

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

Funkční vlastnosti krevních destiček u onkologických pacientů

Bc. Zuzana Volejníková

Diplomová práce
2012

University of Pardubice
Faculty of chemical technology
Department of biological and biochemical sciences

Functional characteristics of platelets of cancer patients

Bc. Zuzana Volejníková

Thesis
2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Volejníková**
Osobní číslo: **C10945**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Funkční vlastnosti krevních destiček u onkologických pacientů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1) Teoretická část:

- a) Zpracování literární rešerše týkající se úlohy krevních destiček při procesu progresu nádoru, angiogeneze a vytváření vzdálených metastáz.
- b) Popis metody migrační assay použité pro studium funkčních vlastností krevních destiček respektive jejich obsahu ve vztahu k migraci endoteliálních buněk a přežívání nádorových buněk.

2) Praktická část:

- a) Optimalizace podmínek kultivace buněk HUVEC.
- b) Zavedení metody pro studium vlivu obsahu krevních destiček na migraci endoteliálních buněk v systému modelu buněk HUVEC metodou xCELLigence.
- c) Studium vlivu trombocytů zdravých dárců a onkologických pacientů na migraci endotelií případně přežívání nádorových buněk.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Lenka Dubská, Ph.D.

Oddělení lab. medicíny, Masarykův onkolog. ústav,
Brno

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Kateřina Pilátová

Oddělení lab. medicíny, Masarykův onkolog. ústav,
Brno

Datum zadání diplomové práce:

3. října 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

4. května 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 4. 2012

.....
Bc. Zuzana Volejníková

Poděkování:

Děkuji vedoucí své diplomové práce RNDr. Lence Dubské, Ph.D. za odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Pilátové a Evě Janovské za pomoc při realizaci experimentální části, konzultace a cenné rady a také celému Oddělení laboratorní medicíny MOÚ za příjemné pracovní prostředí. Poděkování patří také mým nejbližším, za podporu během mého studia.

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky OP VaVpI - RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá funkčními vlastnostmi krevních destiček, především v kontextu s nádorovou angiogenezí a tvorbou metastáz. Velká část je věnována popisu funkcí jednotlivých proangiogenních a antiangiogenních faktorů skladovaných v granulích destiček. Dále je v práci popsán princip metody xCELLigence, která byla v experimentální části používána pro měření migrace lidských endotelových buněk pupečnickové žíly (HUVEC) za chemoatraktanty uvolněnými z granul krevních destiček. Hlavním cílem práce bylo porovnání obsahu destiček onkologických pacientů a zdravých osob právě prostřednictvím migrace endotelových buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA

Krevní destičky, nádorová angiogeneze, proangiogenní faktory, antiangiogenní faktory, buněčná migrace, xCELLigence

SUMMARY

The thesis emphasises on functional characteristics of platelets, mainly in context of tumour angiogenesis and metastasis. In theoretic part, functions of individual proangiogenic and antiangiogenic factors stored in platelet granules, are described. Further, the principle of the xCELLigence method is also specified. This approach was applied for the experimental part of the work to quantify the migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) toward platelet granules chemoattractants. The final goal of the study was to employ the approach to analyze the specific features of the content of platelets in cancer.

KEYWORDS

Platelets, tumour angiogenesis, proangiogenic factors, antiangiogenic factors, cell migration, xCELLigence

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	10
ÚVOD.....	14
TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1. TROMBOCYTY A JEJICH ÚLOHA V PROCESU HEMOSTÁZY	15
2. ROLE TROMBOCYTŮ V NÁDORU.....	17
2.1 Trombocyty a nádorová angiogeneze	17
2.2 Trombocyty a metastáze.....	18
3. SEKREČNÍ GRANULA TROMBOCYTŮ	20
3.1 α -granula	20
3.2 Denzní granula	21
3.3 Lyzozomy.....	21
4. PROANGIOGENNÍ FAKTORY TROMBOCYTŮ.....	22
4.1 Destičkové růstové faktory PDGF	23
4.2 Vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF	23
4.3 Bazický růstový faktor fibroblastů bFGF	25
4.4 Inzulínu podobný růstový faktor IGF.....	25
5. ANTIANGIOGENNÍ FAKTORY TROMBOCYTŮ	27
5.1 Transformující růstový faktor TGF β -1	27
5.2 Destičkový faktor PF-4	28
6. xCELLIGENCE – METODA ANALÝZY BUNĚK V REÁLNÉM ČASE	29
6.1 Přístrojové vybavení xCELLigence RTCA DP	29
6.2 Princip metody xCELLigence	32
6.3 Buněčný index CI.....	33
6.4 Aplikace metody xCELLigence	34
CÍL PRÁCE.....	37
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
7. MATERIÁL.....	38
7.1 Chemikálie	38
7.2 Přístroje	38

7.3	<i>Kultivační média</i>	39
7.4	<i>Kultivační nádoby</i>	39
7.5	<i>Biologický materiál</i>	39
8.	METODY	41
8.1	<i>Kultivace buněk HUVEC</i>	41
8.2	<i>Zpracování vzorků krve</i>	43
8.3	<i>Měření buněčné migrace metodou xCELLigence</i>	45
9.	VÝSLEDKY	47
9.1	<i>Kultivace buněk HUVEC</i>	47
9.2	<i>Měření buněčné migrace metodou xCELLigence</i>	52
	DISKUZE	66
	ZÁVĚR	69
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	70

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Význam anglicky Význam česky (je-li zaveden)
ADP	Adenosine D iphosphate Adenozindifosfát
ATP	Adenosine T riphosphate Adenozintrifosfát
bFGF	B asic F ibroblast G rowth F actor Bazický fibroblastový růstový faktor
CI	C ell I ndex Buněčný index
DMSO	D imethyl S ulfoxide Dimethylsulfoxid
ECM	E xtracellular M atrix Extracelulární matrix
EDTA	E thylene d iamine t etra a cetic A cid Kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	E pidermal G rowth F actor Epidermální růstový faktor
EBM	E ndothelial C ell B asal M edium Bazální médium pro endotelové buňky

FBS	Fetal Bovine Serum Fetální bovinní sérum
FGF	Fibroblast Growth Factor Růstový faktor fibroblastů
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor Receptor pro růstový faktor fibroblastů
FN	Fibronectin Fibronektin
GA	Gentamicin Sulfate and Amphotericin B Gentamicin-sulfát a amfotericin B
HGF	Hepatocyte Growth Factor Růstový faktor hepatocytů
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells Lidské endotelové buňky pupečnickové žíly
hEGF	Human Epidermal Growth Factor Lidský epidermální růstový faktor
hFGF	Human Fibroblast Growth Factor Lidský růstový faktor fibroblastů
IGF	Insulin-like Growth Factor Růstový faktor podobný inzulínu
IGF-BP	Insulin-like Growth Factor-Binding Protein Vazebný protein pro růstový faktor podobný inzulínu

IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor Receptor pro růstový faktor podobný inzulinu
IL	Interleukin Interleukin
IU	International Unit Mezinárodní jednotka
LC	Lower Chamber Spodní komůrka
LD	Lethal Dose Smrtelná dávka
MMP	Matrix Metalloproteinase Matrixová metaloproteáza
PAR	Protease-Activated Receptor
PBS	Phosphate Buffered Saline Fosfátový pufr s chloridem sodným
PDECGF	Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor Destičkový růstový faktor pro endoteliální buňky
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor Destičkový růstový faktor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Receptor pro destičkový růstový faktor
PF-4	Platelet Factor 4 Destičkový faktor 4

PPP	Platelet Poor Plasma Plazma chudá na destičky
PRP	Platelet Rich Plasma Plazma bohatá na destičky
RTCA	Real-Time Cell Analyzer Analyzátor pro analýzu buněk v reálném čase
SFM	Serum-Free Media Médium bez séra
TGF	Transforming Growth Factor Transformující růstový faktor
TNF	Tumour Necrosis Factor Tumor nekrotický faktor
TNS	Trypsin Neutralization Solution Neutralizační roztok pro trypsin
UC	Upper Chamber Vrchní komůrka
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor Vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor
vWf	von Willebrand Factor von Willebrandův faktor

ÚVOD

Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtí dospělých v západním světě (hned po chorobách srdce a cév) a i přes obrovské úsilí, čas a prostředky věnované do výzkumu rakoviny a vývoje léků se výskyt nových případů rakoviny a úmrtí v důsledku tohoto onemocnění neustále zvyšuje. Konkrétně pro rok 2008 byl v Evropě z dostupných zdrojů odhadnut počet případů rakoviny na 3 233 500 a počet úmrtí v důsledku rakoviny na 1 718 800 (Ferlay *et al.*, 2010).

Výzkum rakoviny je zaměřen především na nalezení biomarkerů včasné detekce rakoviny, vhodné monitorování terapeutické odpovědi a nalezení specifických cílů pro léčbu rakoviny. Skutečnost, že trombocyty hrají nezastupitelnou úlohu v patologickém procesu nádorové angiogeneze, neboli novotvorby cév, a tím v progresi nádoru a metastazování, naznačuje vhodnost zaměření výzkumů v oblasti onkologie právě na trombocyty.

Výše zmíněné poznatky se staly podkladem k této práci, která se zabývá funkčními vlastnostmi trombocytů u onkologických pacientů zprostředkovaných faktory obsaženými v granulích trombocytů. Ty působí jako inhibitory nebo stimulatory angiogeneze v závislosti na jejich rovnováze. Předpokládá se, že u onkologických pacientů je tato rovnováha přesunuta ve prospěch proangiogenních faktorů a důsledkem je podpora angiogeneze. Cílem této práce bylo zjistit rozdíl mezi vlivem obsahu trombocytů zdravých dárců a onkologických pacientů na migraci endotelových buněk, které tvoří výstelku lymfatických a krevních cév a jsou nutné pro vytvoření nových cév.

TEORETICKÁ ČÁST

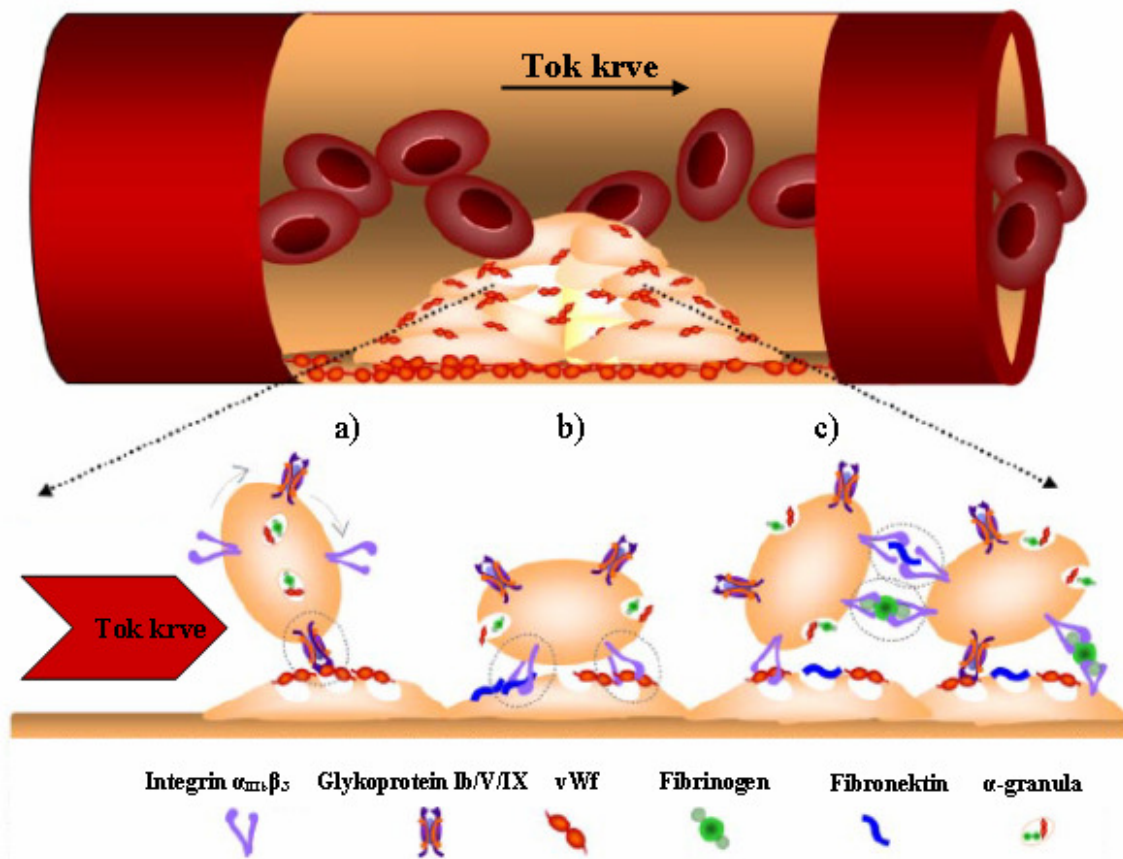
1. TROMBOCYTY A JEJICH ÚLOHA V PROCESU HEMOSTÁZY

Trombocyty neboli krevní destičky jsou bezjaderné krevní elementy vznikající procesem nazývaným trombopoéza probíhající v kostní dřeni fragmentací cytoplazmy megakaryocytů. Trombopoéza je regulována především trombopoetinem, hormonem vylučovaným játry, který stimuluje tvorbu dalších krevních destiček. Hlavní nezastupitelná úloha trombocytů je v procesu hemostázy, zástavy krvácení při poranění cévy. Poškozením cévy je porušena celistvost vrstvy endotelových buněk, které vystylají vnitřní povrch cévy a vytváří rozhraní mezi cévní stěnou a krví. Při porušení této bariéry se trombocyty dostávají do kontaktu se subendotelovou vrstvou - extracelulární matrix (ECM), čímž je zahájena činnost krevních destiček a aktivace koagulační kaskády.

Nekrytá ECM obsahuje řadu makromolekul, které jsou vhodné pro adhezi a aktivaci trombocytů, např. různé typy kolagenu, von Willebrandův faktor (vWf), fibronektin, laminin, thrombospondin nebo vitronektin (Ruggeri *et Mendolicchio*, 2007). Nejdůležitějším pro adhezi trombocytů k ECM je kolagen, na jehož povrchu je imobilizovaný vWf, který zprostředkovává adhezi trombocytů na cévní stěnu v místě chybějícího endotelu. Dochází k reverzibilní interakci imobilizovaného vWf se specifickým membránovým receptorem na povrchu trombocytů, což má za následek zpomalení jejich toku v krevním řečišti a jejich válivý pohyb po ECM. Tímto rolováním se dostávají trombocyty do přímého kontaktu s kolagenem a pevně k němu adherují. Následkem těchto interakcí jsou trombocyty aktivovány a mění svůj tvar (Frenette *et al.*, 1995). Aktivované trombocyty mohou syntézou tromboxanu A₂ a uvolňováním adenosindifosfátu (ADP) ze svých granul spustit agregaci a aktivaci dalších trombocytů. Výsledkem současně probíhající koagulační kaskády je vznik trombu, který je složen z fibrinové sítě, do které jsou přichyceny agregované trombocyty. Vytvořený trombus zamezuje nadměrnou ztrátu krve z rány. Po zacelení rány touto zátkou je nutné ji odstranit rozložením fibrinu, fibrinolýzou, a obnovit tak krevní tok a celistvost cévy.

Celý tento proces je mnohastupňový děj, kterého se účastní mnoho receptorů a adhezních molekul (obr. 1) (Jackson, 2007).

Při poranění je významné jak zamezení přílišné ztráty krve, tak i hojení samotné rány. Nezastupitelnou úlohu zde hraje proces nazývaný angiogeneze. Její podstatou je remodelace nebo novotvorba sítě krevních kapilár v poškozené tkáni. Ty jsou zajištěny degranulací aktivovaných trombocytů, což vede k uvolnění řady angiogenních faktorů uskladněných v granulích trombocytů.



Obr. 1: Trombocyty v procesu hemostázy: a) adheze trombocytů k ECM prostřednictvím vWf, b) rolování a aktivace trombocytů, sekrece obsahu jejich granul, c) agregace trombocytů - děje zahrnující řadu receptorů a adhezních molekul (upraveno dle Jackson, 2007)

2. ROLE TROMBOCYTŮ V NÁDORU

2.1 Trombocyty a nádorová angiogeneze

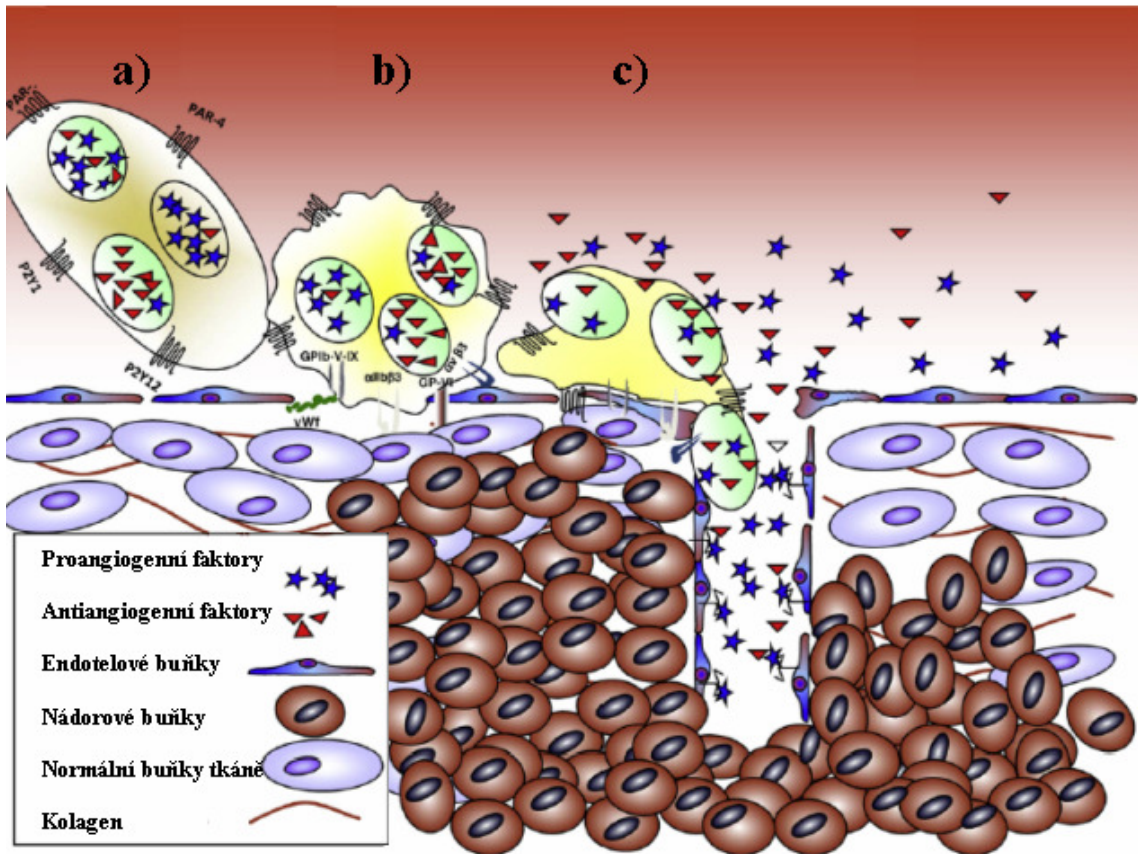
Angiogeneze, proces novotvorby cév, na kterém se z velké části podílí trombocyty, se uplatňuje jak ve fyziologických procesech (embryogeneze, hojení ran), tak v patologických stavech, např. v nádorové angiogenezi. Rovnováha mezi poměrem inhibitorů a stimulatorů angiogeneze, která je nezbytná pro udržení fyziologické angiogeneze, je popisována jako „angiogenní switch“. V normální tkáni je „angiogenní switch“ vypnutý, účinek proangiogenních faktorů je zastíněn přítomností antiangiogenních faktorů a ve vaskulatuře nedochází k podpoře angiogeneze. Pokud je „angiogenní switch“ zapnut, jako například v nádorové vaskulatuře, je rovnováha přesunuta ve prospěch proangiogenních faktorů, které zajišťují vznik nových cév (obr. 2) (Burger, 2010).

