

Praktický kurz

Monitorování toxicity vybraných cytostatik pomocí MTT testu a real-time monitoringu xCELLigence.

Počítání buněk, příprava speciální xCELL destičky, napipetování buněk

Vyučující: Mgr. Monika Holubová, Mgr. Michaela Fojtů

Real-time monitoring pomocí systému xCELLigence RTCA DP je metoda, která umožňuje nepřetržité sledování buněčné adheze a proliferace, životaschopnosti a cytotoxicity testovaných látek. Informace o růstu buněk, změnách a buněčné smrti jsou získávány během celého experimentu pomocí zlatých elektrod na dně jamek E-plate destičky. Do každé jamky byla na začátku experimentu napipetována buněčná suspenze, přičemž na každou jamku bylo použito 10 000 buněk. Takto připravená destička byla vložena do stanice, která je umístěná v CO₂ termoboxu. V růstové fázi buněk byla poté přidána testovaná látka v koncentrační řadě a destička byla opět vložena do stanice. Systém zaznamenává data v námi zvolených intervalech.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

Popis systému xCELLigence RTCA DP:

Systém xCELLigence RTCA DP se skládá ze 4 částí a to z analyzátoru (měří impedanci snímače elektrod), stanice (přenos signálu z destičky do analyzátoru), řídicí jednotky (počítač s přednastaveným softwarem) a destičky (96 nebo 16 jamek)

Stanice s destičkou je umístěna v inkubátoru pro kultivaci buněk, řídicí jednotka a analyzátor jsou umístěny mimo inkubátor.



Obrázek 1: RTCA DP přístroj

Materiál:

- buněčná linie o 60–80% konfluenci, cca. 2–10 tis. buněk na jamku (Pozn. záleží na typu buněk, pro každou buněčnou linii by měl být proveden titrační experiment)
- kultivační médium se sérem nahřáté na 37 °C
- běžně používanou látku na sklizení buněk, např. 1× trypsin v EDTA
- látku, kterou chceme buňky treatovat
- vodu na tkáňové kultury
- 16 jamková destička E-Plate 16 (Obr. 2)
- držák na 16 jamkovou destičku
- RTCA DP přístroj (Obr. 1)
- běžně používaný plast a laboratorní vybavení

Postup:

Příprava buněk

Příprava buněk pro real-time monitoring pomocí systému xCELLigence RTCA DP spočívá v trypsinizaci buněk, jejich spočítání a určení viability buněk. Buňky se mohou počítat různými metodami. Při využití nejstarší metody se buňky počítají v Bürkerově komůrce po rozsuspodování buněk v PBS a přidáním trypanové modři v poměru 1 : 1. Pod mikroskopem se buňky spočítají a dle níže uvedeného vzorce se vypočítá množství a viabilita buněk.

Počet živých buněk v 1 ml = počet živých buněk ve čtverci × ředění × 10000

$$Viabilita [\%] = \frac{\text{počet živých buněk ve čtverci}}{\text{celkový počet všech buněk ve čtverci}} \times 100$$

Další metodou využívanou k počítání buněk je využití přístroje na počítání buněk. V naší laboratoři využíváme Casy Model TT Systém (Roche). Při využití tohoto přístroje se do paměti nejdříve nakalibrují jednotlivé linie. Proměří se živé buňky, následně buňky mrtvé a nakonec směs živých a mrtvých buněk. Do systému se uloží velikost buněk u jednotlivých měření a při dalších měřeních již využívá uložených parametrů z kalibrace.

Po spočítání buňky naředíme na potřebnou koncentraci cca. 2–10 tis. buněk (dle použité buněčné linie) na jednu jamku, tedy ve 100 µl kultivačního média.



Obrázek 2: E-Plate 16

Příprava destičky

Držák na destičky očistit etanolem a oříť. Umístit destičku do držáku na destičky zlatými elektrodami dolů a odklopit víčko. Do každé jamky pipetovat 100 µl příslušného kultivačního média se sérem tak, abychom se nedotýkali elektrod umístěných na dně jamek ani okrajů jamky, zbavit se případných bublin pomocí špičky. Přiklopit víko destičky a nechat destičku temperovat při pokojové teplotě v boxu cca. 30 min.

