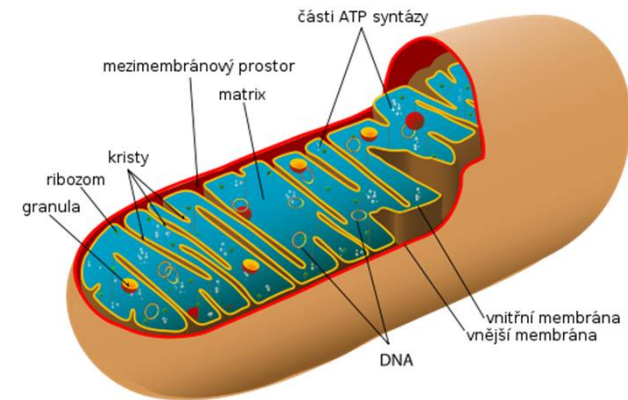
Resazurinový test (Alamar blue)

- Redukční barvivo pro měření cytotoxicity a životaschopnosti buněk
- Resazurin je převeden mitochondriálními reduktázami na fluorescenční barvivo resorufin
- Zdravé buňky redukují resazurin účinněji než mrtvé nebo umírající buňky
- Spektrofotometr, spektrofluorimetr
- Resazurin na rozdíl od MTT nebo XTT není toxický



Mitochondrie

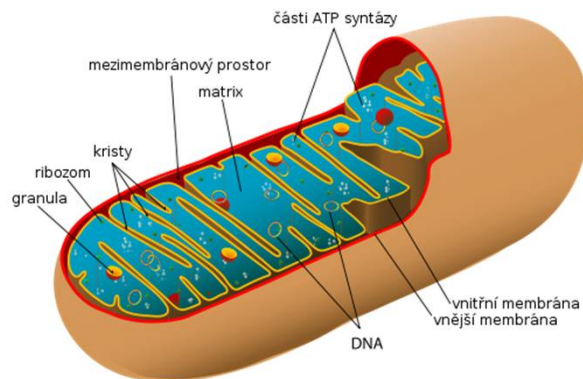
- Oxidativní fosforylace spojená s produkcí ATP
- Indukce buněčné smrti – vnitřní apoptická dráha (aktivovaná hlavně noreceptorovými stimuly)



INICIACE

1. Uvolněním proapoptotických proteinů iniciujících kaspázovou aktivitu;
2. Poškozením elektronového transportu, oxidativní fosforylace a produkce ATP, která může vést k energetické katastrofě;
3. Změnou redoxního potenciálu s následkem zvýšení buněčného oxidativního stresu

Přehled apoptotická signalizace (Upraveno podle Joza a kol., TRENDS in Genetics, 2002)