Angiogeneze má pro růst nádoru mimořádný význam, jelikož plynulý přísun kyslíku a živin a odstranění odpadních metabolických produktů je zabezpečováno právě novotvořenými cévami. U nádorových ložisek do velikosti 1-2 mm³ postačuje pro zásobení tkáně kyslíkem a živinami prostá difúze (Bhat *et al.*, 2007). U větších nádorů difúze již nepostačuje, nádorová tkáň se bez dostatečného obsahu kyslíku stává hypoxickou a sama vylučuje angiogenní faktory, které podpoří růst nových kapilár. Navíc při růstu nových cév do nádoru dochází ke spotřebě kyslíku v okolní tkáni nádorového ložiska. Tyto hypoxické oblasti také přispívají k další stimulaci angiogeneze (Nash *et al.*, 2001).

V již vzniklé nádorové vaskulatuře buňky nádoru vylučují také angiogenní faktory, což zvýší intersticiální tlak a permeabilitu cév. Výsledkem je redukovaný tok krve v nádoru, který přispívá k adhezi destiček, jejich agregaci a aktivaci a další angiogenezi (Pinedo *et al.*, 1998). Rychlost růstu nádoru je tedy omezena mírou jeho vaskularizace (Bhat *et al.*, 2007). Dalším aspektem, který přispívá k angiogenezi je fakt, že maligní tkáň je infiltrována leukocyty s prozánětlivým efektem, které produkují také angiogenní faktory a proteázy, jako jsou matrixové metaloproteázy (MMP), které rozkládají proteinové složky ECM (Cao *et al.*, 2008).

Ke konci 20. století byly na základě poznatku, že růst nádoru je ovlivněn angiogenezí, nalézány u onkologických pacientů abnormality v koagulačním systému, jako je tromboembolie, krvácivé poruchy, zvýšený počet krevních destiček

(trombocytémie) nebo zvýšená koncentrace rozpadových produktů fibrinogenu v krvi. Díky těmto závěrům se ukázalo, že trombocytémie může být nezávislým prognostickým indikátorem u pacientů s rakovinou (Pinedo *et al.*, 1998).



Obr. 2: Role trombocytů ve vznikající nádorové vaskulaturě: a) trombocyty obsahující proangiogenní a antiangiogenní faktory v α -granulech, b) adheze trombocytů k ECM, aktivace a změna tvaru trombocytů, c) sekrece proangiogenních a antiangiogenních faktorů z trombocytů podporující růst nádorové vaskulatury (upraveno dle Sabrkhany *et al.*, 2011)

2.2 Trombocyty a metastáze

Tvorba metastáz, druhotných ložisek nádorových buněk na vzdálených místech, je založena na schopnosti nádorových buněk přichytit se k cévnímu endotelu, porušit jeho celistvost a proniknout a migrovat přes endotelovou vrstvu do krevního oběhu. Na rozdíl od normální tkáňové vaskulatury nádorová vaskulatura je vysoce neuspořádaná a neorganizovaná. Následkem toho je tok krve snížen a cévní permeabilita je vysoká, což napomáhá také tvorbě metastáz (Burger, 2010). Nádorové buňky unášené krví na vzdálená místa v organismu adherují ke stěně kapilár a

extravazací pronikají do okolní tkáně, čímž je zajištěna tvorba metastáz (Rahim *et Üren*, 2011).

Trombocyty mohou přispět k metastatickému šíření také svou akumulací na embolizujících nádorových buňkách. V takto vzniklých komplexech jsou nádorové buňky částečně chráněny před imunitním dohledem a díky trombocytům jim je usnadněna adheze a extravazace přes endotel. Ačkoliv vytváření agregátů nádorových buněk s destičkami je dobře známo, podrobný mechanismus zůstává stále neobjasněn. Trombocyty rovnováhou mezi proangiogenními a antiangiogenními faktory vylučovanými v cílových orgánech metastáz určují formování metastatických ložisek (Nash *et al.*, 2002).

3. SEKREČNÍ GRANULA TROMBOCYTŮ

Trombocyty hrají roli jak při zástavě krvácení, tak v procesu angiogeneze, která je regulována řadou proangiogenních a antiangiogenních faktorů, které jsou skladovány právě v sekrečních granulech trombocytů a jsou uvolňovány do krevního oběhu po jejich aktivaci. Do dnešní doby bylo odhaleno více než 300 odlišných molekul secernovaných trombocyty (Whiteheart, 2011). Mezi sekreční granula patří α -granula, denzní granula a lyzozomy.

3.1 α -granula

α -granula jsou největšími (200 – 500 nm) a nejvíce zastoupenými sekrečními granuly trombocytů (King *et* Reed, 2002). Jsou v nich skladovány růstové faktory, jako je destičkový růstový faktor (PDGF), bazický růstový faktor fibroblastů (bFGF), epidermální růstový faktor (EGF), růstový faktor hepatocytů (HGF), růstový faktor podobný inzulinu (IGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), destičkový růstový faktor pro endoteliální buňky (PDEC GF) a koagulační proteiny (faktor V, XI, XIII, vWf, fibrinogen). Obsahují také další proangiogenní faktory (angiogenin, angiopoetin-1) a antiangiogenní faktory (angiostatin, destičkový faktor 4 (PF-4), trombospondin), matrixové metaloproteázy (MMP2, MMP9), tumor nekrotické faktory (TNF- α , TNF- β) a řadu cytokinů (CXCL1, CXCL4, CXCL5, CXCL7, CXCL8, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL5), které jsou také zapojeny v procesu angiogeneze (Blair *et* Flaumenhaft, 2009; Whiteheart, 2011). Některé z těchto molekul jsou syntetizovány výhradně megakaryocyty (např. PF-4). Jiné jsou syntetizovány i jinými buňkami (koagulační faktor V, trombospondin, vWf) a některé molekuly jsou do granul trombocytů jen endocytovány z okolí (King *et* Reed, 2002). Endocytóza molekul do trombocytů je selektivní, což naznačuje i fakt, že granula neobsahují větší množství sérových proteinů, jako je albumin, i když jejich koncentrace v plazmě je řádově vyšší než u uvedených růstových faktorů (Klement *et al.*, 2008).

Rozložení regulátorů angiogeneze v α -granulích popisuje ve své studii Italiano *et al.* (2008). Ten objevil, že angiogenní a angiostatické proteiny jsou umístěny v odlišných populacích α -granulí a jejich obsah je selektivně vylučován jako odpověď na různé stimuly, které působí na různé receptory na povrchu trombocytů – PAR-1 a PAR-4. V případě aktivace trombinového receptoru PAR-4 dochází k uvolnění granul

s antiangiogenními faktory. Stimulace trombinového receptoru PAR-1 má za následek uvolnění granul s proangiogenními faktory (Italiano *et al.*, 2008).

3.2 Denzní granula

Denzní granula jsou zásobárnami serotoninu, ADP, adenosin trifosfátu (ATP) a vápenatých a hořečnatých iontů (Sabrkhany *et al.*, 2011). ADP a vápenaté ionty vylučované z aktivovaných trombocytů jsou proangiogenní faktory. Podílí se na aktivaci dalších trombocytů a vzniku agregátů při hemostáze (Rendu *et Brohard-Bohn*, 2001). ADP konkrétně aktivuje destičky přes receptory P2Y₁ a P2Y₁₂. Aktivace zprostředkovaná přes receptory P2Y₁ zapříčiní změnu tvaru destiček a zahájí jejich agregaci. Aktivace P2Y₁₂ je potřebná pro dokončení a umocnění shlukování destiček (Sabrkhany *et al.*, 2011). Serotonin je samotný slabým stimulatorem agregace trombocytů, avšak v přítomnosti dalších proagregačních látek jako je ADP nebo tromboxan A₂, silně potencuje tvorbu agregátů trombocytů. Jeho role tedy spočívá v zesílení již spuštěné agregace trombocytů (Cerrito *et al.*, 1993).

3.3 Lyzozomy

Lyzozomy obsahují kyselé hydrolázy schopné eliminovat cirkulující shluky trombocytů. Některé z nich mohou hrát roli při patologické lokální degradaci neporušeného endotelu cévní stěny (Rendu *et Brohard-Bohn*, 2001).

4. PROANGIOGENNÍ FAKTORY TROMBOCYTŮ

Proangiogenní faktory jsou látky, které podporují novotvorbu cév. Působí odlišnými mechanismy a účinky, které mají na organismus výsledný vliv ve smyslu podpory angiogeneze. Celá řada těchto faktorů je skladována v α -granulích trombocytů (tab. I), nejvýznamnější z nich jsou popsány níže.

Tab. I: Proangiogenní faktory trombocytů a jejich funkce

Faktor	Funkce v souvislosti s nádorovou angiogenezí
PDGF	Stimulace proliferaci a migrace endotelových buněk (Shen <i>et al.</i> , 2007), stabilizace cévy (Sun <i>et al.</i> , 2005)
VEGF	Zvýšení cévní permeability, stimulace migrace a proliferace endotelových buněk a inhibice jejich apoptózy (Halper, 2010)
bFGF	Stimulace proliferace a migrace endotelových buněk, formování a stabilizace cévy (Kilvaer <i>et al.</i> , 2011; Dunn <i>et al.</i> , 2000)
IGF	Stimulace proliferaci buněk mezenchymového původu, inhibice buněčné apoptózy (Halper, 2010)
EGF	Stimulace růstu, proliferace a diferenciaci buněk (Herbst, 2003)
PDECGF	Stimulace migrace a proliferace endotelových buněk, tvorba lumina cévy, inhibice apoptózy nádorových buněk (Liekens <i>et al.</i> , 2007)
Angiopoetin-1	Stabilizace cév a snížení permeability (Metheny-Barlow <i>et Li</i> , 2003), inhibice apoptózy endotelových buněk (Papapetropulos <i>et al.</i> , 2000)
HGF	Stimulace proliferace a migrace endotelových buněk (Bussolino <i>et al.</i> , 1992; Nakamura <i>et al.</i> , 1986)
MMP	Degradace ECM - šíření nádorových buněk podporující metastazování a endotelových buněk do nádorového stromatu podporující angiogenezi, regulace apoptózy (Egeblad <i>et Werb</i> , 2002)
CC (CCL2, CCL3, CCL5)	Prozánětlivé cytokiny, chemotaktický účinek na endotelové buňky (von Hundelshausen <i>et al.</i> , 2007)
CXC(CXCL5, CXCL8/IL-8, CXCL12)	Prozánětlivé cytokiny, chemotaktický účinek na endotelové buňky (Vandercappellen <i>et al.</i> , 2008;)

4.1 Destičkové růstové faktory PDGF

Rodina destičkových růstových faktorů PDGF je pojmenována od jejího prvního objeveného člena, který byl extrahován právě z α -granul trombocytů (Halper, 2010). Jedná se o glykoprotein složený ze dvou řetězců A a B. Vyskytuje se jako dimer ve třech formách - AA, AB, BB (Bhardwaj *et al.*, 1996; Andrae, 2008), které jsou syntetizovány endotelovými buňkami, trofoblasty placenty, buňkami hladké svaloviny, makrofágy a buňkami sarkomu. V trombocytech je pouze skladována jedna forma – heterodimerní PDGF-AB (Halper, 2010).

Účinek PDGF je zprostředkován vazbou na receptory PDGFR- α a PDGFR- β (Shen *et al.*, 2007). Receptor PDGFR- β můžeme nalézt na povrchu fibroblastů, buněk hladké svaloviny, endotelových buněk, pericytů a některých nádorových buněk. Receptor α váže všechny tři izoformy PDGF, zatímco receptor β má vysokou afinitu k BB izoformě, v menší míře váže AB izoformu a PDGF-AA neváže vůbec (Bhardwaj *et al.*, 1996).

Destičkové růstové faktory jsou nezbytné především pro embryonální vývoj cév, pro angiogenezi a stabilizaci vaskulatury během života jedince, což je dáno jejich vlastností stimulovat přes receptory PDGFR buněčnou proliferaci a migraci. Hrají důležitou roli i v reparačních mechanismech cévního systému a při hojení rány, neboť jsou chemoatraktanty pro fibroblasty, buňky hladké svaloviny, neutrofilů, makrofágy a pericyty (Halper, 2010; Mendelson *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2007). Z popsaných vlastností PDGF vyplývá i jejich role v patologických procesech, například v ateroskleróze, plicní fibróze, glomerulonefritidě, sarkomech nebo leukémii (Andrae, 2008; Halper, 2010).

4.2 Vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF

Vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF je jedním z nejznámějších a nejvíce studovaných proangiogenních faktorů. Jedná se o glykoprotein, který je strukturně příbuzný s růstovým faktorem PDGF (Halper, 2010). Je syntetizován granulocyty, lymfocyty, hypoxickými a nádorovými buňkami, případně skladován v α -granulích trombocytů (Seo *et al.*, 2010; Niers *et al.*, 2011). Fyziologická hodnota VEGF obsaženého v trombocytech je $0,74 \pm 0,37 \text{ pg}/10^6$ trombocytů, v citrátové plazmě pak $0,05 \pm 0,02 \text{ pg}/\mu\text{l}$. Tyto hodnoty byly naměřeny ELISA metodou poprvé použitou Petersonem *et al.* (2010), kterou lze trombocyty izolovat z plné krve bez jejich aktivace

a získat tak nezkrácené výsledky způsobené jejich aktivací a uvolněním VEGF z granulí (Peterson *et al.*, 2010). Dosud bylo identifikováno šest izoform VEGF - A až E. Nejvíce studovaným členem je VEGF-A, proto je často uváděn jen jako VEGF. Byly popsány tři receptory pro tento růstový faktor - VEGFR-1, VEGFR-2 a VEGFR-3. První dva receptory jsou lokalizovány na cévních a lymfatických endotelových buňkách dospělých jedinců a mohou vázat všechny izoformy VEGF (Halper, 2010). VEGFR-3 je prezentován pouze na lymfatickém endotelu a má afinitu jen k izoformám VEGF-C a VEGF-D (Takahashi, 2011). VEGF po vazbě na své receptory stimuluje proliferaci a migraci endotelových buněk, inhibuje jejich apoptózu a zvyšuje cévní permeabilitu a tím podporuje angiogenezi, případně patologické procesy jako je vznik edémů a tvorba metastáz (Halper, 2010; Tsai *et al.*, 1995). Od příbuzného růstového faktoru PDGF, který je důležitý spíše pro stabilizaci nově vzniklých cév, se odlišuje tím, že je klíčovým faktorem pro počáteční formování nových cév (Sun *et al.*, 2005).

Významná role VEGF v procesu regulace angiogeneze je důvodem, proč se v posledních letech výzkum zaměřil na tento růstový faktor jako prognostický marker nádorového onemocnění. Různé studie se liší v názorech, zda je lepším indikátorem nádorové progresy sérová nebo plazmatická hladina VEGF (Niers *et al.*, 2011). Hladina VEGF je velice závislá na typu vyšetřovaného materiálu a proto musí být vzorky vhodně voleny a interpretovány. Na Oddělení laboratorní medicíny Masarykova onkologického ústavu v Brně byly měřeny hladiny VEGF pomocí ELISA kitu (R&D) a výsledky ukázaly, že nejnižší hladina VEGF je v citrátové plazmě, asi 3x vyšší v Li-heparin plazmě a více jak 10x vyšší hladina byla naměřena v séru ve srovnání s citrátovou plazmou.

Sérová hladina VEGF je ovlivněna aktivací trombocytů a proto u onkologických pacientů vyšší hodnota sérového VEGF koreluje se zvýšeným počtem trombocytů. Trombocytémie je běžným znakem těchto pacientů díky vyšší sekreci trombopoetinu podporujícího proliferaci trombocytů. Z tohoto pohledu se zdá být sérová hladina VEGF vhodným ukazatelem nádorové progresy (Seo *et al.*, 2010; Gunsilius *et al.*, 2000). Jiný přístup hodnotí jako lepší nádorový marker plazmatickou hodnotu VEGF, jelikož sérová hladina VEGF neodráží aktuální *in vivo* koncentraci tohoto faktoru v cirkulaci. V citrátové plazmě, kde není očekávána aktivace trombocytů a uvolnění VEGF, je u onkologických pacientů nalézána jeho vyšší hodnota než u zdravých jedinců, což je interpretováno jako důsledek vyšší hladiny VEGF v cirkulaci, která je spojena s vyšší angiogenní aktivitou pacientů s rakovinou (Yoshikawa *et al.*, 1999). Niers *et al.* (2011)

vyvrátili toto tvrzení svými výsledky výzkumu. Došli k závěru, že hladina skutečně cirkulujícího VEGF je nízká u většiny pacientů s metastázemi a podstatně se neliší od zdravých jedinců. V destičkách onkologických pacientů dále naměřili dvakrát takovou hladinu VEGF, než u vzorků zdravých jedinců. Podle nich VEGF může pocházet z nádorové tkáně, ze které se dostává do cirkulace, odkud je vychytáván trombocyty. Na základě toho může být jeho hladina v trombocytech dobrým ukazatelem angiogenní aktivity onkologických pacientů (Niers *et al.*, 2011).

4.3 Bazický růstový faktor fibroblastů bFGF

Tento faktor patří do rodiny heparin vázajících růstových faktorů FGF (Presta *et al.*, 2005). Rodina FGF obsahuje 18 růstových faktorů, kterým přísluší čtyři transmembránové receptory FGFR-1 až FGFR-4 a jeden solubilní receptor FGFR-5. Prvním popsaným členem této skupiny byl bFGF, nebo také FGF-2. Jeho zdrojem jsou mozek, hypofýza, sítnice, chrupavka a některé typy nádorových buněk (Beenken *et Mohammadi*, 2009; Halper, 2010).

bFGF je skladován v granulích trombocytů a uvolňován do cirkulace po jejich aktivaci, například při poranění cévy, a je navázán na své receptory na povrchu příslušných buněk (Halper, 2010). Má přímý i nepřímý vliv na endotelové buňky. Jeho funkcí je jednak stimulace migrace a proliferace endotelových buněk, jelikož působí jako jejich mitogen a chemoatraktant. Navíc reguluje v nádorových buňkách expresi VEGF, mitogenu endotelových buněk. Zvyšuje expresi molekul endotelových buněk, které aktivují metaloproteázy (MMP). Ty rozruší ECM a umožní tak invazi endotelových buněk do tkáně. FGF se tak nepřímo účastní proteolytického rozložení ECM a následnou invazí endotelií do tkání je zahrnut do procesu angiogeneze (Dunn *et al.*, 2000). Stabilizuje krevní cévy, účinkuje jako chemoatraktant a proliferant hladkých svalových buněk cév a pericytů (Kilvaer *et al.*, 2011). Je silným mitogenem také pro epiteliální buňky a fibroblasty a modulátorem embryonálního vývoje (Halper, 2010).

4.4 Inzulínu podobný růstový faktor IGF

Mezi dosud popsané členy rodiny růstových faktorů IGF patří IGF-I a IGF-II. Jsou strukturně příbuzné s inzulínem a jejich primární syntéza probíhá v játrech (Halper, 2010). IGF jsou jednořetězcové polypeptidy, které se vážou k šesti typům proteinů vázajících IGF (IGF-BP), které jsou syntetizovány rovněž v játrech. Ty slouží jako

transportní systém pro IGF a udržují růstové faktory v neaktivním stavu. Vazba IGF k jejich buněčným receptorům (IGFR-I a IGFR-II) je umožněna až po rozkladu IGF-BP jejich specifickými proteázami. IGF-II hraje roli spíše v embryonálním vývoji a i přes to, že je jeho hladina v krvi v dospělosti vyšší než IGF-I, zprostředkovává většinu účinků na buňky právě méně zastoupený IGF-I. Produkci a aktivitu IGF reguluje mnoho hormonů (estrogen, adrenokortikotropin, tyrotropin, luteinizační hormon, folikulo-stimulační hormon, lidský choriový gonadotropin) a také jiné růstové faktory (PDGF, EGF, FGF) (Yu *et* Rohan, 2000).

Slouží jako mitogen epiteliálních buněk a buněk mezenchymového původu, navíc inhibuje jejich apoptózu. Je důležitý při embryonálním vývoji pro diferenciaci buněk a obnově epitelových buněk orgánů jako jsou játra, tlusté střevo nebo prostata. Stimuluje také syntézu kolagenu (Halper, 2010).