Měření backgroundu

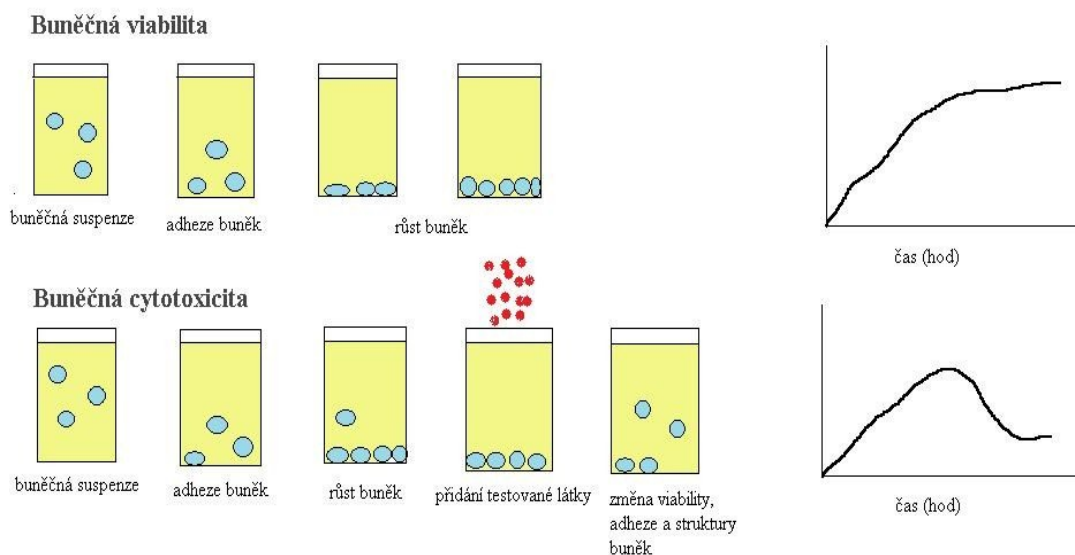
Před skončením přípravy buněk vložit destičku do přístroje RTCA DP umístěného v inkubátoru. V záložce „Message“ zkontrolovat správné nasednutí destičky na elektrody, v záložce „Shedule“ mít označený 1. krok měření a spustit měření, v záložce „Message“ zkontrolovat spuštění měření a jeho dokončení.



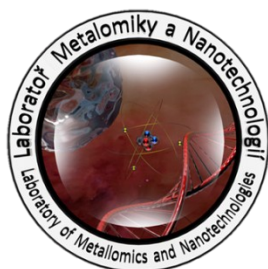
Obrázek 3: Vkládání destičky do přístroje

Dokončení přípravy destičky a zahájení měření

Vytáhnou destičku z přístroje a umístit ji do držáku. Odklopit víko destičky a pipetovat podle rozpisu 100 µl naředěných buněk do jamky. Do mezer kolem jamek rovnoměrně napipetovat destilovanou vodu. Zakrýt destičku víkem a nechat temperovat při pokojové teplotě v boxu cca. 30 min. Vložit destičku zpět do přístroje a spustit vlastní měření.



Obrázek 4: Schema real-time monitoringu pomocí systému xCELLigence RTCA DP



Praktický kurz

Monitorování toxicity vybraných cytostatik pomocí MTT testu a real-time monitoringu xCELLigence.

Výběr vhodného modelového cytostatika, příprava koncentrační řady, přidání cytostatika k buňkám a sledování jeho efektu

Vyučující: RNDr. Jan Balvan, MUDr. Jaromír Gumulec, Bc. Petr Štěpka

Výběr vhodného modelového cytostatika a jeho koncentrační řady je prováděn na základě publikací. Koncentrační řada je nejprve optimalizována pomocí MTT testu pro všechny testované buněčné linie. Po výběru vhodných koncentrací se provádí samotné měření pomocí MTT testu a pomocí systému xCELLigence RTCA DP.

Optimalizace MTT testem je vhodná pro její menší finanční náročnost oproti systému xCELLigence RTCA DP. Bohužel se však jedná o end-point analýzu a proto je užití MTT testu vhodné doplnit o další metody.