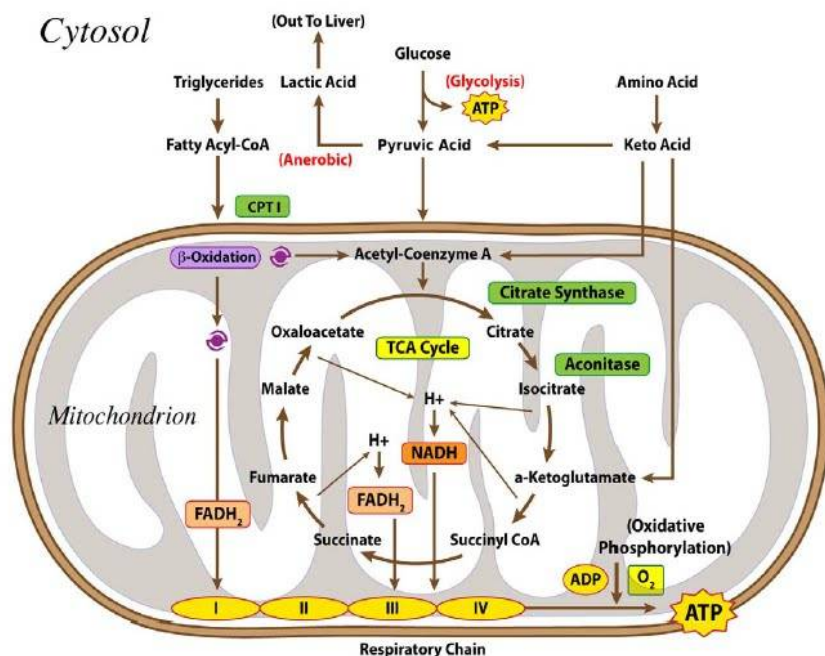


Mitochondrie – syntéza ATP



- elektrochemický gradient
- funkční protonová pumpa

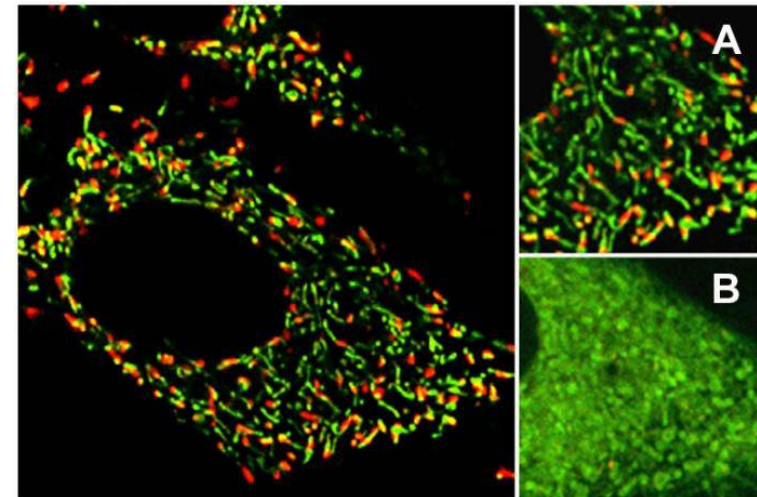
- Sleduje se koncentrace ATP a ADP a stanovuje se energetický náboj = ATP/ADP
- Pokles syntézy (zastoupení) ATP je známkou toxického poškození buňky
- Využití techniky vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC
- Detekce ATP a ADP spektrofotometricky



<http://www.scielo.br/img/revistas/bjce/v20n2/16003f1.gif>

Mitochondrie – membránový potenciál

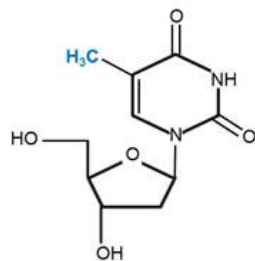
- Funkční mitochondrie vykazuje membránový potenciál $\Delta\psi$ (150mV)
 - **Využívá se řada lipofilních barviv (kationtů), která jsou akumulována v mitochondriích**
 - Jejich fluorescence je přímo úměrná potenciálu $\Delta\psi$
 - Principem je, že vnitřní strana membrány má negativní potenciál a ten interferuje s barvičkou tak, že pouze funkční mitochondrie vykazuje fluorescenci
-
- Průtoková cytometrie
 - Safranin, tetrafenylfosfonium (TPP), rhodamin 123
 - Kvantifikace - deriváty rhodaminu 123 - TMRM (tetramethylrhodaminemethylester) a TMRE (tetramethylrhodamineethylester)
 - DiOC6 – nejčastěji používaná sonda, vysoká toxicita zasahující respirační řetězec
 - JC-1 považována za nejvýkonnější sondu - v závislosti na membránovém potenciálu je sonda schopna vytvářet J-agregáty (čím větší polarizace membrány, tím větší akumulace sondy). Při depolarizaci mitochondriální membrány dochází k následnému uvolňování sondy do cytosolu, které se projeví poklesem intenzity fluorescence



The image shows the mitochondria stained with JC-1 in a normal cell (left panel) and the mitochondrial potential collapse induced by hydrogen peroxide in NIH-3T3 cells (A: Basal state; B: After Hydrogen Peroxide).

JÁDRO –BromDeoxyUridin (BrdU) proliferation assay

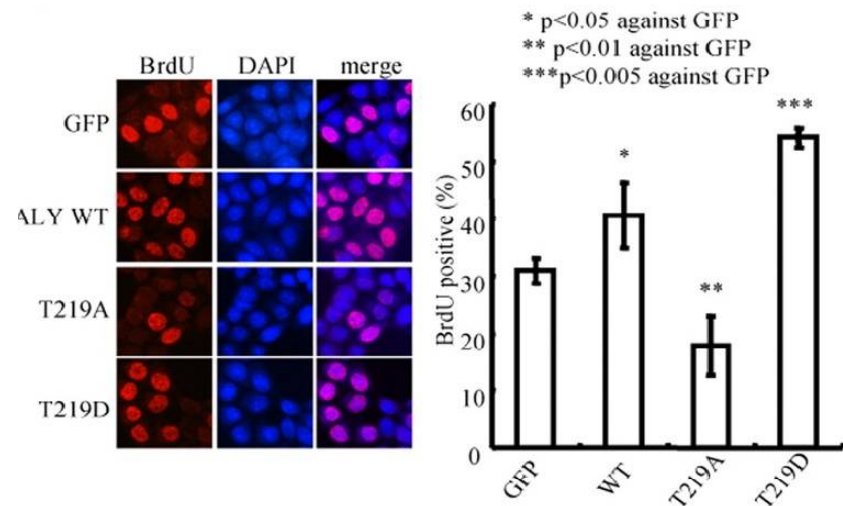
- BrdU – syntetický nukleotid, analog thymidinu
- Dochází k inkorporaci BrdU do nově syntetizované DNA; tj. S fáze buněčného cyklu
- Monitorovací indikátor proliferujících buněk
- Toxikologická implikace – některá xenobiotika inhibují buněčnou proliferaci
- Inhibice proliferace: buněčná smrt = toxicita může být pozitivní – léky, cytostatika
- Specifické protilátky proti BrdU – vizualizace proliferujících buněk
- U suspenzních buněk nebo po detachmentu lze aplikovat sorter (FACS)
- Pozor!! Inkorporace do DNA = mutační potenciál BrdU!!



Thymidine



5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)



Děkuji za pozornost!