V některých případech je IGF-I vylučován i nádorovými buňkami. Jeho zvýšená syntéza nádorovými buňkami potencuje produkci růstových hormonů, které zpětně stimulují proliferaci nádorových buněk (Halper, 2010). Bylo prokázáno, že vysoká hladina cirkulujícího IGF-I a nízká hladina IGF-BP-3, který je hlavním vazebným proteinem IGF-I inhibující jeho mitogenní funkci, může být spojována se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny prostaty, prsu, tlustého střeva a plic (Yu *et* Rohan, 2000). Bylo také pozorováno, že IGFR-I je zvýšeně exprimován většinou nádorových buněk (Roith, 2000).

5. ANTIANGIOGENNÍ FAKTORY TROMBOCYTŮ

Antiangiogenní faktory jsou látky, které na rozdíl od proangiogenních faktorů inhibují angiogenezi. Jejich účinky v souvislosti s inhibicí nádorové angiogeneze jsou ve většině případů založeny na inhibici migrace a proliferace endotelových buněk. Nejvýznamnější z antiangiogenních faktorů uvolňovaných z trombocytů jsou popsány dále (tab. II).

Tab. II: Antiangiogenní faktory trombocytů a jejich funkce

Faktor	Funkce v souvislosti s nádorovou angiogenezí
PF-4	Blokování angiogeneze vazbou na proangiogenní faktory, inhibice proliferace endotelových buněk (Cervi <i>et al.</i> , 2008; Yang <i>et al.</i> , 2011)
Trombospondin-1	Inhibice migrace a proliferace endotelových buněk, stimulace jejich apoptózy (Distler <i>et al.</i> , 2003)
Angiostatin	Inhibice migrace a proliferace endotelových buněk, stimulace jejich apoptózy, inhibice novotvorby cév (Distler <i>et al.</i> , 2003)
Endostatin	Inhibice migrace a proliferace endotelových buněk, stimulace jejich apoptózy, inhibice funkce MMP (Distler <i>et al.</i> , 2003)
TGF β -1	Inhibice proliferace a migrace endotelových buněk, stabilizace cévy (Roberts <i>et Sporn</i> , 1989)

5.1 Transformující růstový faktor TGF β -1

Růstový faktor TGF β -1 patří do rodiny TGF β , která obsahuje tři izoformy TGF β -1 až 3. TGF β -1 je syntetizován v endotelových, hematopoetických buňkách a buňkách pojivové tkáně. Je aktivován trombospondinem-1. Stimuluje proliferaci mezenchymových buněk, ale je inhibitorem proliferace a migrace epitelových a endotelových buněk a podporuje jejich apoptózu. Navíc je silným imunosupresorem potlačujícím funkci imunitního systému. Z toho vyplývá, že hraje roli jako nádorový supresor. Indukuje produkci kolagenu a ostatních sloučenin ECM, snižuje expresi MMP a zvyšuje syntézu inhibitorů proteáz, čímž podporuje proliferaci stromatu (Halper, 2010; Roberts *et Sporn*, 1989).

Zajímavé je, že během kancerogeneze se maligní buňky stávají rezistentními k inhibičnímu účinku TGF β -1 na růst buněk. Často je zvýšené množství TGF β -1 vylučováno také nádorovými buňkami, což přispívá k imunosupresi pozorované u většiny pacientů s rakovinou a tím k metastatickému rozšíření. Jeho inhibitory mohou být použity v léčbě onkologických pacientů. Inhibicí tohoto faktoru se zabezpečí normální funkce imunitního systému (Halper, 2010; Roberts *et Sporn*, 1989).

5.2 Destičkový faktor PF-4

PF-4, známý také jako CXCL-4, je protein s tetramerickou strukturou, který patří do rodiny CXC chemokinů (Slungaard, 2004). Jako inhibitor angiogeneze byl objeven roku 1982 a roku 1990 byl objeven jeho inhibiční vliv na růst nádoru u myší. Je produkován megakaryocyty, v malé míře pak také trombocyty, monocyty, T-buňkami a neutrofilů (Yang *et al.*, 2011). Je skladován v α -granulích trombocytů a do krve je vylučován ve vysoké koncentraci po aktivaci destiček v místě poraněné cévy (Cervi *et al.*, 2008).

Jelikož dosud nejsou známy žádné receptory pro PF-4, předpokládá se, že jeho antiangiogenní efekt je zprostředkován jeho schopností vázat stimulační chemokiny, jako je IL-8, a soutěžit s ostatními růstovými faktory (VEGF, bFGF) o vazbu na heparin. PF-4 také moduluje funkci proangiogenních růstových faktorů, např. VEGF, ke kterému se váže s vysokou afinitou. Brání tak jeho interakci se svým receptorem (VEGRF-2) a v důsledku toho inhibuje angiogenezi. Navíc inhibuje i proliferaci endotelových buněk. Dále PF-4 upravuje mitogenní účinek bFGF na fibroblasty, inhibuje proliferaci a aktivaci T-buněk a lymfocytů infiltrujících nádor a inhibuje uvolnění cytokinů ze stroma nádoru (Cervi *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011).

6. xCELLigence – METODA ANALÝZY BUNĚK V REÁLNÉM ČASE

xCELLigence je metoda, jejíž podstatnou výhodou, díky které je vhodná pro analýzu funkčních vlastností buněk, je její neinvazivní charakter bez fluorescenčního značení nebo barvení buněk. Odlišuje se od klasických end-point analýz, u kterých je výsledek znám až po ukončení experimentu, možností sledovat chování buněk v reálném čase. Data jsou získávána po celou dobu trvání experimentu, kdy jsou buňky nepřetržitě monitorovány. Měření se odehrává v podmínkách co nejvíce podobných přirozenému prostředí buněk, proto je možné tuto metodu využít jak pro kratší experimenty (několik hodin), tak i pro ty delší (2-3 dny) (The xCELLigence system: new horizons in cellular analysis, 2009).

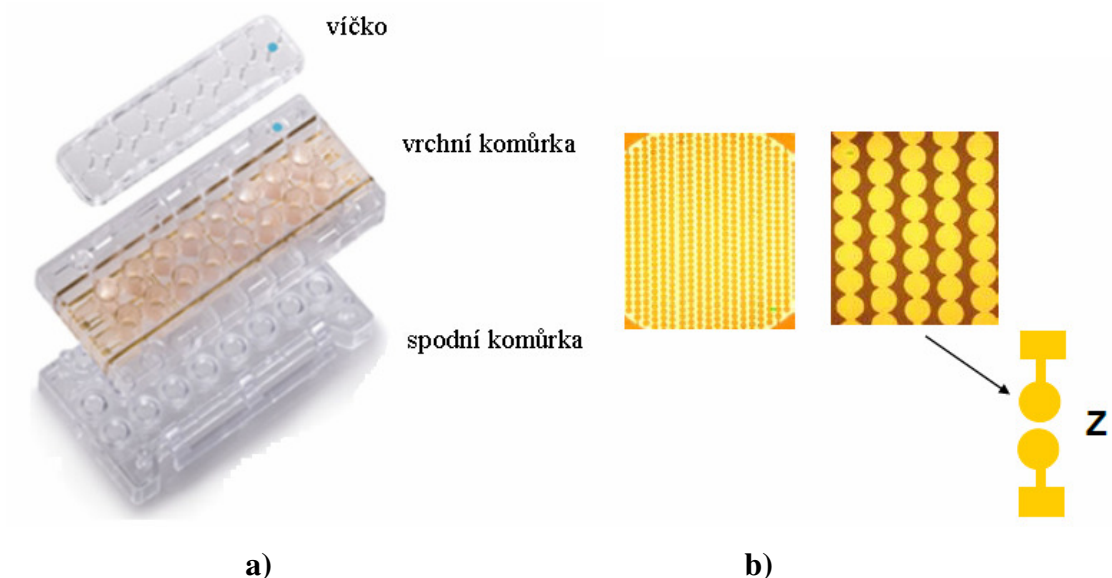
6.1 Přístrojové vybavení xCELLigence RTCA DP

Provedení experimentu pomocí xCELLigence RTCA DP (Real-Time Cell Analyzer Dual Plate) je pro uživatele snadné a nenáročné. Měření dat je plně automatizováno a práce se softwarem a výslednými daty velmi jednoduchá.

Přístrojové vybavení (obr. 5) pro tuto metodu je následující:

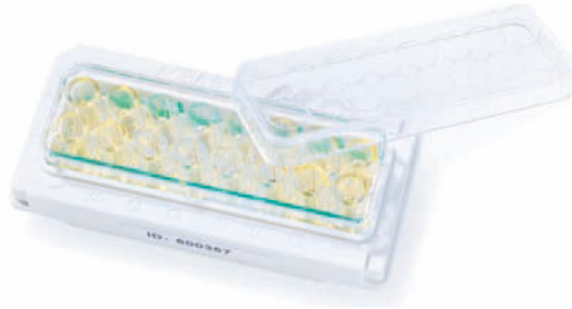
- **RTCA analyzátor** - jedná se o elektronický analyzátor, který měří elektrickou impedanci mikroelektrodových zlatých senzorů na dně destiček (CIM-Plate 16, E-Plate 16) při různé frekvenci signálu. Analyzátor pod kontrolou RTCA Softwaru vysílá a přijímá elektrické signály. Průměrná doba měření pro jednu jamku trvá přibližně 150 milisekund. Kontinuálně přenáší naměřená impedanční data, neboli cell index (CI), do počítače, kde můžeme pozorovat jejich průběh (The xCELLigence system: new horizons in cellular analysis, 2009). Analyzátor je spolu s destičkami umístěn v inkubátoru, který kontroluje podmínky prostředí experimentu vhodné pro buňky, konkrétně teplotu, vzdušnou vlhkost a podíl CO₂.

- **RTCA řídicí jednotka** - přijímá data měřená RTCA analyzátozem a pro jejich zpracování využívá RTCA Software, který zobrazuje naměřená data v reálném čase. Skládá se tedy z počítače s nainstalovaným RTCA Softwarem a přípojného zařízení (The xCELLigence system: new horizons in cellular analysis, 2009).
- **CIM-Plate 16** - tato plastová migrační destička se šestnácti jamkami je určena na jedno použití. Skládá se z vrchní (Upper Chamber) a spodní (Lower Chamber) komůrky a slouží tedy k analýze buněčné invaze a migrace. Každá z jamek UC má dno složené z membrány obsahující póry o průměru 8 μm (xCELLigence RTCA DP Instrument: Flexible real-time cell monitoring, 2009). Do každé membrány je integrován senzor v podobě zlatých mikroelektrod. Dna jamek jsou elektrodami pokryta přibližně z 80 % (obr. 3b). UC je uzavíratelná víčkem, které je navrženo tak, aby docházelo k co nejmenšímu odpařování napipetovaného roztoku. Spodní komůrka LC migrační destičky slouží jako zásobník chemoatraktantů pro buňky obsažené v UC. Jednotlivé části CIM-Plate 16 do sebe velice těsně zapadají (obr. 3a).



Obr. 3: CIM-Plate 16: a) jednotlivé díly CIM-Plate 16, b) detail zlatých elektrod na dně jamek vrchní komůrky CIM-Plate 16 (upraveno dle RTCA DP Instrument: Operator's Manual, 2009)

- **E-Plate 16** – je stejně jako CIM-Plate 16 plastová destička na jedno použití se šestnácti jamkami, jejichž dna jsou pokryta z 80 % zlatými mikroelektrodami. Na rozdíl od migrační destičky nejsou složeny z vrchní a spodní komůrky, ale obsahují pouze destičku s jamkami a víčko (obr. 4). Tato destička se využívá pro měření změn počtu buněk, buněčné adheze, buněčné viability a morfologie (xCELLigence RTCA DP Instrument: Flexible real-time cell monitoring, 2009).



Obr. 4: E-Plate 16 (xCELLigence RTCA DP Instrument: Flexible real-time cell monitoring, 2009)

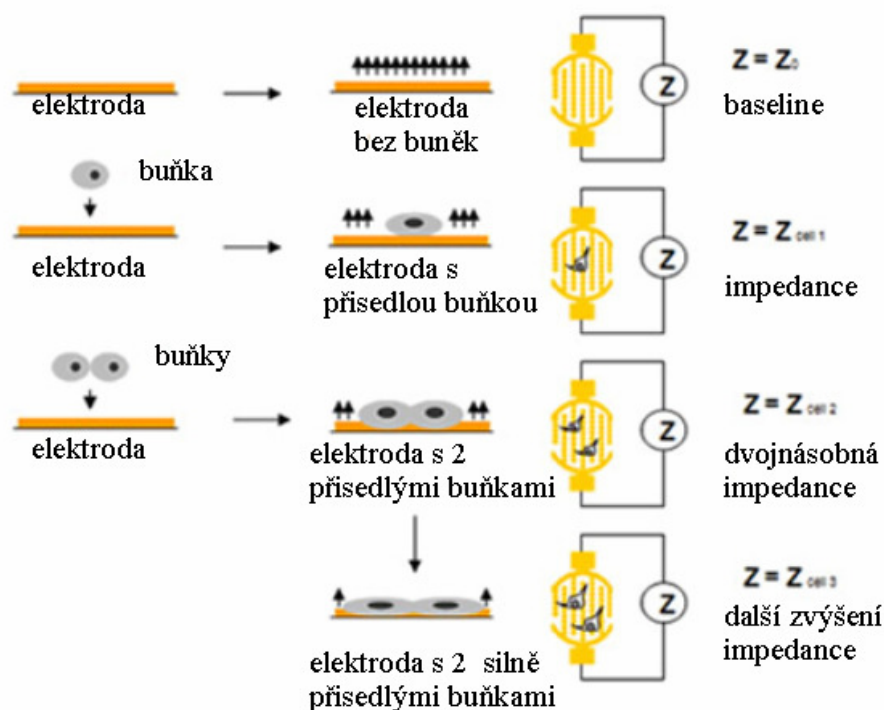


Obr. 5: Přístrojové vybavení xCELLigence RTCA DP (xCELLigence RTCA DP Instrument: Flexible real-time cell monitoring, 2009)

6.2 Princip metody xCELLigence

Již roku 1984 Giaever a Keese publikovali svou práci, ve které měřili časové změny impedance na zlatých elektrodách v buněčných kulturách, impedance se podle jejich výsledků měnila v závislosti na počtu buněk v suspenzi a jejich viabilitě. Tirupathi *et al.* (1992) na základě předchozích výzkumů vyvinuli elektrickou metodu pro studium změn tvaru endotelových buněk v reálném čase. Ta byla přínosná zejména pro porozumění mechanismů změn ve funkci endotelu jako bariéry. Endotelové buňky byly pěstovány na malých zlatých elektrodách a v reálném čase byly měřeny změny impedance, které byly připisovány změnám tvaru buněk. Tato domněnka byla potvrzena pokusem s α -trombinem, který zvyšuje propustnost endotelu tím, že u endotelových buněk navozuje jejich smrštění a vznik mezer v buněčné vrstvě. Důsledkem bylo snížení impedance zlatých elektrod (Tirupathi *et al.*, 1992).

Principem této metody je tedy měření impedance (elektrického odporu) zlatých elektrod. Ta se mění dle iontového prostředí v jamce na rozhraní elektrody a roztoku obsahujícího buňky (The xCELLigence system: new horizons in cellular analysis, 2009). Jak uvádí Giaever a Keese (1991) impedance závisí na efektivní volné ploše elektrody, která se mění s přisedáním a uvolňováním buněk z elektrody (obr. 6). Buněčná adheze ovlivňuje tok proudu mezi elektrodou a buňkou a mezi sousedními buňkami a tím je dán výsledný odpor. Přítomnost buněk na povrchu elektrody ovlivní iontové prostředí tak, že dojde ke zvýšení impedance elektrody (Giaever *et Keese*, 1991). Čím více buněk je na elektrodě přisedlých, tím vyšší je impedance. Impedance se může lišit jak v závislosti na počtu adherovaných buněk a jejich morfologii, tak na kvalitě adheze (The xCELLigence system: new horizons in cellular analysis, 2009).



Obr. 6: Schématické znázornění změn impedance v závislosti na buněčné adhezi (upraveno dle *The xCELLigence system: new horizons in cellular analysis*, 2009)

6.3 Buněčný index CI

Naměřená impedance na zlatých elektrodách je vyjádřena jako buněčný index CI (Cell Index). Jedná se o bezrozměrnou veličinu, která v závislosti na čase podává informace o buněčné viabilitě, počtu, morfologii, schopnosti adheze a migrace buněk nebo schopnosti tvořit souvislou vrstvu (*The xCELLigence system: new horizons in cellular analysis*, 2009). Hodnoty CI jsou tedy pro různé buněčné linie odlišné v závislosti na jejich vlastnostech (Rahim *et al.*, 2011).

Z výše popsaného principu metody vyplývá, že pokud buňky nejsou přítomny nebo špatně adherují na elektrodu, je hodnota CI nulová nebo velmi nízká. Pokud je na elektrodu přisedlých více buněk a jsou více rozprostřeny na dně jamky, hodnota CI je vyšší (*The xCELLigence system: new horizons in cellular analysis*, 2009; Vondráčková *et al.*, 2010). Pro dosažení adheze, která je v některých pokusech potřebná, je možné povrch elektrody pokrýt látkou, která adhezi zprostředkuje (např. fibronectin).

6.4 Aplikace metody xCELLigence

Tato metoda má velký rozsah použití, je aplikována v oblasti vývoje léčiv, nádorové biologie, toxikologii, lékařské mikrobiologii a virologii. Aplikace zahrnují sledování buněčné viability, proliferace a diferenciace, buněčné invaze a migrace, schopnosti adheze a rozrůstání, apoptózy, stanovení buňkami nebo exogenními látkami zprostředkované cytotoxicity, analýzu funkce a aktivace receptorů a detekci cytopatického efektu virů. Díky záznamu dat během celé analýzy je možné dle průběhu křivky správně načasovat „léčbu“ buněk nebo jejich další manipulaci (The xCELLigence system: new horizons in cellular analysis, 2009; xCELLigence RTCA DP Instrument: Flexible real-time cell monitoring, 2009). Přístroj zaznamená odezvu buněk na tento stimul - rychlost, kinetiku a intenzitu reakce buněk – v podobě CI jako funkce času (Vondráčková *et al.*, 2010). Tato kinetická odpověď po určité manipulaci s buňkami nám může poskytnout cenné informace o jejich chování a vlastnostech, které jsou běžnými metodami přehlédnutelné.

- **Stanovení cytotoxicity látek**

Použití metody xCELLigence v oblasti zkoumání cytotoxicity je velice výhodné, neboť nahrazuje často neúspěšné prvotní pokusy na zvířatech, které jsou dosud využívány zvláště pro určení toxického účinku exogenních látek. Uvedením této metody do praxe mohou být testy na zvířatech v prvotních fázích eliminovány a může se k nim přistupovat až v další fázi po prokázání toxického účinku pomocí xCELLigence (Ziebolz, 2010). Vyhodnocení naměřených dat významně přispívá k pochopení účinnosti a specifity působení chemických látek na buňky, permeability buněk pro různé formy látek a mechanismů lékové interakce s cílovými buňkami. Proto je tato metoda vhodná pro vývoj léků a určení cytotoxických účinků na buňky. IC_{50} u testů cytotoxicity látek lze, podobně jako hodnoty střední smrtelné dávky LD_{50} měřené *in vivo* u zvířat, použít pro určení míry toxicity (Boyd *et al.*, 2008). Nejen dávka, ale i doba působení cytotoxických látek může mít podstatný vliv na hodnotu IC_{50} . Z tohoto důvodu je měření v reálném čase a hodnoty IC_{50} závislé na čase více informativní než ty, které nejsou vztahovány k časové ose (Real-time and dynamic monitoring of cell proliferation and viability for adherent cells, 2008).