Real-time monitoring pomocí systému xCELLigence RTCA DP je metoda, která umožňuje nepřetržité sledování buněčné adheze a proliferace, životaschopnosti a cytotoxicity cytostatik. Informace o růstu buněk, změnách a buněčné smrti jsou získávány během celého experimentu pomocí zlatých elektrod na dně jamek E-plate destičky.

Koncentrační řada cytostatik se vždy před zahájením testu připravuje znovu, aby se snížilo riziko degradace cytostatika.

Přidání cytostatika a zahájení měření po treatmentu při MTT testu

Po dvou až třech dnech od nasazení buněk do mikrotitrační destičky se odsaje obsah jamek 2–11. Jamky se propláchnou PBS a obsah se opět odsaje. Poté se do jamek přidá nové čisté médium a dle zvolené koncentrační řady i dané cytostatikum, s tím že sloupce 1 a 12 obsahují jen čisté médium, sloupce 2 a 11 suspenzi buněk bez testované látky a sloupce 3–10 obsahují testovanou látku. Takto připravená destička se vloží na dva dny do CO₂ termoboxu.



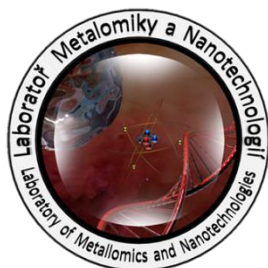
Obrázek 1: Mikrotitrační destička v průběhu MTT testu

Přidání cytostatika a měření po treatmentu pomocí systému xCELLigence RTCA DP

Po dostatečně dlouhé době, během které buňky adherují na dno xCELLigence destičky a rozmnoží se (cca. 24–48 hod) se pozastaví měření. Destička se vyjme z přístroje a umístí do držáku. Odklopí se víko destičky a pipetuje se do jamek podle rozpisu dané koncentrace cytostatika, kterým chceme buňky treatovat. Destička se zakryje víkem a vloží zpět do přístroje v CO₂ termoboxu. Je důležité v záložce „Message“ zkontrolovat správné nasednutí destičky na elektrody, v záložce „Schedule“ mít označený 2. krok měření a spustit měření, v záložce „Message“ zkontrolovat spuštění měření. V záložce „Plot“ lze již pozorovat výsledky měření, tedy reakci buněk na cytostatikum, kterým jsou treatovány a to v reálném čase.



Obrázek 2: Speciální destička do systému xCELLigence označovaná jako E-Plate 16



Praktický kurz

Monitorování toxicity vybraných cytostatik pomocí MTT testu a real-time monitoringu xCELLigence.

Příprava a počítání buněk, jejich rozpíjetování do destičky pro MTT monitoring.

Vyučující: Ing. Markéta Sztalmachová, Ing. Hana Polanská

MTT test je založen na viabilitě buněk v daném prostředí. Princip MTT testu je založen na redukci MTT (žluté ve vodě vodorozpustné tetrazolium barvivo), které se mění s živými buňkami na fialový formazan. Fialové krystaly formazanu jsou následně rozpuštěny v DMSO a pomocí glycinového pufru se udržuje optimální pH pro měření absorpance při 570 nm.

Příprava buněk pro MTT test spočívá v trypsinizaci buněk, jejich spočítání a určení viability buněk. Buňky se mohou počítat různými metodami. Při využití nejstarší metody se buňky počítají v Bürkerově komůrce po rozsuspědování buněk v PBS a přidáním trypanové modře v poměru 1 : 1. Pod mikroskopem se buňky spočítají a dle níže uvedeného vzorce se vypočítá množství a viabilita buněk.



