

7. SOUHRN

Tato práce se zabývá optimalizací podmínek buněčné kultury RAW 264,7 a optimalizací LPS koncentrací. Snažili jsme se vytvořit protizánětlivý model.

Tato práce je rozdělena do několika hlavních kapitol: poděkování, úvod, teoretická část, materiály a metody, výsledky, souhrn, zkratky, odkazy a obsah.

V teoretické části jsou popsány buněčné kultury; jak s nimi pracovat, jak je získat, společné problémy jako je kontaminace, environmentální požadavky – kultivační médium, a použití buněčných linií. Další část je zaměřena na buněčné linie makrofágů, jejich role v imunitním systému a v imunitní odpovědi. V teoretické části nalezneme také popis Griessovy reakce, která slouží k determinaci NO produkce, a popis růstového cyklu buněk.

V části materiály a metody jsou popsány veškeré použité materiály, reagenty, přístroje a metody. Metodologie je zaměřena na podmínky inkubace, na kultivaci a počítání buněk; na růstový cyklus (počítání buněk dvakrát denně po dobu šesti dnů) a na determinaci NO produkce v LPS stimulovaných RAW 264,7 buňkách – Griessova reakce. Griessovy reagenty (NED a sulfonamid v kyselině fosforečné) reagují s NO_2^- a vytvářejí chromofory, které se detekují spektrofotometrem.

Buňky byly udržovány v inkubátoru při 37°C a při saturaci 95% kyslíku a 5% oxidu uhličitého. Každé dva dny nebo, pokud bylo nezbytné, byly rekultivovány. Buňky byly vyčištěny Hankovým vyváženým solným roztokem. Jako buněčné médium bylo vybráno Dulbecco modifikující Eagle médium se sérem, glutamátem a antibiotiky, která chránila buněčnou kulturu před kontaminací. Veškerá práce s buňkami byla realizována v biologicky bezpečném boxu. K udržení aseptických podmínek se používal 70% etanol, sterilní rukavice a laboratorní plášť.

Výsledky se skládají ze dvou částí: výsledky růstového cyklu buněk a výsledky determinace NO produkce v LPS stimulovaných RAW 264,7 buňkách. Růstový cyklus je charakterizován růstovou křivkou, která má sigmoidální tvar. Buňky byly kultivovány a dvakrát denně počítány v hemacytometru, ráno a odpoledne po šest dnů. Z růstové křivky byly detekovány tyto fáze: lag, doba zdvojení a saturační fáze. Lag fáze byla definována od počátku kultivace do 54 h ($8,8 \times 10^5$ buněk). Počet buněk stoupal od 54 h do 94 h ($4,1 \times 10^6$). Tato perioda byla vyjádřena jako log fáze. Ve 101 h počet buněk klesl na $3,81 \times 10^5$, the plató fáze.

Protizánětlivá aktivita byla určena měřením NO produkce (Griessova reakce s využitím spektrofotometru). Byly provedeny tři experimenty. V prvním experimentu byly buňky stimulovány 0,1; 1 a 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ LPS. První experiment byl opakován třikrát (1., 2., 3) ve stejných podmínkách (počáteční buněčná koncentrace: 5×10^5 cells/mL, 0,1; 1; 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ LPS). Ve druhém a třetím experimentu RAW 264,7 buňky o počáteční koncentraci 4×10^5 cells/mL byly stimulovány LPS (0,125; 0,25; 0,5; 2; 8 $\mu\text{M}/\text{mL}$).

V prvním experimentu buňky léčené 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS uvolnily 0,179 μM NO, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 0,755 μM NO a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 0,759 μM NO.

Ve druhém experimentu buňky vystavené působení 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS neprodukovaly NO. Teprve až působením 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS na buňky se uvolnilo 0,051 μM NO, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS stimulovalo buňky k 0,14 μM NO; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS k 0,2 μM NO; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS k 0,253 μM NO a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS k 0,364 μM NO.

Ve třetím experimentu buňky vystavené působení 0,125 a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS neprodukovaly NO. Až 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS stimulovalo buňky k produkci NO, a to k 0,066 μM , 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS k 0,090 μM NO; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS k 0,115 μM NO a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS vyvolalo uvolnění 0,246 μM NO.