Díky buněčné smrti se adherované buňky začnou odlučovat z povrchu elektrody a dojde k poklesu naměřené impedance, tedy snížení CI. Vlivem buněčné smrti dochází

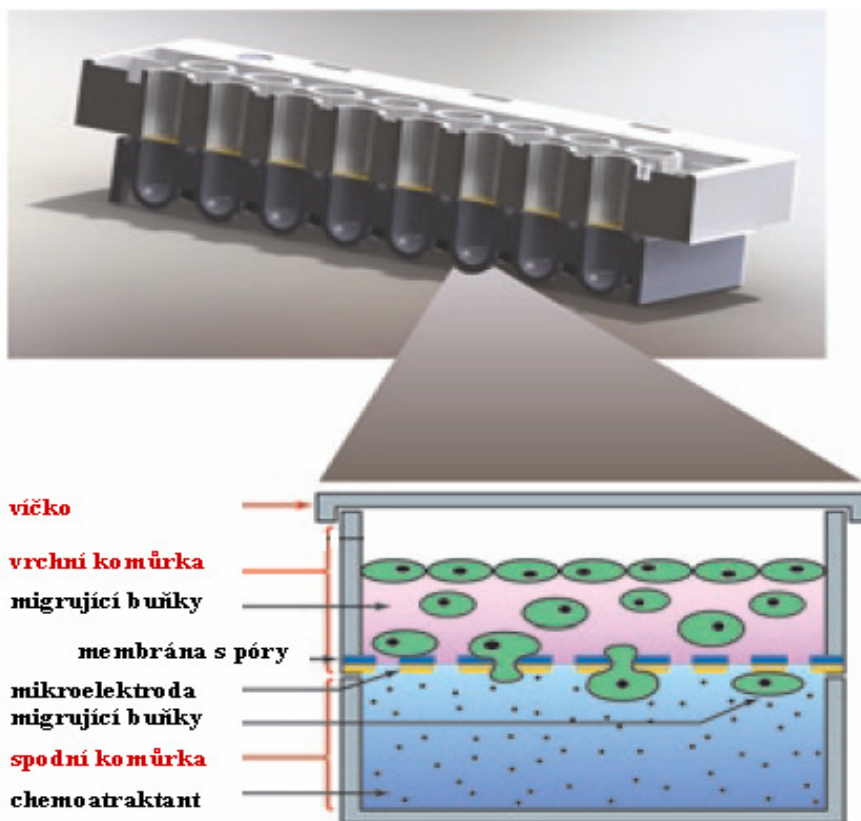
ke změnám morfologie buněk nebo integrity souvislé vrstvy buněk na elektrodě, což také samo o sobě vede ke změnám impedance (Diemert *et al.*, 2012). Buněčná smrt je tedy monitorována pomocí CI, který kvantifikuje počátek a progresi cytotoxicity látek. Umožňuje přesně určit vhodnou dobu pro následné proteomické a genomické analýzy (Ziebolz, 2010).

- **Migrace a invaze buněk**

Buněčná migrace a invaze jsou procesy nezbytné pro embryogenezi, vaskulogenezi, realizaci imunitní odpovědi, ale také pro patologické reakce jako je metastazování. Při těchto procesech dochází k morfologickým změnám buněk přeskupením cytoskeletu, kontrakci buňky a sekreci degradačních enzymů. Konkrétně migrace endoteliálních buněk je nezbytnou součástí angiogeneze (Wu *et al.*, 2009), zahrnuje chemotaktické, haptotaktické a mechanotaktické vlivy na migraci buněk. Chemotaktická migrace je indukována solubilními růstovými faktory (VEGF, bFGF, HGF aj.). Tyto faktory interagují s příslušnými receptory na povrchu endotelových buněk za přispění extracelulárních signálů, buněčné polarity a intracelulární signalizace vyústí v přímou buněčnou migraci (Wu *et al.*, 2009; Greiner *et al.*, 2009).

Rahim *et al.* (2011) metodou xCELLigence měřili invazivitu nádorových buněk do vrstvy endotelií pokrývajících elektrodu. Nádorové buňky svou invazivitou narušily buněčné spoje endotelových buněk, rozrušily jejich souvislou vrstvu a vnikly mezi endotelové buňky. Podle míry invazivity buněčných linií se snižovala hodnota impedance (Rahim *et al.*, 2011).

Měření migrace buněk (obr. 7) je omezeno velikostí pórů membrány (Rahim *et al.*, 2011), kterými buňky putují přes elektrodu z vrchní komůrky do spodní komůrky s chemoatraktanty (Wu *et al.*, 2009). Impedance se zvyšuje se zvyšujícím se počtem migrujících buněk přes elektrodu. Migrační aplikace této metody poskytuje informace o začátku migrace buněk a jejich rychlosti. Je důležitá pro lepší pochopení dosud neobjasněných biologických a molekulárních mechanismů migrace buněk (Bird *et al.*, 2009).



Obr. 7: Princip buněčné migrace na CIM-Plate 16 destičkách: buňky migrují z vrchní komůrky přes pórovitou membránu s mikroelektrodami za chemoatraktantem ve spodní komůrce (upraveno dle Bird et Kirstein, 2009)

CÍL PRÁCE

- Obecně hrají trombocyty roli při progresi nádorových onemocnění, nádorové angiogenezi a metastazování. Obsahují řadu faktorů s proangiogenním i antiangiogenním efektem a jejich uvolňování z granul trombocytů reguluje proces nádorové angiogeneze působením na mikroprostředí nádoru včetně endotelových buněk nově vznikajících cév, tedy jejich migrace a proliferace. Obsah krevních destiček pacientů s onkologickým onemocněním se liší od obsahu fyziologických trombocytů, což je dobře popsáno na úrovni jednotlivých faktorů. Cílem této práce bylo **vytvořit modelový systém pro studium efektu obsahu trombocytů na migraci endotelových buněk a stanovit tímto systémem funkční vlastnosti krevních destiček onkologických pacientů**. Pro tyto účely byl navržen modelový systém založený na sledování migrace endotelových buněk, linie HUVEC, metodou xCELLigence a dílčími cíli práce proto byla **optimalizace podmínek kultivace buněk HUVEC a optimalizace migračních testů xCELLigence**.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7. MATERIÁL

7.1 Chemikálie

- Trypsin/EDTA (PAA, Rakousko)
- Fosfátový pufr s chloridem sodným - PBS (Sigma, USA)
- Neutralizační roztok pro trypsin – TNS (Lonza, USA)
- Injekční voda (Braun, Německo)
- Dimethylsulfoxid Hybri-max – DMSO (Sigma, USA)
- Fibronektin, 1mg/ml (Sigma, USA)
- Fetální bovinní sérum – FBS (Gibco, USA)
- Trombin - Thrombin Reagent: 100 IU/ml (Siemens, Německo)

7.2 Přístroje

- Centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo)
- Centrifuga Mikro 222 (Hettich, Německo)
- Laminární box Bio Ultra (Telstar, Španělsko)
- Termostat HEPA classic 100 (Thermo, USA)
- Inverzní mikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Lucembursko)
- Inverzní mikroskop Eclipse Ti-S s přídatnou kamerou Digital Sight DS-U2 (Nikon, Japonsko)
- Kryoprezervační stojánek na kryozkumavky - StrataCooler Cryo preservation module (Stratagene, USA)
- Hematologický analyzátor XE-5000 (Sysmex, Japonsko)
- xCELLigence System pro buněčnou migraci (Roche, Švýcarsko):
 - Vzorky byly zpracovány na migrační destičce CIM-Plate 16.
 - Destičky byly analyzovány na přístroji RTCA DP Instrument.
 - Data byla zpracována RTCA Software 1.2.1.

7.3 Kultivační média

- Clonetic EBM-2 Basal Medium (Lonza, USA) - bazální médium pro endotelové buňky HUVEC bez růstových faktorů (Serum Free Media – SFM)
- Clonetic EGM-2 BulletKit (Lonza, USA) - kompletní médium pro endotelové buňky HUVEC (Complete Media): obsahuje jednu 500 ml láhev bazálního média (SFM) a růstové suplementy Clonetics EGM-2 Single Quots Kit (tab. III)

Tab. III: Růstové suplementy obsažené v balení Clonetic EGM-2 BulletKit

Suplement	Objem (ml)
Hydrokortison	0,2
hFGF	2,0
VEGF	0,5
R3-IGF-1	0,5
Kyselina askorbová	0,5
Heparin	0,5
FBS	10,0
hEGF	0,5
GA-1000	0,5

7.4 Kultivační nádoby

- Polyethylenové kultivační lahve s hydrofobním filtrem T-25 s efektivní růstovou plochou 25 cm² Tissue Culture Flask (Jet Biofil, Kanada)

7.5 Biologický materiál

Ve všech měřeních se pracovalo s endotelovými buňkami pupečnickové žíly HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell - Lonza, USA), které byly dodány v kryovialce v počtu 910 000 buněk v 1ml. Pro měření metodou xCELLigence byly použity maximálně do šesté pasáže.

Trombocyty použité k experimentům byly izolovány z plné krve nevyužitých zbytků vzorků získaných od onkologických pacientů nebo osob přicházejících na preventivní vyšetření do Masarykova onkologického ústavu v Brně, kteří podepsali „Souhlas s uchováním a použitím nevyužitých zbytků ze vzorků získaných z mého těla“.

Plná krev byla odebrána do zkumavek S-Monovette® Coagulation/3 ml (SARSTEDT, Německo), obsahující antikoagulační látku citrát sodný.

Krev pro získání séra byla odebrána do zkumavek bez protisrážlivého činidla S-Monovette® Neutral/7,5 ml (SARSTEDT, Německo).

8. METODY

8.1 Kultivace buněk HUVEC

Buňky HUVEC byly dodány zamražené jako 1. pasáž, jejich doporučená hustota rozsazení dle návodu je 2500-5000 buněk/cm². Pasážování buněk bylo prováděno přibližně po týdnu, kdy bylo dosaženo 70-80 % konfluence buněk. Všechny kroky kultivace buněk byly prováděny za aseptických podmínek v laminárním boxu. Buňky byly kultivovány dle doporučení výrobce, některé postupy byly upraveny na základě získaných zkušeností či literárního zdroje (Tessitore *et al.*, 2010)

- **Rozmražení buněk a počátek kultivace**

Prvním bodem postupu byla příprava kultivačního média. Bazální médium (EBM-2 Basal Medium, Lonza) bylo za aseptických podmínek smícháno s růstovými faktory a jinými suplementy (EGM-2 SingleQuot Kit, Lonza) dodanými s médiem (tabulka III). Byl vypočítán počet kultivačních nádob T-25, s efektivní růstovou plochou 25 cm², potřebných na rozsazení podle množství buněk v kryovialce. Doporučená hustota rozsazení buněk dle návodu je 2500-5000 buněk/cm², tedy 4 až 8 nádob, podle množství buněk v dodané kryovialce. Před samotným rozmražením byly připraveny kultivační nádoby tak, že do nich bylo přidáno 6 ml média a byly půl hodiny inkubovány při 37 °C.

Kryoprezervované buňky HUVEC byly rychle rozmrazeny při 37 °C ve vodní lázni. Důležité bylo dodržet maximální čas tání 2 minuty, aby nedošlo k poškození buněk kryoprotektivní látkou DMSO, která je pro metabolizující buňky toxická. Buňky byly v kryovialce rozsuspendovány pipetou a rozděleny na předem připravené kultivační nádoby s médiem. Všechny nádoby byly uloženy do termostatu při podmínkách, které jsou optimální pro růst buněk – 37 °C a 5 % CO₂. Pokud byly buňky přisedlé na dně kultivační nádoby, bylo možné po několika hodinách vyměnit médium, aby byly odstraněny zbytky DMSO. Dále pak bylo spotřebované kultivační médium vyměňováno po jednom až dvou dnech za čerstvé, vždy vytemperované na 37 °C.

- **Pasážování buněk**

V případě, že kultivační nádoba byla ze 70-80 % porostlá buňkami, přistoupilo se k jejímu pasážování. Nejprve bylo spotřebované médium z kultivační nádoby odlito. Poté byly buňky promyty 5 ml PBS vytemperovaného na laboratorní teplotu. Tím se vymyly z kultivační nádoby zbytky proteinů a vápníku, které neutralizují trypsin. V případě potřeby byl tento krok zopakován. PBS byl z lahve odlit a k buňkám byly přidány 2 ml Trypsin/EDTA vytemperovaného na laboratorní teplotu, který štěpí proteiny nutné pro adhezi buněk. Nechal se působit 2 až 4 minuty. Odlučování buněk ze dna kultivační nádoby bylo sledováno průběžně pod mikroskopem a čas trypsinace případně upraven dle potřeby. Jakmile byla pod mikroskopem pozorována změna tvaru buněk (zakulacování), nádobou bylo poklepáváno o dlaň ruky, aby se dokončil proces odloučení buněk ze dna kultivační nádoby. Po uvolnění většiny buněk bylo do nádoby přidáno 5 ml TNS vytemperovaného na laboratorní teplotu, který slouží k neutralizaci trypsinu. Roztok s buňkami byl rychle přepipetován do sterilní 15 ml centrifugační zkumavky. Kultivační nádoba byla ještě opláchnuta 2 ml média, aby se omezily ztráty buněk. Buňky byly centrifugovány (10 minut, 20 °C, 200 g). Supernatant byl odlit a ke zbylému peletu buněk byly přidány 2 ml kultivačního média. Buňky v něm byly rozsuspendovány a rozděleny na dvě nové kultivační nádoby. K buňkám bylo doplněno kultivační médium tak, aby každá kultivační nádoba obsahovala asi 5 ml. Nádoby byly uloženy do termostatu a opět bylo vyměňováno médium každé 1 až 2 dny, dokud buňky nepokryly 70-80 % dna kultivačních nádob. Poté byly opět pasážovány, přibližně tedy po 7 dnech nebo použity k experimentu.

- **Zamražení buněk**

V případě, že buňkami porostlé kultivační nádoby nemohly být využity, byly buňky uchovány zamražením. Z nádoby porostlé asi z 90 % buňkami bylo odpipetováno médium, buňky byly promyty 5 ml PBS vytemperovaného na laboratorní teplotu. PBS byl odlit a do kultivační nádoby byly přidány 2 ml Trypsin/EDTA. Inkubace s trypsinem probíhala stejně jako u pasážování buněk, tedy po dobu 2-4 minut, kdy byly buňky nejdříve ponechány v klidu a poté se s kultivační nádobou klepalo o dlaň, dokud se buňky neodloučily ze dna nádoby. Bylo přidáno 5 ml média pro neutralizaci trypsinu a veškerý obsah kultivační lahve byl přepipetován do 15 ml centrifugační zkumavky, která byla centrifugována (5 minut, 20 °C, 220 g). Supernatant byl odlit a k peletu buněk byly přidány 2 ml média a rozsuspendovány. Pomalu byly k buňkám přidávány 2

ml zamrazovacího média: 20 % DMSO, 50 % růstového média, 30 % FBS (Tessitore *et al.*, 2010), které bylo dopředu zchlazeno na ledu asi 15 minut. DMSO proniká do buněk, zvyšuje bod mrazu jejich obsahu a chrání je tak před poškozením nízkými teplotami. FBS poskytuje buňkám vyšší koncentraci proteinů, která je potřebná pro přežití zamrazování a rozmrazování buněk. Takto připravená směs byla rozdělena do dvou kryovialek, které byly dány do mrazáku do -80 °C ve speciálním kryoprezervačním stojánku (Stratagene). Druhý den byly kryovialky přemístěny do tekutého dusíku.

8.2 Zpracování vzorků krve

Zkumavka s plnou krví obsahující antikoagulační látku (citrát sodný), která brání aktivaci trombocytů, byla centrifugována (10 minut, 20 °C, 150 g). Tyto podmínky byly v laboratoři stanoveny jako optimální pro získání plazmy bohaté na destičky (PRP). Po centrifugaci byl supernatant neboli PRP odpipetován do mikrozkušavky. Na hematologickém analyzátoru byl změřen obsah trombocytů v získaném vzorku PRP.

- **Aktivace trombocytů trombinem**

Vzorek PRP byl rozpipetován po 500 µl do dvou mikrozkušavek. K prvnímu alikvotu bylo přidáno 0,5 IU trombinu (vypočítáno dle Klement *et al.*, 2008), promícháno a inkubováno 5 minut při laboratorní teplotě. PRP s aktivovanými trombocyty byla znovu centrifugována (30 minut, 20 °C, 1700 g). Supernatant neboli plazma chudá na destičky (PPP) byla odpipetována do mikrozkušavky a naředěna migračním médiem v různém poměru dle prováděného experimentu. Migrační médium bylo předem připraveno naředěním kompletního média Clonetic EGM-2 BulletKit (Lonza, USA) bazálním médiem Clonetic EBM-2 Basal Medium (Lonza, USA) v poměru 1:90 (upraveno dle Wu *et al.*, 2009).

Při měření PPP získané po aktivaci trombocytů byla vždy paralelně měřena PPP bez aktivace trombocytů. Ta byla připravena z druhého 500 µl alikvotu PRP, který byl tedy centrifugován (30 minut, 20 °C, 1700 g) bez přidání trombinu. Supernatant byl odpipetován do mikrozkušavky a naředěn migračním médiem v různém poměru.

- **Lyzace trombocytů zamražením**

Vzorek PRP získaný z plné krve výše popsáním postupem byl pro případ lyzace trombocytů zamražením dále zpracován centrifugací (30 minut, 20 °C, 1700 g). Supernatant byl od peletu trombocytů odpipetován a pelet byl rozsuspendován ve 400 µl migračního média. Takto připravené trombocyty byly zlyzovány zamražením při -80 °C a poté centrifugovány (30 minut, 20 °C, 900 g). Za účelem porovnání migrace při paralelní analýze více vzorků, byl objem migračního média upraven na počet trombocytů naměřených v PRP.

- **Sérum**

Krev pro získání séra byla odebrána do zkumavek bez protisrážlivého činidla, nechána při laboratorní teplotě stát dokud se nevytvořilo koagulum (minimálně 45 minut) a poté centrifugována (20 minut, 15 °C, 1500g).

8.3 Měření buněčné migrace metodou xCELLigence

- **Pokrytí vrchní komůrky fibronectinem (FN)**

Nejdříve bylo 20 μl FN (1 mg/ml) naředěno 980 μl PBS. Na spodní sensorovou stranu jamek vrchní komůrky bylo nanášeno 30 μl připraveného FN. Ten byl pipetován doprostřed každé elektrody tak, aby je celé pokryl. Komůrka byla inkubována 30 minut. Poté byly kapky roztoku FN pipetou odsáty. Komůrka byla otočena a pokryta i z druhé strany 30 μl FN v každé jamce. Inkubace trvala dalších 30 minut a poté byl roztok z jamek pipetou odsát. Při pipetování by se špička pipety neměla dotknout povrchu elektrody a bylo nutné vyvarovat se vzniku bublin v nanášené vrstvě roztoku, aby byl fibronectin rovnoměrně nanášen.

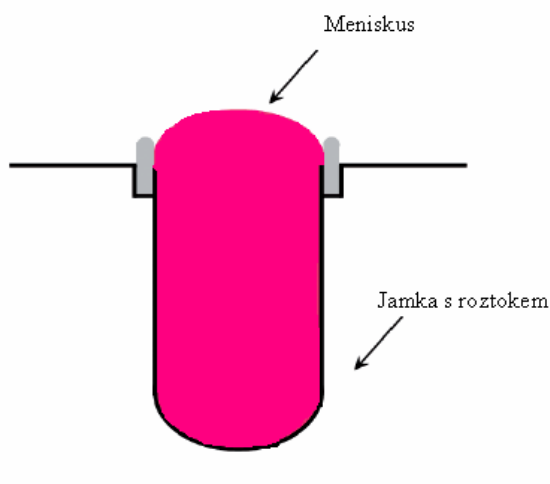
- **Vyhladovění buněk a jejich příprava**

Pro vlastní pokus měření buněčné migrace metodou xCELLigence byly použity endotelové buňky HUVEC maximálně do šesté pasáže. Vždy byla vybrána kultivační nádoba porostlá buňkami ze 60 až 80 %. Z kultivační nádoby bylo odlito médium a buňky promyty 5 ml PBS. K buňkám bylo přidáno 6 ml média bez růstových faktorů (SFM) a nádoby byly inkubovány 4 hodiny při 37 °C a 5 % CO₂. Po této době, kdy buňky vyhladověly, bylo SFM odlito, buňky byly opláchnuty 5 ml PBS a byly trypsinovány 2 ml Trypsin/EDTA po dobu 2 minut. Odlučování buněk ze dna bylo pod mikroskopem kontrolováno a v případě potřeby byla doba trypsinace prodloužena a doplněna klepáním kultivační lahve o dlaň ruky. Trypsin byl zneutralizován 2 ml TNS. Buněčná suspenze byla z kultivační nádoby přepipetována do 15 ml centrifugační zkumavky a nádoba byla ještě promyta 5 ml SFM. Zkumavka s buňkami byla centrifugována (5 minut, 20 °C, 220 g). Supernatant byl odlit a pelet buněk byl rozsuspendován přibližně ve 2 ml SFM.