evropský
sociální
fond v ČR



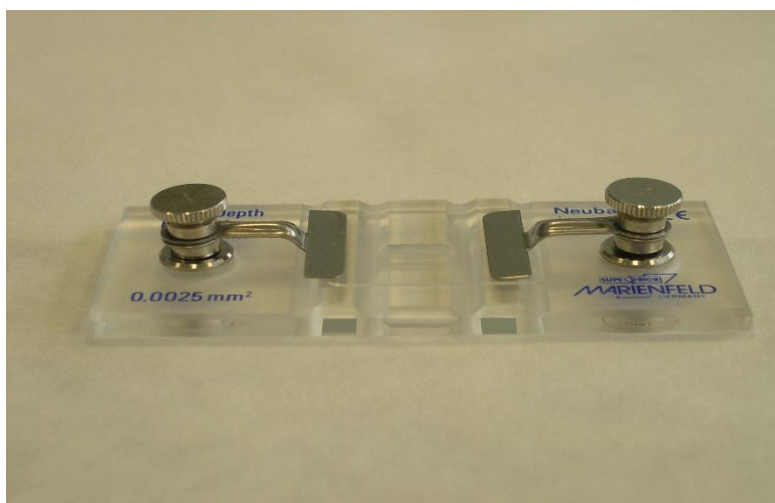
EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Počet živých buněk v 1 ml = počet živých buněk ve čtverci × ředění × 10 000

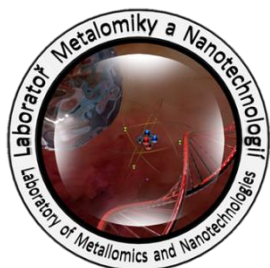
$$\text{Viabilita \%} = \frac{\text{počet živých buněk ve čtverci}}{\text{celkový počet všech buněk ve čtverci}} \times 100$$

Další metodou využívanou k počítání buněk je využití přístroje na počítání buněk. V naší laboratoři využíváme Casy Model TT Systém (Roche). Při využití tohoto přístroje se do paměti nejdříve nakalibrují jednotlivé linie. Proměří se živé buňky, následně buňky mrtvé a nakonec směs živých a mrtvých buněk. Do systému se uloží velikost buněk u jednotlivých měření a při dalších měřeních již využívá uložených parametrů z kalibrace.



Postup nasazení buněk do destičky pro MTT test:

1. Buňky narostlé na konfluenci 70 % se propláchnou EDTA a následně trypsinem
2. Buňky se inkubují 3 minuty v CO₂ inkubátoru
3. Buňky se spláchnou ze dna kultivační nádoby do média a centrifugují se při 800 g, 4 °C, 7 minut
4. Odsaje se supernatant a pelet buněk se rozsuspenduje v médiu
5. Buňky se spočítají a určí se viabilita buněk
6. Do sloupců 2-11 v mikrotitrační destičce se pipetuje 200 µl buněčné suspenze (10 000 buněk/jamka)
7. Do sloupců 1 a 12 se pipetuje 200 µl čistého média
8. Destička se vloží do CO₂ inkubátoru až do přidání testované látky



Praktický kurz

Monitorování toxicity vybraných cytostatik pomocí MTT testu a real-time monitoringu xCELLigence.

Zpracování a vyhodnocení získaných experimentálních dat a porovnání klasické endpoint analýzy – MTT test s moderním real-time monitoringem.

Vyučující: Mgr. Holubová, Mgr. Hudcová, RNDr. Balvan, Mgr. Raudenská, RNDr. Masařík, Ph.D.