- **Ekvilibrace destičky CIM-Plate 16 a začátek měření**

Do každé z 16 jamek spodní komůrky bylo napipetováno 165 μl předem připravených roztoků pro chemotaxi a migraci endotelových buněk tak, aby byl v každé jamce vytvořen meniskus (obr. 8). Jednalo se buď o ředící řadu kompletního růstového média v SFM, různé koncentrace růstových faktorů, upravenou plazmu po aktivaci destiček, zlyzované krevní destičky nebo sérum. Vzorky byly pipetovány v duplikátech.

Vrchní komůrka byla nasazena na spodní komůrku a meniskus roztoků každé jamky LC zajistil dostatečnou styčnou plochu se zlatou mikroelektrodou na spodní straně UC po zapadnutí těchto dvou částí do sebe. Do všech jamek UC bylo napipetováno 30 μ l SFM. Destička byla vložena na 1 hodinu do inkubátoru (37 °C) za účelem ekvilibrace (dosažení rovnováhy mezi povrchem elektrody a médiem). Poté byla destička vyjmuta z analyzátoru a do jamek vrchní komůrky bylo k SFM přidáno 100 μ l buněčné suspenze. Následně byla destička opět umístěna do RTCA DP Analyzátoru a bylo změřeno pozadí pomocí RTCA Software (krok 1). Poté byla destička ponechána 30 minut v klidu, aby buňky sedly na dno jamek a po 30 minutách bylo spuštěno měření přístroje (krok 2). Změna impedance zlatých elektrod byla měřena každých 15 minut a po 24 hodinách bylo měření zastaveno a z RTCA Software získán graf zobrazující změnu cell indexu CI v čase.



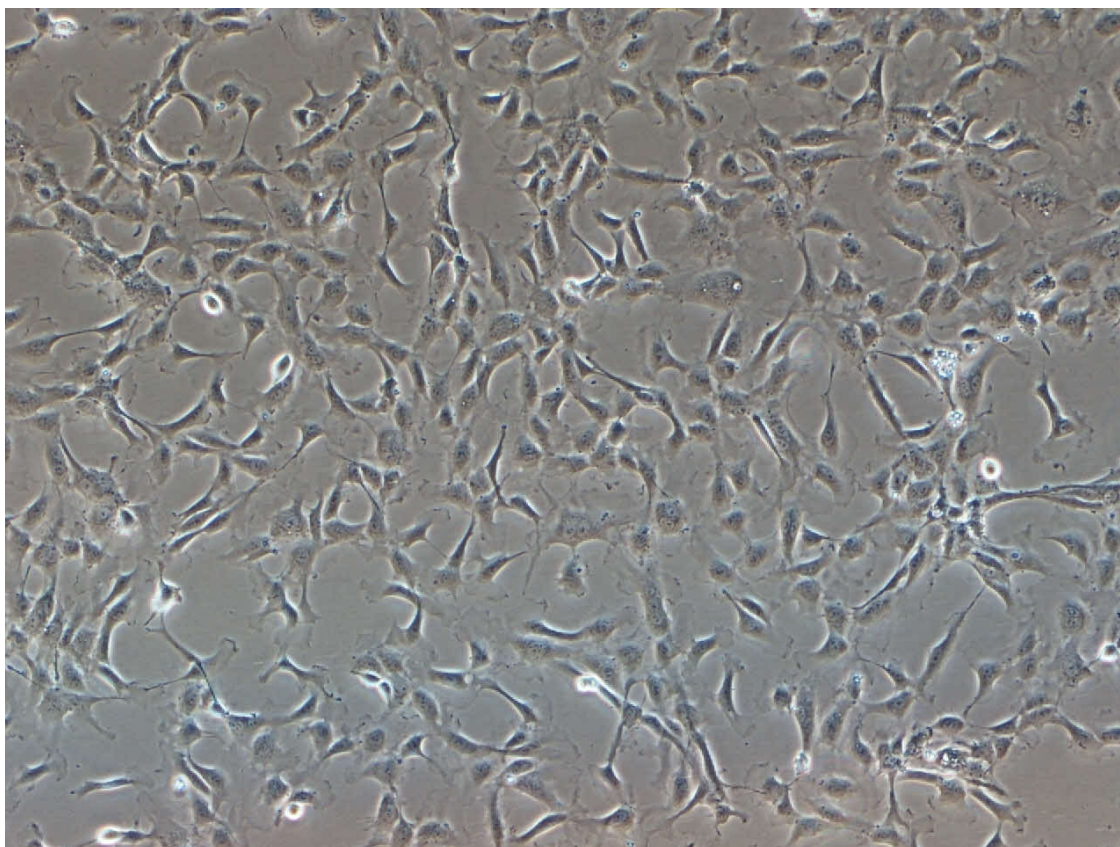
Obr. 8: Znárodnění menisku po napipetování roztoků do LC (upraveno dle xCELLigence RTCA DP Instrument: Flexible real-time cell monitoring, 2009)

9. VÝSLEDKY

9.1 Kultivace buněk HUVEC

Nezbytným prvotním cílem této práce bylo osvojení si postupů a optimalizace techniky kultivace buněk *in vitro*. S buňkami se manipulovalo v laminárním boxu a následně byly kultury pěstovány ve sterilním prostředí v podmínkách vhodných k jejich růstu.

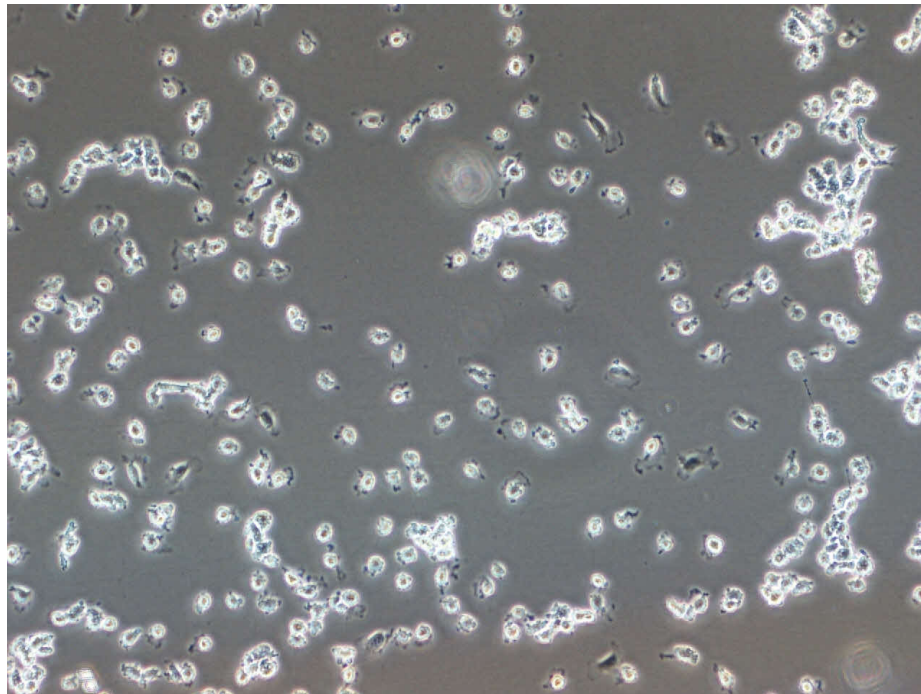
Morfologie HUVEC buněk se vyznačuje polygonálním tvarem, který je typický pro endotelové buňky. Při růstu a následném dělení je jejich tvar protáhlý s mnoha výběžky (obr. 9).



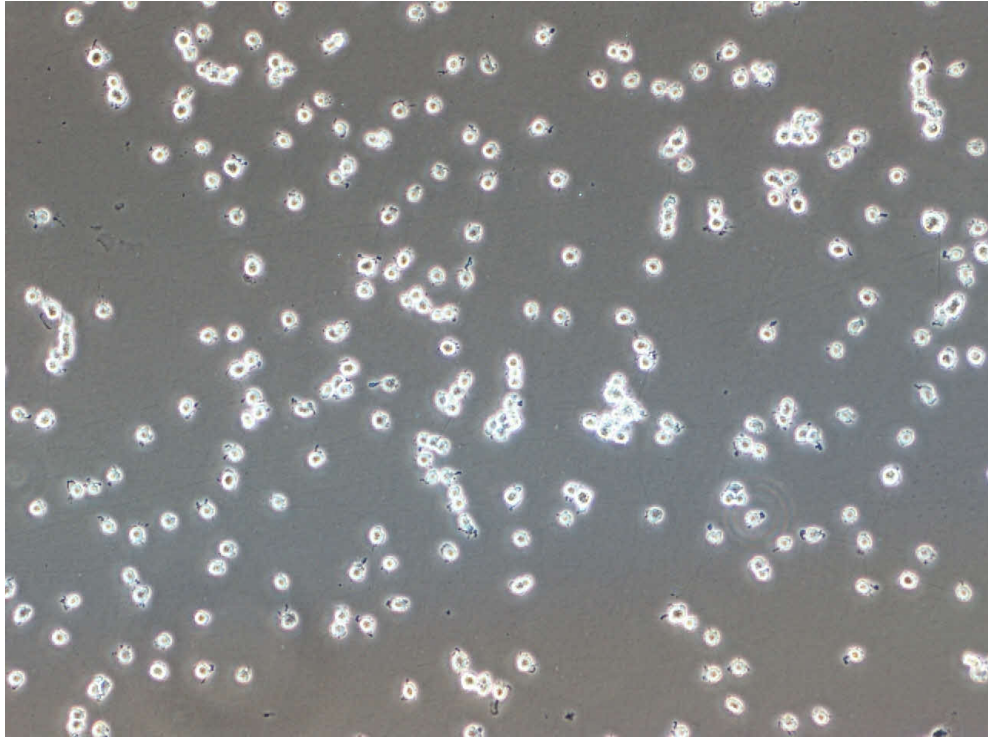
Obr. 9: Morfologie HUVEC buněk (5. pasáž, 8. den kultivace) – typický polygonální tvar endotelových buněk, konfluence přibližně 80 % (zvětšeno 100x)

Při manipulaci s buněčnými kulturami se tvar buněk měnil v závislosti na aktuálních podmínkách. Buňky byly jednak velice citlivé na změnu teploty, pokud byly více jak půl hodiny ponechány za laboratorní teploty mimo jejich optimální kultivační podmínky (37 °C, 5 % CO₂), začaly se zakulacovat. Byly také citlivé

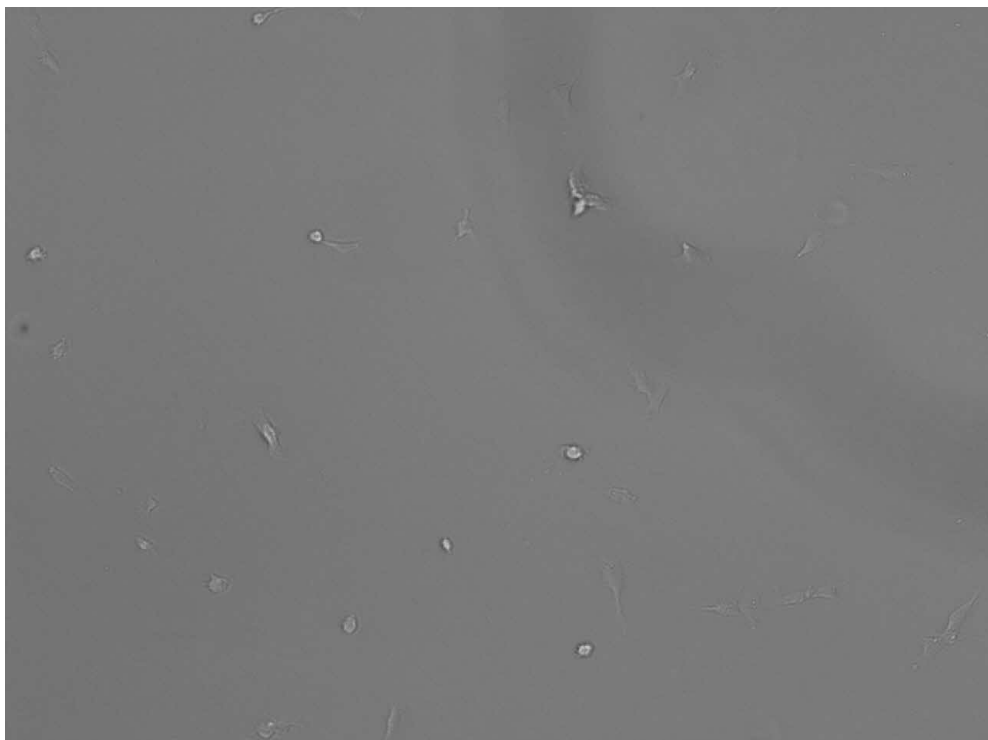
na výměnu média. Po odstranění jimi spotřebovaného a přidání čerstvého média se také částečně zakulatil jejich tvar, i když čerstvé médium bylo vytemperováno na 37 °C. Nejinak tomu bylo po přidání trypsin/EDTA, kde byla naopak změna morfologie buněk očekávána vzhledem k jeho účinkům. Protáhlý tvar buněk s četnými výběžky se začal postupně měnit, až se buňky zcela zakulatily (obr. 10, 11). Tato morfologická změna byla při trypsinaci signálem, že jsou buňky již schopny se odpoutat ode dna kultivační lahve. Ztrypsinované buňky sklizené z jedné lahve a nasazené na nové lahve již po několika hodinách přilnuly ke dnu kultivačních lahví a začaly se natahovat. Jejich pozorování v mikroskopu v prvních dnech po trypsinaci bylo obtížné, buňky byly značně protáhlé a méně plastické, proto se v mikroskopu jevíly jako průhledné. Z tohoto důvodu nebylo snadné odhadnout hustotu kultury. V nových buněčných pasážích, kam byl nasazen větší počet ztrypsinovaných buněk, byly buňky dříve natáhlé a rychleji porostly kultivační lahev oproti pasážím, kde byla hustota buněk menší (obr. 12, 13). To naznačuje, že HUVEC buňky jsou velice citlivé na hustotu kultury a v případě jejich nízkého počtu v kultivační lahvi dochází ke zpomalení jejich růstu, popřípadě až k jejich smrti.



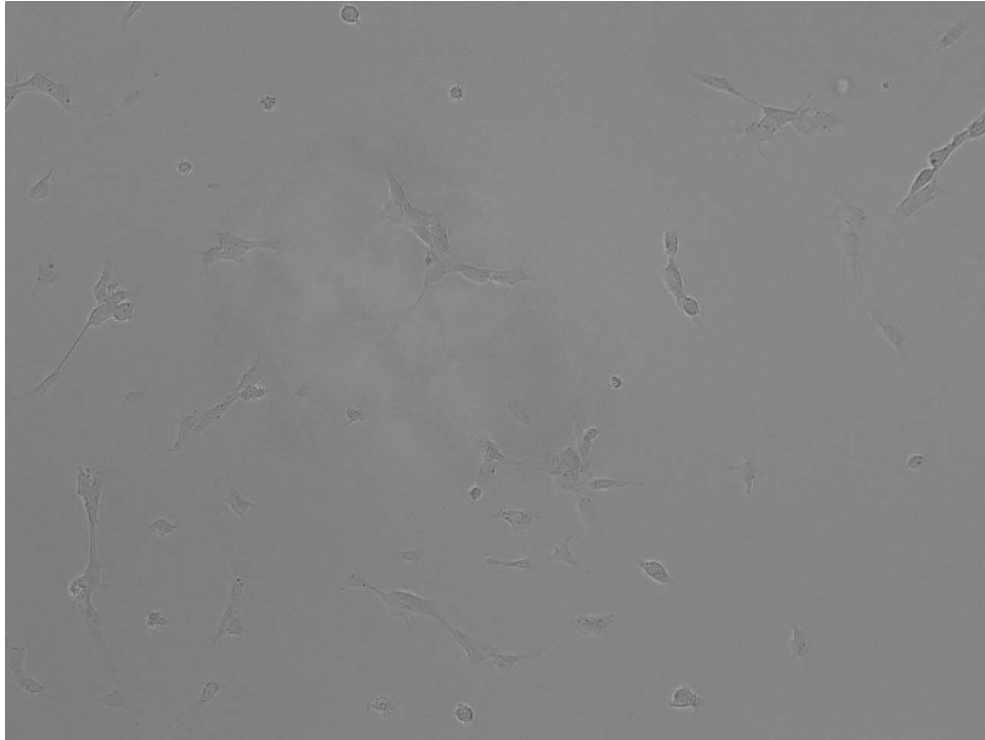
Obr. 10: Změna morfologie HUVEC buněk (5. pasáž) 1 minutu po přidání Trypsin/EDTA (zvětšeno 100x)



Obr. 11: Změna morfologie HUVEC buněk (5. pasáž) 2 minuty po přidání Trypsin/EDTA (zvětšeno 100x)



Obr. 12: Morfologie HUVEC buněk (6. pasáž) 24 hodin po trypsinaci – buněčná kultura s menším počtem buněk vyznačující se menším počtem natažených buněk (zvětšeno 100x)



Obr. 13: Morfologie HUVEC buněk (6. pasáž) 24 hodin po trypsinaci – buněčná kultura s větším počtem buněk vyznačující se větším počtem natažených buněk (zvětšeno 100x)

Jelikož až po několikátýdenní práci s buňkami bylo možné pozorovat nepatrné změny v kulturách, které odrážely stav buněk a jejich potřeby a které na začátku zůstávaly bez povšimnutí, byly prvotní pokusy kultivace buněk jen částečně úspěšné. Stěžejními body, které musely být vyřešeny pro úspěšnou kultivaci HUVEC buněk, byly:

- **Počátek kultivace a hustota primární kultury**

Hustota primární kultury byla podle návodu příslušejícího buňkám vypočítána na základě doporučené hustoty rozsazení HUVEC buněk, která činí 2500 až 5000 buněk/cm². Proto pro kultivační lahve T-25 s efektivní růstovou plochou 25 cm², které byly pro kultivaci používány, a pro buňky dodané v počtu 760 000 byl vypočítán jako optimální počet lahví 6 až 12. Bylo použito 10 lahví, z nichž každá měla tedy denzitu buněk přibližně 3 064 buněk/cm². Jak bylo zjištěno později, hlavní obtíže kultivace byly dány zvolenou hustotou, která nebyla dostačující. Buňky byly pěstovány do potřebné hustoty (kolem 80 %) pro jejich pasážování 14 dní i déle místo deklarovaných 5 až 9 dnů. To potvrzuje již zmíněnou vlastnost HUVEC buněk, že jsou velice citlivé na hustotu kultury a v případě jejich nízkého počtu v buněčné kultuře dochází

ke zpomalení jejich růstu. Tímto bylo zřejmě ovlivněno také chování buněk ve vyšších pasážích, konkrétně v páté a šesté, kdy bylo obtížné buňky ztrypsinovat a sklizení buněk ze dna kultivačních nádob muselo být prováděno prodlouženou nebo dokonce opakovanou trypsinací.

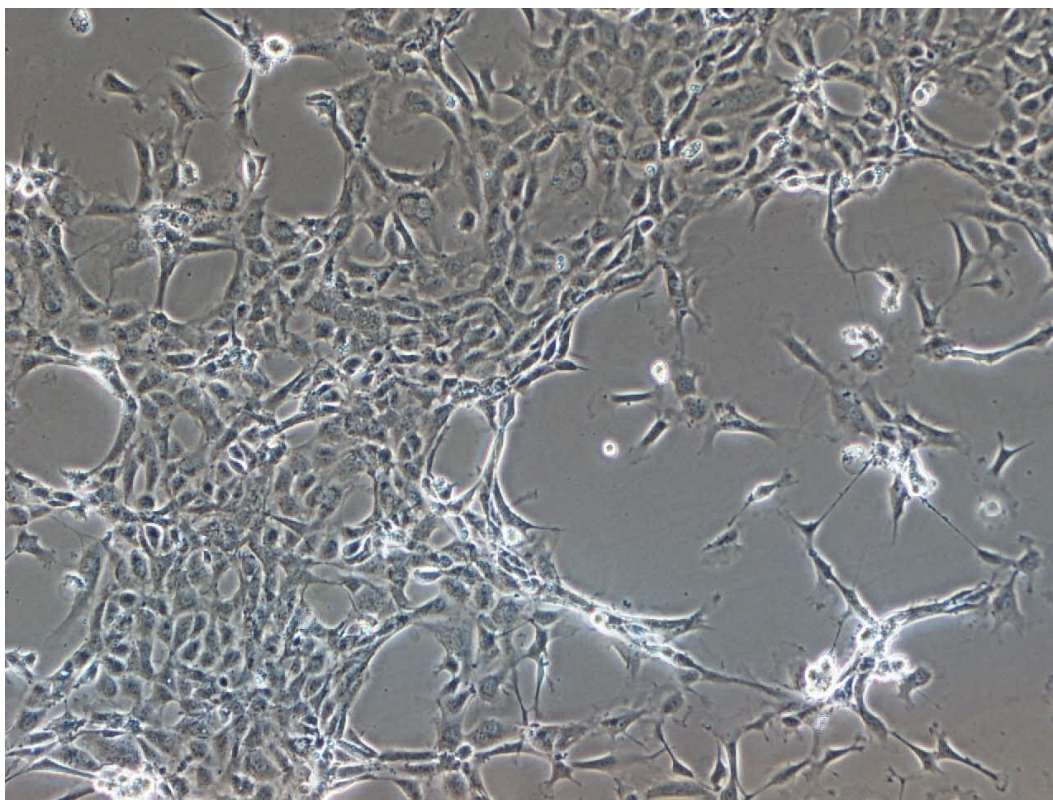
V dalším pokusu, tentokrát s nově dodanými buňkami v počtu 910 000, byly zvoleny pro rozsazení tohoto počtu buněk pouze 3 kultivační nádoby. Každá tedy obsahovala přibližně 12 133 buněk/cm². Tento počet se ukázal jako vhodný, jelikož kultivační nádoba byla porostlá na požadovaných 80 % přibližně za 7 dní.

- **Pasážování buněk**

Jelikož všechny buněčné linie, kromě nádorově transformovaných, mají omezenou životnost, tj. buňky stárnou a po určité době se přestávají dělit, HUVEC buňky byly pěstovány maximálně do 6. pasáže, aby byla jejich kondice dostačující pro vlastní měření buněčné migrace.

Uváděná doba, za kterou se HUVEC buňka rozdělí na dvě, je 12 až 48 hodin, proto bylo nutné každých cca 7 dní buňky pasážovat, zamrazit nebo použít pro měření. Muselo být správně odhadnuto, kdy je již kultura dostatečně hustá a tedy vhodná pro další manipulaci. Tyto zkušenosti byly opět získány až po nějaké době práce s buňkami.

Dalším problémem, který bylo nutné vyřešit, byla tendence HUVEC buněk tvořit shluky (obr. 14), což je pro tyto buňky typické (Tessitore *et al.*, 2010). Buněčná kultura tak nebyla rovnoměrně rozprostřena na dně kultivační nádoby a buňky se těsnaly pouze na několika místech. Ve středu těchto agregátů byl růst buněk zastaven v důsledku kontaktní inhibice a buňky neměly možnost se dělit. Kultury s buněčnými shluky v dalších pasážích pomaleji rostly oproti kulturám s rovnoměrněji rozdělenými buňkami. To bylo zřejmě dáno tím, že buňky vyskytující se v agregátech se stávají více závislé jedna na druhé a při jejich rozdělení na dvě lahve, kdy jsou agregáty rozrušeny a buňky od sebe oddáleny, nejsou v dostatečné hustotě. Proto se muselo vždy včas odhadnout, kdy přistoupit pouze k tzv. rozprostření buněk na dně nádoby tím, že buňky byly ztrypsinovány stejným postupem jako při klasickém pasážování a po centrifugaci byl rozsuspendovaný pelet umístěn opět na jednu lahev místo dvou. Tím byly agregáty buněk rozděleny a buňky lépe rozprostřeny, což jim umožnilo další růst.



Obr. 14: HUVEC buňky (5. pasáž, 8. den kultivace) – znázornění tendence HUVEC buněk tvořit shluky (zvětšeno 100x)

9.2 Měření buněčné migrace metodou xCELLigence

V této práci byla zkoumána migrace buněk závislá na trombocytárních chemoatraktantech, mezi které patří např. VEGF, FGF, IGF, EGF aj. Migrace je zprostředkována vazbou těchto růstových faktorů na příslušné receptory na povrchu buněk. Tato vazba aktivuje specifickou signální cestu, která vede k reorganizaci cytoskeletu, modulaci buněčné adheze a polarizaci buňky a následné migraci. Vliv chemokinů na migraci buněk je závislý na množství těchto látek a na buněčném typu, na míře exprese receptorů a efektivní koncentraci chemokinů.

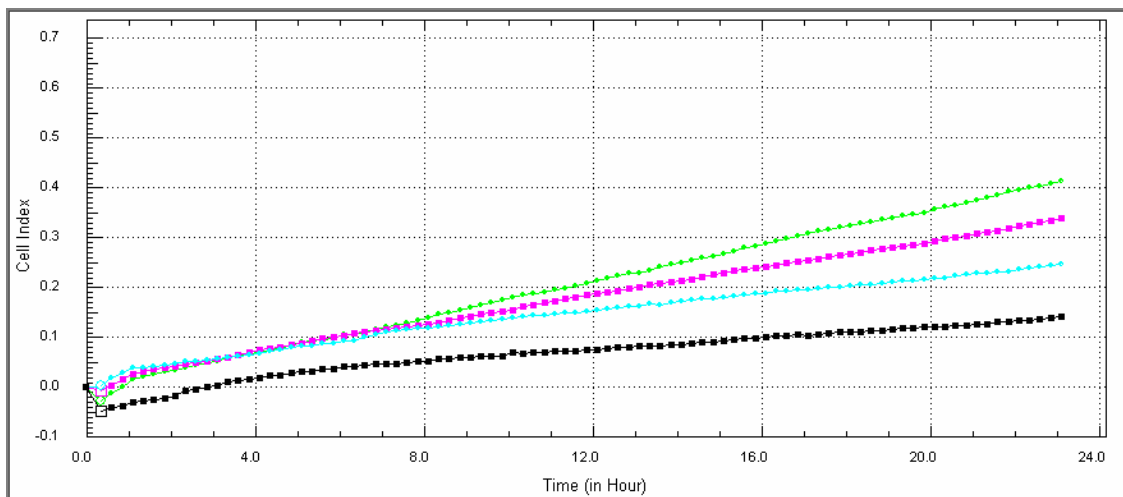
Všechna měření migrace HUVEC buněk byla koncipována tak, aby byla buněčná migrace zprostředkována trombocytárními chemoatraktanty pro endotelové buňky. Tyto chemoatraktanty byly od endotelových buněk odděleny pórovitou membránou s integrovanými zlatými mikroelektrodami. Prostřednictvím impedance převedené na hodnotu buněčného indexu (cell indexu) zaznamenávaly elektrody kontinuálně v čase míru migrace buněk přes membránu. Rostoucí migrace buněk měla za následek zvýšení cell indexu.

Za účelem seznámení se s experimentem a pro ověření nutnosti použití fibronektinu pro pokrytí obou stran dna vrchní komůrky byla míra buněčné migrace HUVEC buněk za chemoatraktanty a růstovými faktory trombocytů nejdříve zkoumána při různých koncentracích kompletního média obsahujícího trombocytární faktory uvedené v tab. III. Dále byla zkoumána migrace endotelových buněk v závislosti na koncentraci chemotaktického faktoru VEGF a bFGF. Migrace endotelových buněk byla měřena také za vhodně upravenými vzorky aktivovaných nebo lyzovaných trombocytů nebo za plazmou. Hlavním cílem práce bylo optimalizovat tuto metodu pro účely stanovení vztahu mezi obsahem trombocytů zdravých dárců a onkologických pacientů a to právě pomocí míry migrace HUVEC buněk. Následující grafy a komentáře popisují jednotlivá měření, která byla prováděna vždy v duplikátech.

- **Vliv koncentrace kompletního média na migraci HUVEC buněk**

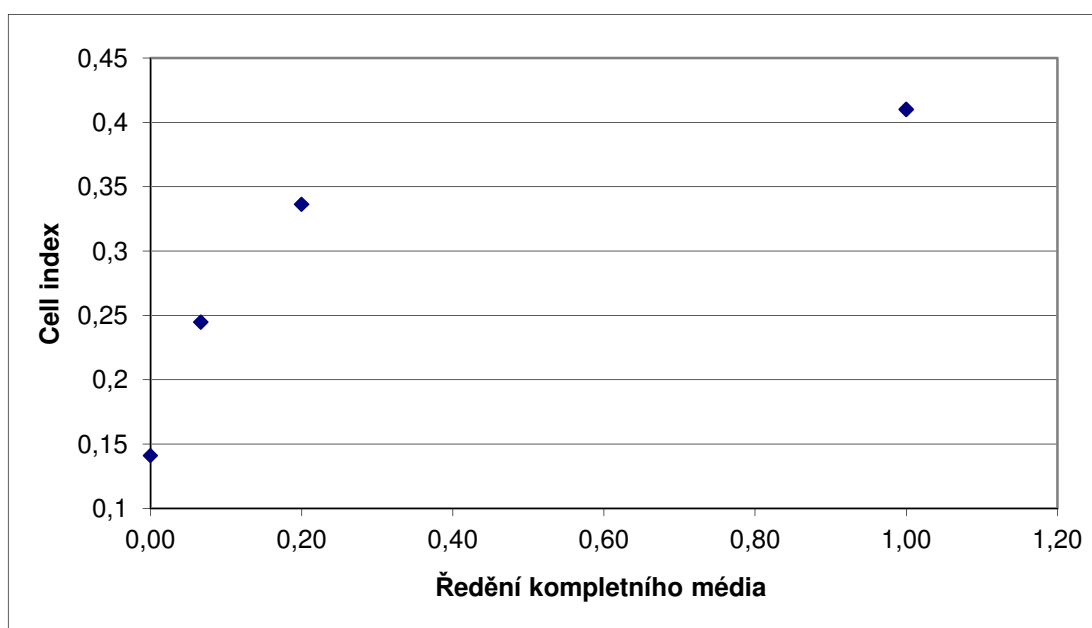
Pro ověření migrace endotelových buněk byly použity buňky ze 3. pasáže v množství jedné kultivační lahve s přibližnou konfluencí 70-80 % na jednu migrační destičku a kompletní médium, které obsahovalo trombocytární růstové faktory a chemoatraktanty pro endotelové buňky. Složení kompletního média mělo za následek migraci HUVEC buněk za chemoatraktanty v něm obsaženými.

Bylo použito neředěné kompletní médium, které obsahovalo nejvyšší koncentraci trombocytárních faktorů, dále bylo použito kompletní médium naředěné bazálním médiem bez růstových faktorů (SFM) v poměru 1:5 a 1:15. Jako negativní kontrola bylo použito SFM, které neobsahovalo žádné trombocytární faktory. Jak je patrné z grafu č. 1a, cell index a tedy buněčná migrace měla během měření nejstrmější nárůst pro kompletní médium s největší koncentrací chemoatraktantů, strmost křivek se snižovala s rostoucím ředěním kompletního média a tedy s nižší koncentrací trombocytárních faktorů a nejnižší cell indexy byly pozorovány pro SFM. Tímto měřením byla ověřena potřeba specifických chemoatraktantů pro migraci endotelových buněk, která se zvyšuje s rostoucí koncentrací těchto látek, což je přehledně zaznamenáno v grafu č. 1b znázorňující end-point cell index v závislosti na ředění kompletního média ve 24. hodině.



- Kompletní médium
- Kompletní médium naředěné SFM 1:5
- Kompletní médium naředěné SFM 1:15
- SFM

Graf č. 1a: Vliv ředění kompletního růstového média na migraci HUVEC buněk (průměr z duplikátů)



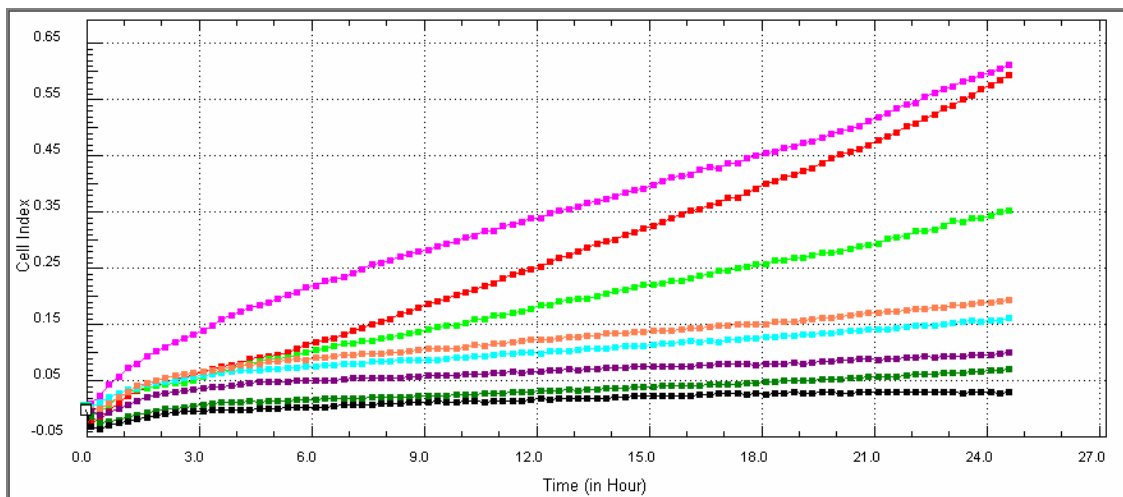
Graf č. 1b: Závislost cell indexu na ředění kompletního média – vyhodnocení migrace end-point (cell index ve 24. hodině)

- **Vliv fibronektinu na migraci HUVEC buněk**

Při měření buněčné migrace v migrační destičce je potřeba, aby byla mikroelektroda destičky pokryta některým z proteinů ECM, který zprostředkuje adhezi buněk k elektrodové straně membrány a podpoří tak tvorbu impedančního signálu. Pro většinu buněk a tedy i pro námi používané buňky HUVEC je právě fibronektin vhodným proteinem zprostředkovávajícím tuto adhezi. Navíc pokrytím elektrod exogenním proteinem se předejde vytváření gradientu proteinů ECM v měřených roztocích a tím ovlivnění migrace buněk.

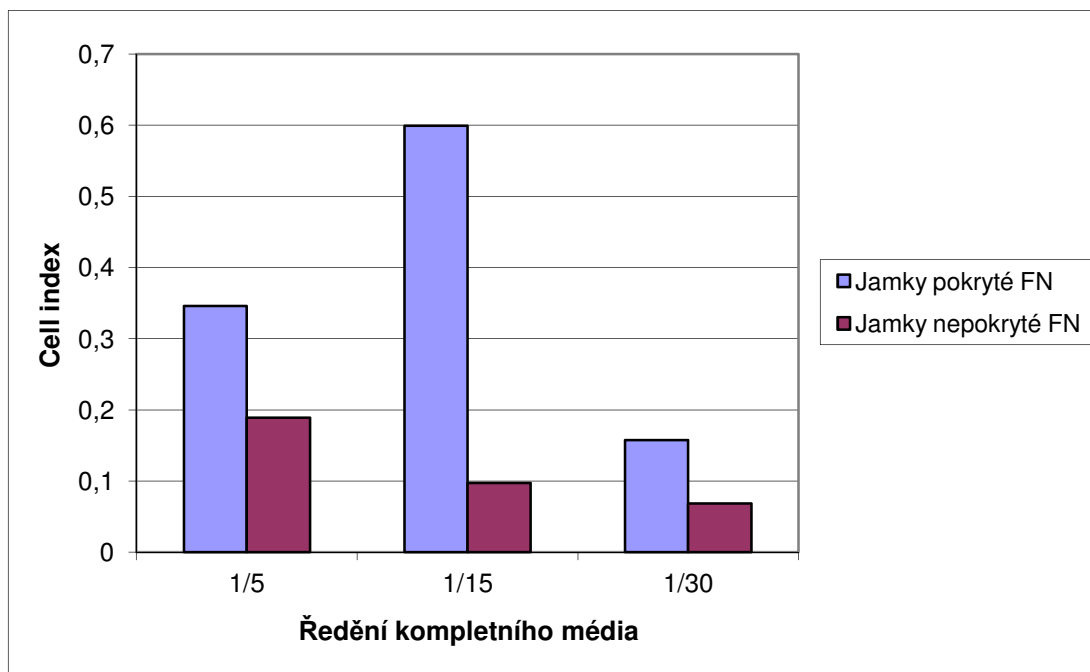
Tyto poznatky byly ověřovány měřením za použití buněk ze 4. pasáže v množství dvou kultivačních lahví s přibližnou konfluencí každé lahve 60-70 % na jednu migrační destičku. Jako roztoky obsahující chemoatraktanty pro endotelové buňky byly použity neředěné kompletní médium, SFM a kompletní médium ředěné SFM v poměru 1:5, 1:15 a 1:30. Pro každé ředění kompletního média byly měřeny vždy dvě varianty, kdy jamky jednoho duplikátu byly pokryty fibronektinem a druhé nikoliv. Jako pozitivní kontrola sloužilo kompletní médium a jako negativní kontrola SFM.

Graf č. 2a znázorňuje průběh křivek buněčné migrace pro zmíněná ředění kompletního média a to vždy v jamkách pokrytých fibronektinem a v jamkách bez fibronektinu. Z porovnání end-point cell indexu ve 24. hodině jamek pokrytých fibronektinem a jamek bez fibronektinu je u všech ředění kompletního média patrné, že hodnoty cell indexu pro jamky pokryté fibronektinem jsou prokazatelně vyšší (graf č. 2b). Závěrem z tohoto měření je, že nutnost pokrytí obou stran vrchní komůrky migrační destičky fibronektinem je žádoucí a zlepšuje migraci endotelových buněk.