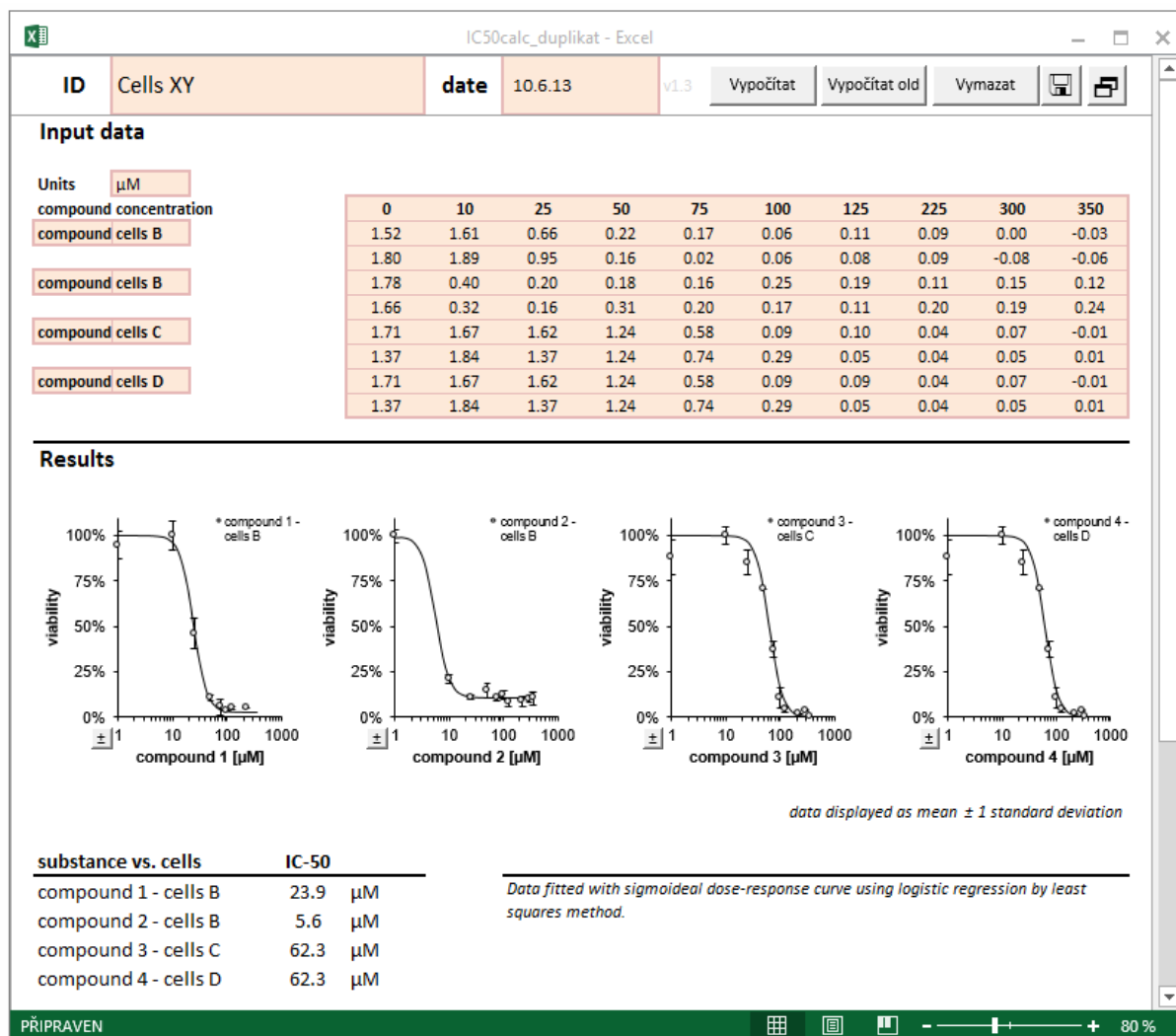
1) Vyhodnocení MTT testu:

Z jamek destičky se odsaje médium a namísto něj se do jamek napipetuje 200 μ l čerstvého média a 50 μ l MTT. Destička se zabalí do alobalu, jelikož MTT látka se na světle rozkládá, a vloží se do CO₂ termoboxu na 4 hodiny. Poté se obsah jamek opět odsaje a do jamek se přidá 200 μ l DMSO a 25 μ l glycinového pufru. Takto zhotovená destička se proměří při absorpanci 570 nm (Versa Max reader, molekulární zařízení).

Pro vyhodnocení testu využíváme software pro analýzu viability buněk po působení toxických agens a pro stanovení 50% inhibiční koncentrace. Datovým vstupem do kalkulačtoru je koncentrační závislost měřeného parametru odrážejícího viabilitu, nebo jiného, u něhož je očekávána sigmoideální závislost na koncentraci. Parametrem, odrážejícím viabilitu může být počet buněk, výsledek MTT testu či jiného testu, výsledek absorbance (např. stanovené přístrojem Multiskan EX), či řada jiných. Tato vstupní data jsou proložena metodou nejmenších čtverců do sigmoideální na dávce závislé křivky. Ta slouží jako samotná grafická reprezentace