- Kompletní médium naředěné SFM 1:15 (s FN)
- Kompletní médium (s FN)
- Kompletní médium naředěné SFM 1:5 (s FN)
- Kompletní médium naředěné SFM 1:5 (bez FN)
- Kompletní médium naředěné SFM 1:30 (s FN)
- Kompletní médium naředěné SFM 1:15 (bez FN)
- Kompletní médium naředěné SFM 1:30 (bez FN)
- SFM

Graf č. 2a: Vliv pokrytí jamky fibronectinem na migraci HUVEC buněk (průměr z duplikátů)

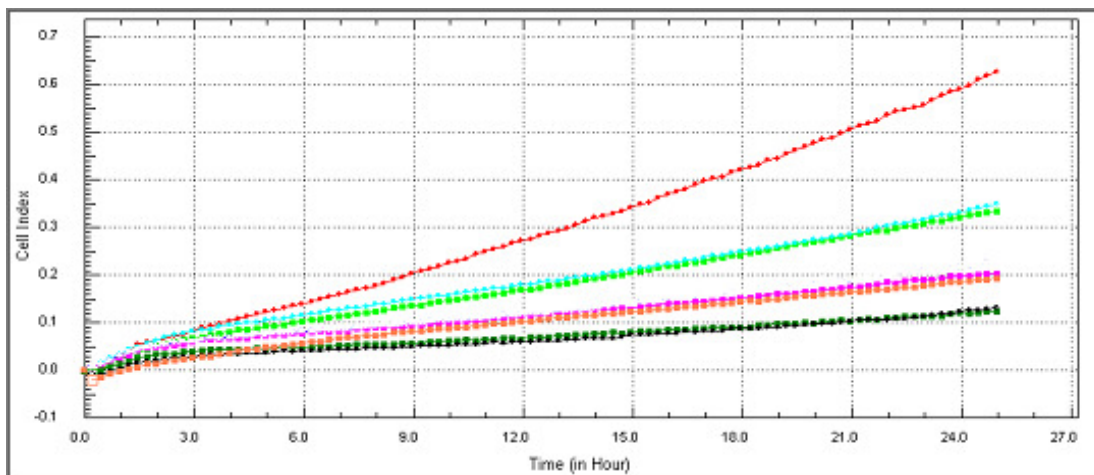


Graf č. 2b: Poměr hodnot cell indexu jamek pokrytých fibronectinem a nepokrytých fibronectinem pro různá ředění kompletního média – vyhodnocení end-point cell indexu ve 24. hodině

- **Vliv koncentrace VEGF na migraci HUVEC buněk**

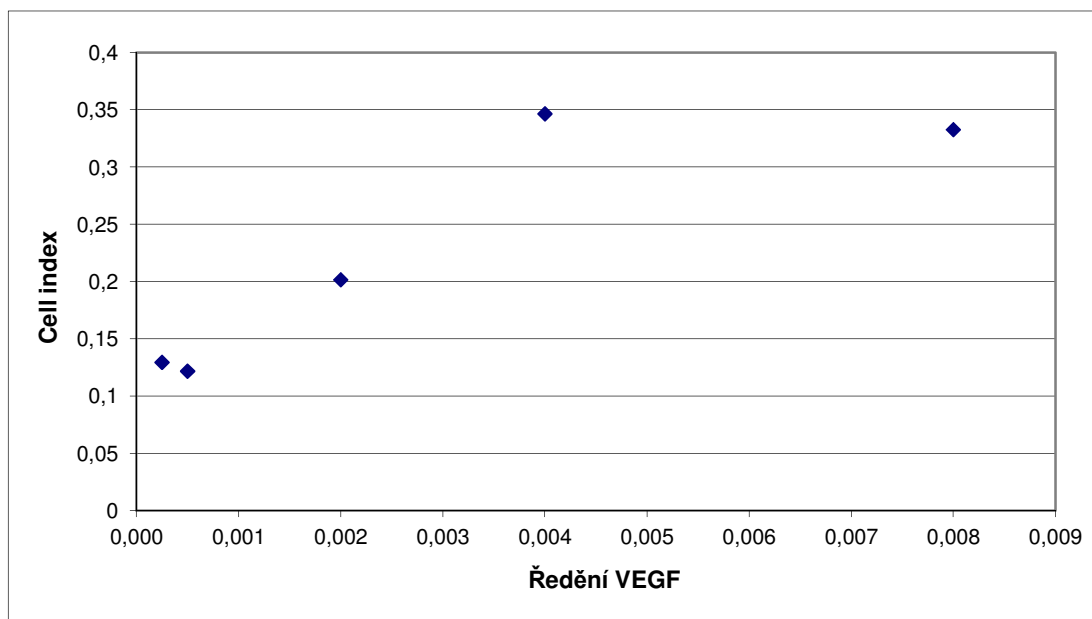
Vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF je jedním z nejznámějších proangiogenních faktorů obsažených v α -granulích trombocytů. Jeho schopnost stimulovat migraci endotelových buněk byla prokázána měřením cell indexu pro ředění VEGF tzv. migračním médiem v poměru 1:125, 1:250, 1:500, 1:2000 a 1:4000 (graf č. 3a). Migrační médium bylo připraveno ředěním kompletního média pomocí SFM. Důvodem použití migračního média byl fakt, že HUVEC buňky jsou citlivé na dlouhodobější odstranění sérových a růstových faktorů, ke kterým nemají během čtyřhodinového hladovění v SFM přístup. Jelikož po hladovění buněk následuje dvacetičtyřhodinové měření migrace, je důležitá alespoň minimální koncentrace sérových a růstových faktorů z kompletního média, aby bylo zajištěno přežití buněk a jejich dostatečná kondice pro migraci. Musí být ale zvolena taková koncentrace, aby nebyla ovlivněna migrace buněk za námi sledovanými trombocytárními faktory. Pro experimenty této práce bylo použito ředění kompletního média SFM 1:90, které bylo stanoveno na základě literatury (Wu *et* Zhu, 2009). Jako pozitivní kontrola sloužilo kompletní médium a jako negativní kontrola SFM. V tomto měření byly použity HUVEC buňky z 5. pasáže v počtu dvou kultivačních lahví s konfluencí přibližně 70-80 % na jednu migrační destičku.

Jak je z grafu č. 3a patrné, v případě ředění VEGF migračním médiem 1:4000, 1:2000 a rovněž 1:500 byly hodnoty cell indexu srovnatelné se SFM (negativní kontrolou) a při těchto vysokých ředěních buňky téměř nebo vůbec nemigrovaly. Pro vyšší koncentraci VEGF (ředění 1:125 a 1:250) byla migrace buněk již prokazatelná, nicméně byla nižší než pro kompletní médium. To je dáno tím, že obsahuje kromě VEGF v poměru 1:1000 také další růstové faktory, které podporují migraci buněk. Vyhodnocením end-point závislosti cell indexu na ředění VEGF ve 24. hodině (graf č. 3b) bylo určeno ředění 1:250 jako dostačující pro migraci HUVEC buněk. Při této koncentraci VEGF je systém saturován a při vyšších koncentracích tohoto faktoru již nedochází ke zvýšení migrace buněk.



- Kompletní médium
- VEGF v migračním médiu 1:125
- VEGF v migračním médiu 1:250
- VEGF v migračním médiu 1:500
- SFM
- VEGF v migračním médiu 1:2000
- VEGF v migračním médiu 1:4000

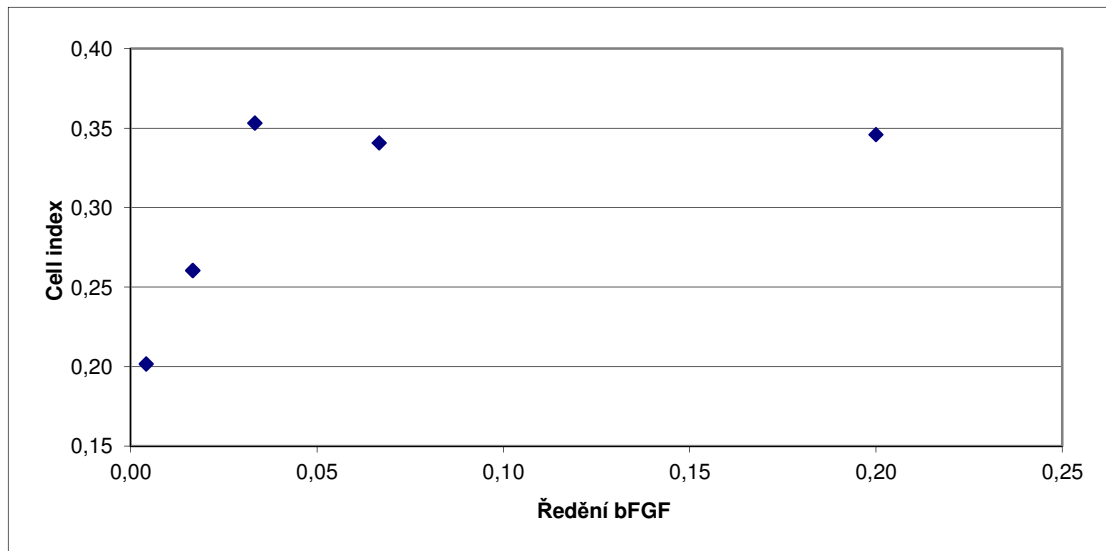
Graf č. 3a: Vliv koncentrace VEGF na migraci HUVEC buněk (průměr z duplikátů)



Graf č. 3b: Závislost cell indexu na ředění VEGF – vyhodnocení migrace end-point (cell index ve 24. hodině)

- **Vliv koncentrace bFGF na migraci HUVEC buněk**

Bazický fibroblastový růstový faktor bFGF patří mezi proangiogenní faktory, mezi jehož funkce patří stimulace migrace endotelových buněk stejně jako u VEGF. Stejně jako pro VEGF byla vyhodnocena koncentrace bFGF, která je dostačující pro migraci HUVEC buněk. Byla měřena migrace pro ředění bFGF migračním médiem 1:5, 1:15, 1:30, 1:60 a 1:240 a pro tuto analýzu byly použity HUVEC buňky z 6. pasáže v počtu jedné kultivační lahve s konfluencí přibližně 60-70 % na jednu migrační destičku. Vyhodnocením end-point závislosti cell indexu na ředění bFGF ve 24. hodině (graf č. 4) bylo určeno ředění 1:30 jako dostačující pro migraci HUVEC buněk. Při této koncentraci bFGF je systém saturován a při vyšších koncentracích toho faktoru již nedochází ke zvýšení cell indexu.

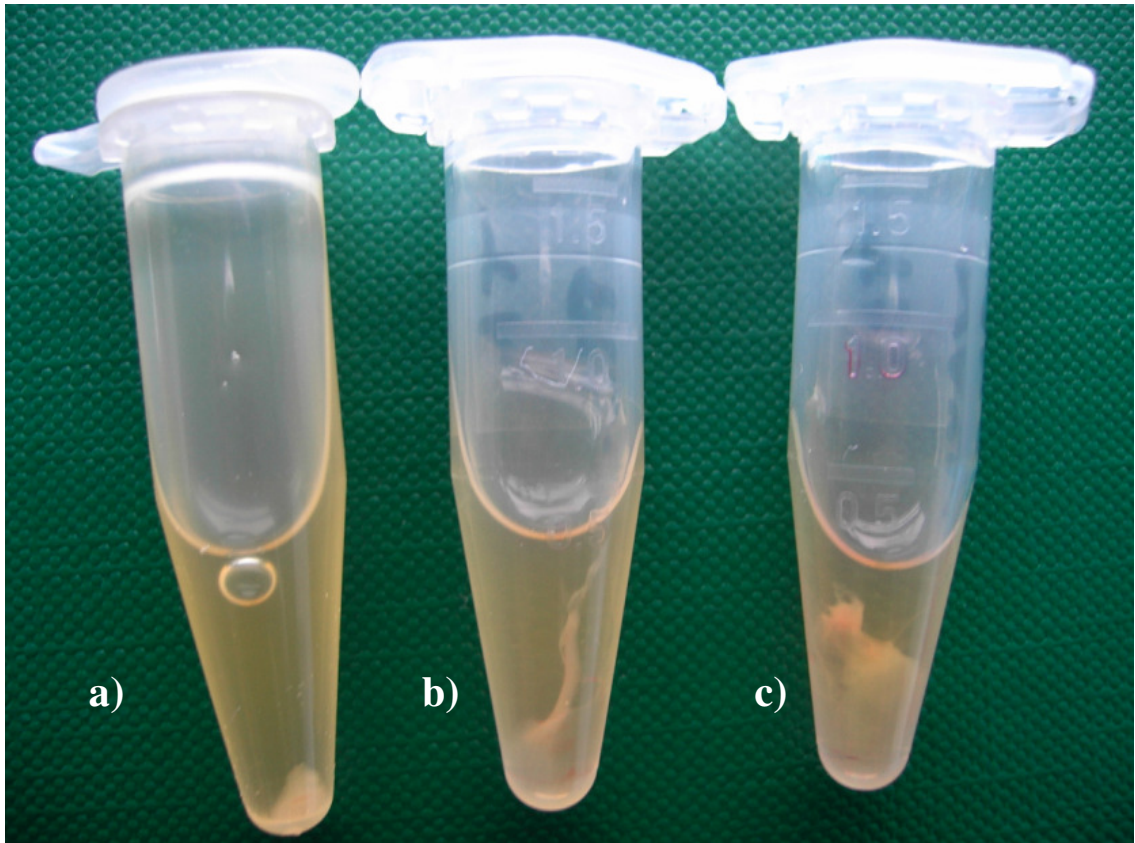


Graf č. 4: Závislost cell indexu na ředění bFGF – vyhodnocení migrace end-point (cell index ve 24. hodině)

- **Porovnání migrace HUVEC buněk za trombocytárními faktory po aktivaci destiček trombinem, po lyzaci trombocytů zamražením a za faktory obsaženými v séru**

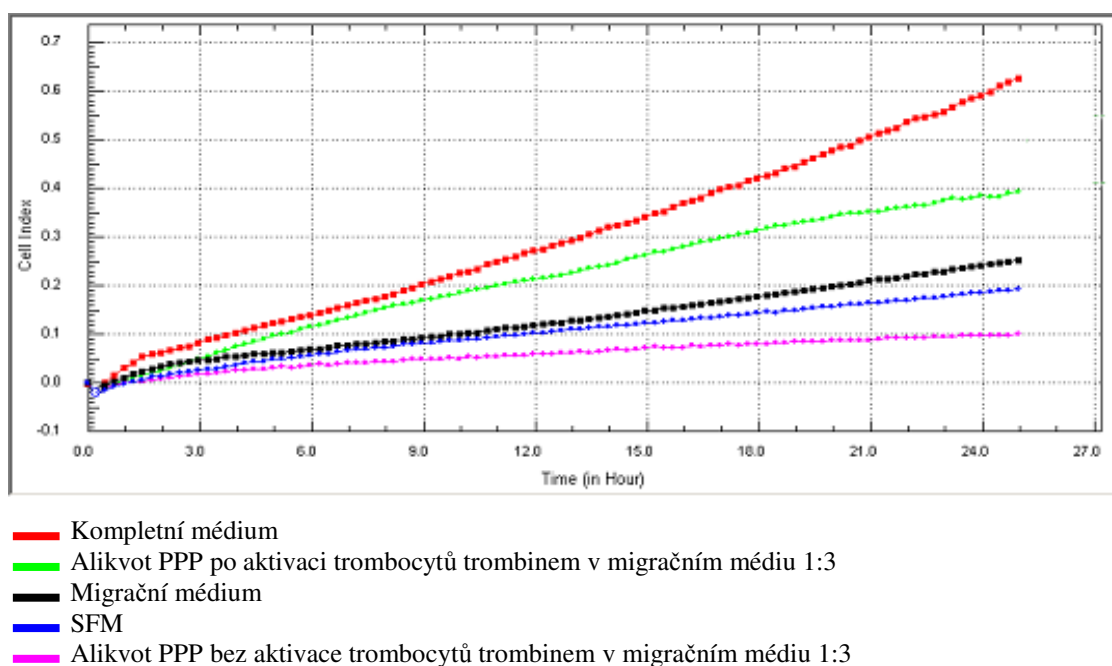
Při zkoumání migrace HUVEC buněk za chemoatraktanty uvolněnými z trombocytů získaných ze vzorků krve pacientů byly použity tři typy vzorků. Jednalo se o plazmu chudou na destičky (PPP) s obsahem trombocytárních faktorů uvolněných z destiček po jejich předchozí aktivaci trombinem, dále o migrační médium, do kterého byly uvolněny trombocytární chemoatraktanty po lyzaci trombocytů zamražením v tomto médiu a o vzorky séra, které obsahují rovněž trombocytární faktory.

Pro aktivaci trombocytů v tomto pokusu byl použit trombin, proteáza, která přeměňuje solubilní plazmatický protein fibrinogen na nerozpustný polymer fibrin. Jelikož také aktivuje trombocyty prostřednictvím PAR-1 a PAR-4 receptorů a řady dalších receptorů vyskytujících se na povrchu trombocytů (De Cristofaro *et* De Candia, 2003), byl vhodný pro uvolnění obsahu granul. Po přidání trombinu do prvního alikvotu izolované PRP, inkubaci a centrifugaci se v souvislosti s jeho vlastnostmi vytvořila ve vzorku fibrinová síť (obr. 15b,c) zachycující aktivované trombocyty, jejichž obsah byl uvolněn do plazmy. Supernatant byl od sraženiny odpipetován a byla získána PPP bohatá na chemotaktické látky a růstové faktory uvolněné z trombocytů. Ve druhém alikvotu PRP zpracovaného bez přidání trombinu se po centrifugaci vytvořil na dně mikrozkušavky pelet neaktivovaných trombocytů (obr. 15a). Supernatant byl odpipetován a získaná PPP neobsahovala chemoatraktanty z granul trombocytů a byla použita jako negativní kontrola. Nicméně jelikož se trombocyty aktivované trombinem mohou chovat odlišně z toho důvodu, že u různých dárců se mohou vyskytovat odlišné typy receptorů pro trombin. Tím může být aktivace trombocytů ovlivněna a tedy závislá na počtu a typu receptorů pro trombin (De Cristofaro *et* De Candia, 2003). Proto byla pro uvolnění obsahu granul trombocytů použita pouhá lyzace trombocytů zamražením, která není nijak závislá na množství a typech receptorů na povrchu trombocytů. Migrace endotelových buněk za lyzátem trombocytů pak tedy pravděpodobně lépe reflektuje skutečný obsah chemotaktických látek a růstových faktorů v trombocytech.



Obr. 15: Příprava vzorků: a) PRP bez přidání trombinu, neaktivované trombocyty po centrifugaci tvořící pelet na dně mikrozkušavky, b) a c) PRP po přidání trombinu a centrifugaci s vytvořenou fibrinovou sítí

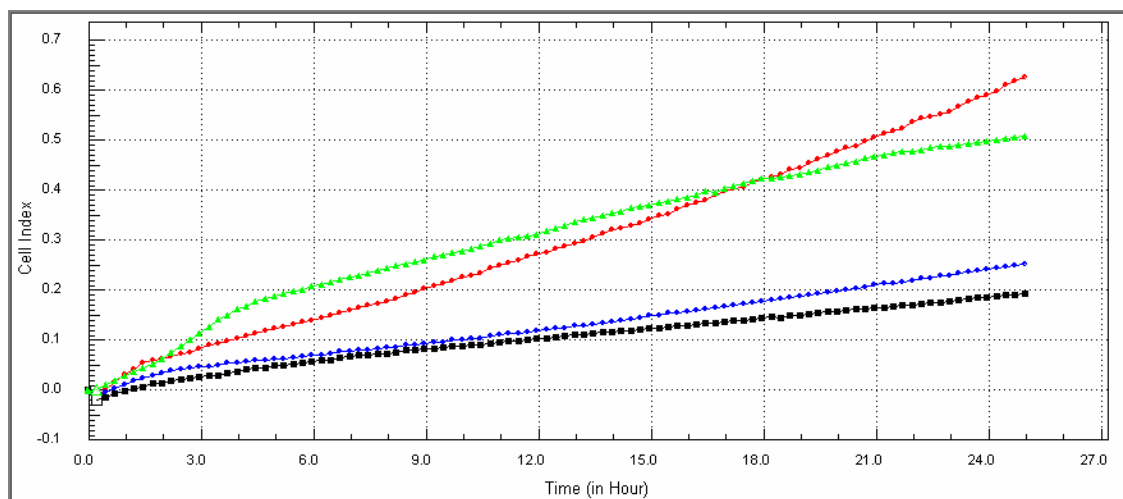
Pro měření zmíněných vzorků byly použity HUVEC buňky z 5. pasáže v počtu dvou kultivačních lahví s konfluencí přibližně 60-70 % na jednu migrační destičku. Všechny vzorky byly v různém poměru naředěny migračním médiem. PPP bohatá na chemotaktické látky a růstové faktory uvolněné z trombocytů (po jejich aktivaci trombinem) a PPP neobsahující chemoatraktanty uvolněné z granul trombocytů (bez aktivace trombocytů trombinem) získané z jednoho vzorku byly naředěny migračním médiem vždy ve stejném poměru, buď 1:3 nebo 1:5. Jako pozitivní kontrola sloužilo kompletní médium a jako negativní kontrola SFM. Jak je patrné z grafu č. 5, pro alikvot PPP po aktivaci trombocytů trombinem v migračním médiu 1:3 byl cell index prokazatelně vyšší než pro alikvot PPP bez aktivace trombocytů trombinem. Z toho je zřejmé, že aktivací trombocytů dochází k uvolnění chemoatraktantů endotelových buněk, které zvyšují jejich migraci.