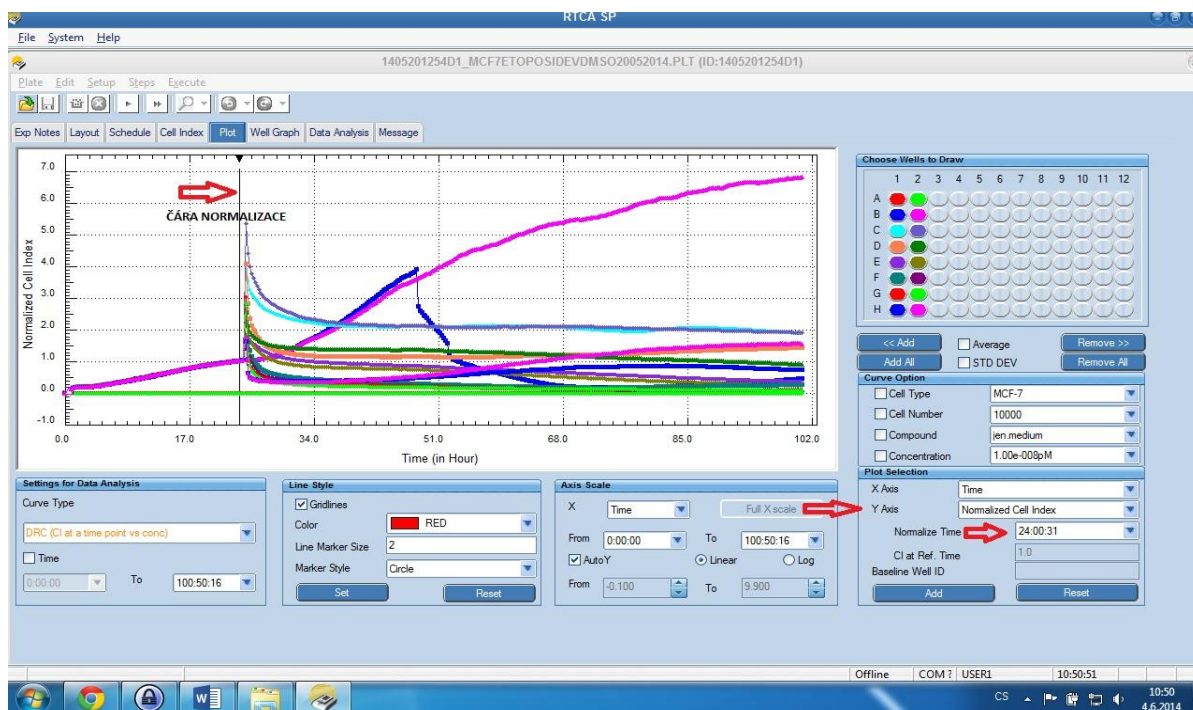


viability a je optimalizována pro použití v publikacích. Z této funkce je dále odečtena hodnota IC50 a výstup také umožňuje stanovení korelačního koeficientu.



2) Vyhodnocení xCELLigence:

Výsledek real-time monitoringu pomocí systému xCELLigence je vyhodnocován v programu RTCA software. V programu si lze zvolit libovolná data, která chceme analyzovat. Pro vyhodnocení se normalizuje čas na dobu přidání testované látky. Pro výpočet hodnot IC50 lze zvolit dva způsoby hodnocení. V prvním případě nám software vypočítá hodnotu IC50 v době, kterou si zvolíme (obvykle 12, 24, 24 hodin). V druhém případě nám software vyhodnotí hodnotu IC50 na konci experimentu. Druhá možnost se blíží vyhodnocení při využití MTT testu.



V porovnání těchto dvou metod pro sledování cytotoxicity lze říci, že systém xCELLigence poskytuje oproti MTT testu možnost nepřetržitého sledování reakcí buněk na testovanou látku po celou dobu experimentu. Lze stanovit hodnoty IC50 v různých časových úsecích, kdežto MTT test je endpoint analýza a tyto možnosti nenabízí. Ovšem je třeba říci, že xCELLigence je metoda finančně náročnější a nelze pomocí ní testovat cytotoxicitu na suspenzních buňkách, což MTT test umožňuje. Dále je třeba zdůraznit, že xCELLigence systém není schopen rozeznat změny morfologie buněk, které mohou ovlivňovat sledovanou impedanci. Je tedy namísto tyto dvě metody kombinovat, případně použít i dalších metod, jako například některé druhy mikroskopie, díky kterým lze sledovat změny morfologie buněk.