Graf č. 5: Měření migrace HUVEC buněk za alikvoty PPP po aktivaci trombocytů trombinem a bez aktivace trombocytů (průměr z duplikátů)

Výsledky měření migrace HUVEC buněk za migračním médiem obsahujícím uvolněné trombocytární chemoatraktanty po lyzaci trombocytů zamražením v tomto médiu ve srovnání s kompletním médiem, migračním médiem a SFM jsou vyneseny v grafu č. 6. Můžeme vidět, že po proměření migračního média s trombocytárními chemoatraktanty po lyzaci trombocytů je signál cell indexu na úrovni kompletního

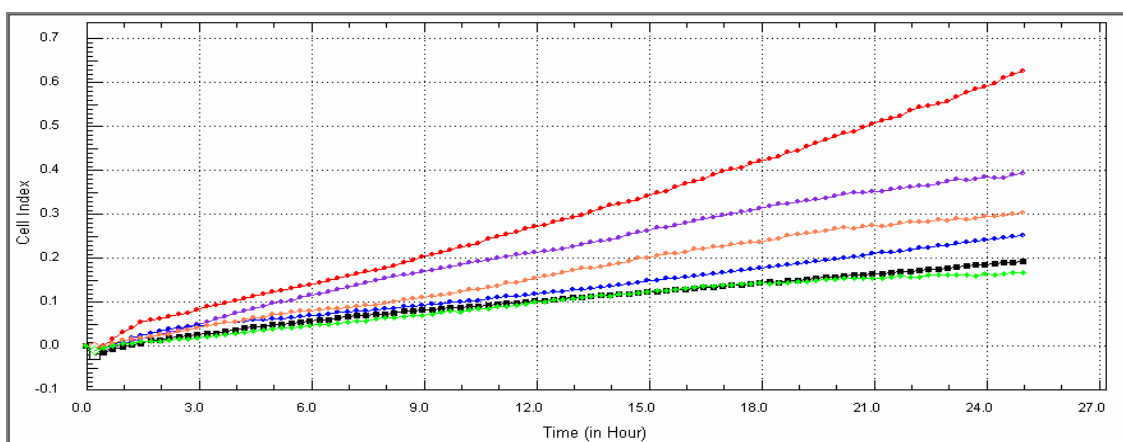
média a lyzace je tedy pro analýzu obsahu trombocytů vhodným postupem a byla dále používána pro úpravu vzorků zdravých dárců a onkologických pacientů.



- Migrační médium s obsahem lyzovaných trombocytů
- Kompletní médium
- Migrační médium
- SFM

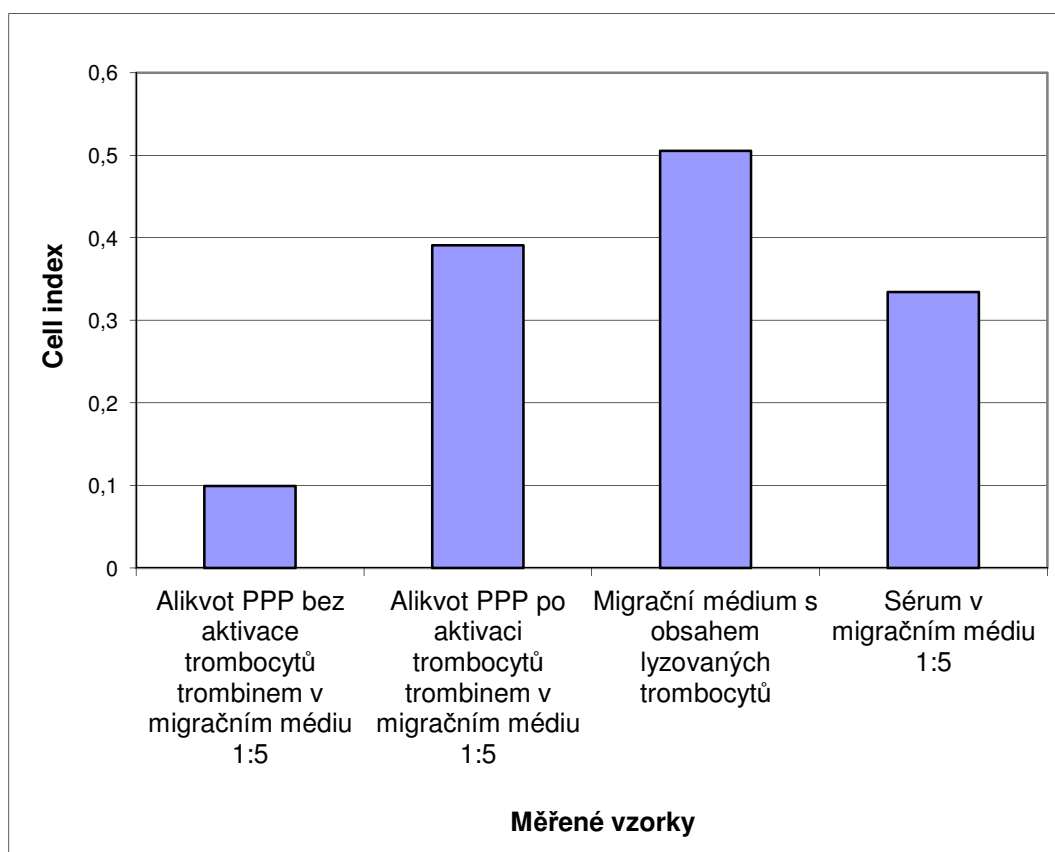
Graf č. 6: Měření migrace HUVEC za trombocytárními faktory uvolněnými po jejich lyzaci zamražením (průměr z duplikátů)

Pro měření migrace HUVEC buněk za chemoatraktanty obsaženými v séru bylo použito sérum naředěné migračním médiem v poměru 1:5 a sérum neředěné migračním médiem. Jako pozitivní kontrola bylo opět použito kompletní médium a jako negativní kontrola SFM. Z grafu č. 7 je patrné, že cell indexy čistého séra jsou srovnatelné se SFM. U séra s přidávkem migračního média 1:5 se hodnota cell indexu a tedy i migrace buněk zvýšila, ale v porovnání s cell indexy pro alikvot PPP po aktivaci trombocytů trombinem v migračním médiu 1:5 byla migrace buněk v séru nižší. Závislost cell indexu na vyšetřovaném materiálu lépe zachycuje graf č. 8, který vyhodnocuje end-point migraci ve 24. hodině. Nejnižší migrace buněk byla zaznamenána pro alikvot PPP bez aktivace trombocytů trombinem v migračním médiu 1:5, hodnoty cell indexu se postupně zvyšovaly pro sérum v migračním médiu 1:5, alikvotu PPP po aktivaci trombocytů trombinem v migračním médiu 1:5 a nejvyšší cell index byl pozorován pro migrační médium s obsahem lyzovaných trombocytů. Závěrem tohoto měření je, že lyzované trombocyty spolu s PPP po aktivaci trombocytů trombinem jsou vhodnějším materiálem pro vyšetřování skutečné hladiny trombocytárních faktorů.



- Kompletní médium
- Alikvot PPP po aktivaci trombocytů trombinem v migračním médiu 1:5
- Sérum v migračním médiu 1:5
- Migrační médium
- SFM
- Sérum

Graf č. 7: Měření migrace HUVEC buněk za sérovými faktory (průměr z duplikátů)

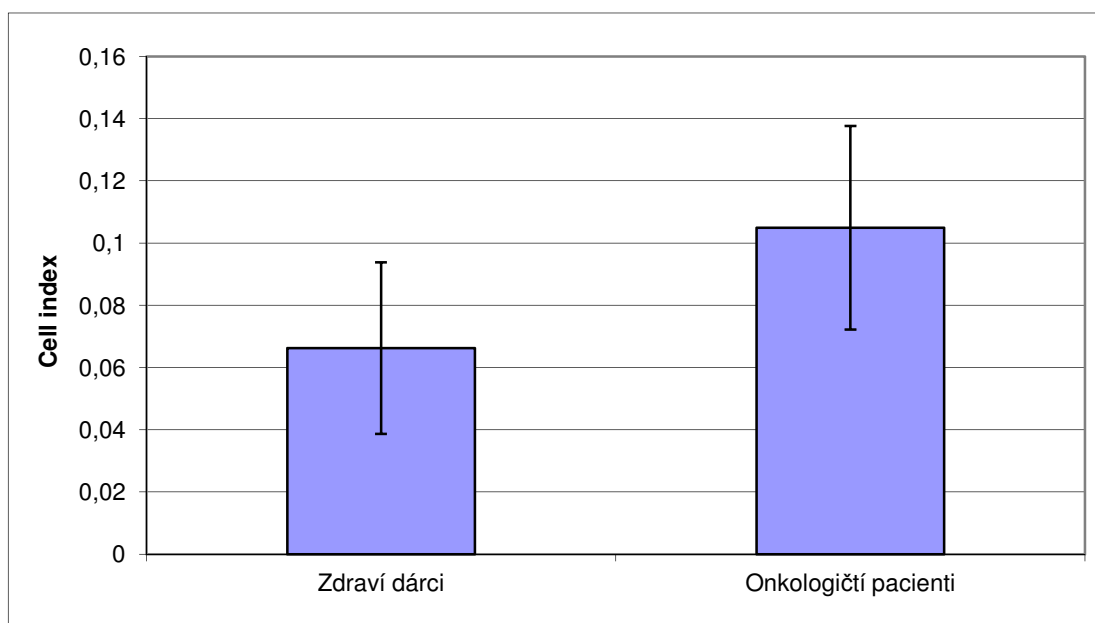


Graf č. 8: Závislost cell indexu na typu vyšetřovaného materiálu - vyhodnocení migrace end-point (cell index ve 24. hodině)

- **Porovnání obsahu trombocytů zdravých dárců a onkologických pacientů**

Při porovnávání rozdílů v migraci HUVEC buněk za chemoatraktanty trombocytů zdravých dárců a onkologických pacientů byly použity HUVEC buňky z 6. pasáže v počtu jedné kultivační lahve s konfluencí přibližně 60-70 % na jednu migrační destičku. Trombocyty byly upraveny lyzací zamražením v migračním médiu. Bylo proměřeno 7 vzorků, z toho 3 od zdravých dárců a 4 od onkologických pacientů. Diagnózy pacientů byly karcinom rekta, karcinom přímého tračníku, karcinom ovarií a karcinom děložního hrdla.

Při vyhodnocení end-point migrace ve 24. hodině byla porovnávána skupina zdravých osob a skupina onkologických pacientů jako průměry cell indexů 3 zdravých osob a 4 onkologických pacientů. Významnost rozdílů v cell indexu mezi těmito skupinami byla stanovena za využití t-testu. Statistické výpočty byly provedeny na hladině významnosti $P = 0,05$. Mezi těmito skupinami nebyl prokázán významný rozdíl v migraci buněk a tedy v množství chemoatraktantů obsažených v trombocytech. To může být dáno malým počtem proměřených vzorků. Nicméně trend v získaných datech je takový, že migrace endotelových buněk je vyšší za vzorky získanými od onkologických pacientů než za vzorky zdravých osob. To může být způsobeno vyšším obsahem chemotaktických faktorů v granulích trombocytů onkologických pacientů ve srovnání se zdravými jedinci.



Graf č. 9: Rozdíl v cell indexu mezi skupinou zdravých dárců a onkologických pacientů - vyhodnocení migrace end-point (cell index ve 24. hodině)

DISKUZE

Výzkum v oblasti lékařských a biologických věd se v současnosti neobejde bez experimentů na živých organismech. Pokusy na laboratorních zvířatech jsou však nákladné a náročné a navíc i často diskutované z hlediska etiky. Proto jsou pro počáteční zkoumání v mnoha oblastech medicíny často vhodným experimentálním nástrojem buněčné kultury, které eliminují počty pokusů na živých zvířatech. Buněčné kultury byly použity i v této diplomové práci jako prostředek pro zkoumání funkčních vlastností krevních destiček u onkologických pacientů. Existuje řada typů endotelií, které jsou využívány pro výzkum v oblasti aterosklerózy, angiogeneze, onkologie, zánětu, hojení ran nebo účinku léků. Konkrétně mezi ně patří endotelové buňky získané z aorty, koronárních arterií, iliakálních arterií, srdeční mikrovaskulatury, krevní a lymfatické mikrovaskulatury plic nebo kůže, plicních arterií, pupečnickových arterií a žil nebo děložní mikrovaskulatury (Cell discovery, 2009).

V rámci této práce byly použity lidské endotelové buňky pupečnickové žíly (HUVEC). Jejich kultivace byla náročná, jelikož buňky byly velice citlivé na řadu faktorů. Nejproblematictější byl odhad dostatečné konfluency kultury, ať už se jednalo o primární kulturu nebo jednotlivé pasáže (subkultury). Pokud nebyla hustota buněk v kultuře vhodně zvolena, z důvodu nízkého nebo naopak vysokého počtu buněk, docházelo ke zpomalení jejich růstu až odumírání. Buňky z prvních pokusů kultivace byly nepoužitelné pro měření buněčné migrace, jelikož nebyla dosažena jejich dostatečná hustota v kultuře a buňky nebyly v dostatečné kondici pro prokazatelné změření migrace.

Angiogeneze neboli novotvorba cév je regulována proangiogenními a antiangiogenními faktory, které jsou v nemalé míře skladovány v granulích trombocytů. Italiano *et al.* (2008) ve své práci popsal, že inhibitory a regulátory angiogeneze jsou odděleny v odlišných populacích α -granulí trombocytů. Navíc popsal, že uvolňování těchto faktorů je selektivní v závislosti na typu aktivovaného receptoru na povrchu trombocytů. Při aktivaci receptoru PAR-1 dochází k uvolnění obsahu granulí s proangiogenními faktory a aktivací PAR-4 se uvolní granula s antiangiogenními faktory (Italiano *et al.*, 2008). Tyto faktory kromě jiných funkcí ovlivňují migraci endotelových buněk, které jsou potřebné pro tvorbu nových cév. Skutečnost, že angiogeneze je nezbytná pro růst nádorů, vedla k rozvoji výzkumu v oblasti

antiangiogenní terapie. Účinnost anti-angiogenní terapie je variabilní a hledají se prediktivní faktory, díky kterým by bylo možné stanovit účinnost terapie a individualizovat tak léčbu. Těmi by logicky mohly být regulátory angiogeneze, proti kterým je léčba cílena, například VEGF.

Jelikož jsou trombocyty výrazným rezervoárem faktorů regulujících angiogenezi, mohlo by porovnání jejich hladiny prostřednictvím míry migrace endotelových buněk sloužit jako prognostický marker u onkologických pacientů. Pro sledování migrace buněk existuje řada metod. V této práci byla použita metoda xCELLigence, mezi jejíž výhody patří možnost sledovat chování buněk v reálném čase po celou dobu analýzy a její neinvazivní charakter bez fluorescenčního značení nebo barvení buněk. Předchůdcem této metody je tzv. Boyden chamber technika založená na stejném principu, který byl popsán u metody xCELLigence. Odlišností je, že se jedná o endpoint analýzu a kvantifikace buněk se provádí barvením nebo fluorescenčním značením (Zicha *et al.*, 1991). Mezi další techniky používané ke studiu migrace buněk patří gelové metody. Buňky v polotekutém gelu migrují za chemoatraktanty nanesenými v gelu na základě chemického gradientu těchto látek. Nevýhodou je horší kvantifikace migrace buněk (Kóhidai, 1995).

V této práci byl mimo jiné zkoumán vliv koncentrace VEGF na migraci endotelových buněk HUVEC. Tento faktor má mnoho vlastností, kterými je zapojen do nádorové angiogeneze. Stimuluje proliferaci a migraci endotelových buněk, inhibuje jejich apoptózu a zvyšuje cévní permeabilitu a tím podporuje angiogenezi a tvorbu metastáz (Halper, 2010; Tsai *et al.*, 1995). Jelikož se u onkologických pacientů často vyskytuje trombocytémie, může být při měření vzorků séra hladina tohoto faktoru zvýšena vlivem vyššího počtu trombocytů (Seo *et al.*, 2010; Gunsilius *et al.*, 2000). Naproti tomu Yoshikawa *et al.* (1999) měřil hladinu VEGF v citrátové plazmě, kde nedochází k aktivaci trombocytů a uvolnění jejich obsahu. U onkologických pacientů zjistil vyšší hodnotu než u zdravých jedinců, což interpretoval jako příčinu zvýšené angiogeneze, při které je obsah granul uvolňován do cirkulace (Yoshikawa *et al.*, 1999). Niers *et al.* (2011) vyvrátili předchozí tvrzení, jelikož prokázali, že hladina skutečně cirkulujícího VEGF je nízká u většiny pacientů s metastázemi a podstatně se neliší od zdravých jedinců. V destičkách onkologických pacientů dále naměřili dvakrát takovou hladinu VEGF, než u vzorků zdravých jedinců. VEGF může pocházet z nádorové tkáně, ze které se dostává do cirkulace, kde je vylučován trombocyty.

Na základě toho může být jeho hladina v trombocytech dobrým ukazatelem angiogenní aktivity onkologických pacientů (Niers *et al.*, 2011).

Druhým faktorem, který byl předmětem měření experimentální části je bFGF. Jeho funkcí je jednak stimulace migrace a proliferace endotelových buněk a regulace exprese VEGF v nádorových buňkách. Zvyšuje expresi molekul endotelových buněk, které aktivují proteázy rozrušující ECM a umožňuje tak invazi endotelových buněk do tkáně. Z jeho vlastností vyplývá, že je zahrnut do procesu angiogeneze (Dunn *et al.*, 2000).

Pro zjištění obsahu trombocytů v závislosti na buněčné migraci byly v této práci měřeny dva typy vzorků. V prvním vzorku byla sekrece granul trombocytů podpořena jejich aktivací trombinem. Tato úprava trombocytů není ale příliš vhodná, jelikož trombocyty mohou být u každého pacienta aktivovány v různé míře podle typu a množství receptorů pro trombin (De Cristofaro *et De Candia*, 2003). Proto byl pro sekreci obsahu granul trombocytů použit jiný postup a to jejich lyzace zamražením, která není závislá na množství a typech receptorů na povrchu trombocytů. Tyto vzorky pak zřejmě lépe odráží skutečný obsah chemotaktických látek a růstových faktorů v trombocytech. Při porovnávání migrace endotelových buněk za lyzovanými vzorky zdravých dárců a onkologických pacientů nebyl mezi těmito dvěma skupinami prokázán významný rozdíl v množství chemoatraktantů obsažených v trombocytech, na čemž se mohl podílet nízký počet proměřených vzorků. V získaných datech se ale jistý trend vyšší migrace buněk za vzorky onkologických pacientů objevil. To by mohlo znamenat, že v trombocytech onkologických pacientů se vyskytuje vyšší množství chemoatraktantů podporujících nádorovou angiogenezi. Hodnocením tohoto jevu u pacientů s maligním onemocněním léčených antiangiogenní terapií, např. anti-VEGF protilátkou bevacizumabem, v kontextu efektu léčby by mohlo přinést hlubší vhled do problematiky úlohy destiček při progresi maligních onemocnění, ale také by mohlo přispět k nalezení prediktivního markeru antiangiogenní léčby. Tato domněnka musí být samozřejmě potvrzena dalšími měřeními a početnějšími skupinami vyšetřovaných osob pro plnohodnotné statistické zpracování.

ZÁVĚR

V této práci byly nejprve optimalizovány podmínky kultivace endotelových buněk HUVEC pro potřeby stanovení funkčních vlastností trombocytů u onkologických pacientů metodou xCELLigence. Prostřednictvím míry migrace endotelových buněk byla vyšetřována různá ředění růstových faktorů trombocytů – VEGF a bFGF, které působí na endotelové buňky jako chemoatraktanty a zprostředkovávají jejich migraci. Bylo zjištěno takové ředění těchto faktorů, které je dostačující pro migraci endotelových buněk.

Dále byly touto metodou vyšetřovány trombocyty onkologických pacientů a zdravých dárců, tedy obsah chemoatraktantů v jejich granulích uvolněné po aktivaci trombocytů různým způsobem. Vzorky lyzovaných trombocytů po zamražení v migračním médiu se zdály být nejvhodnějšími a proto byla dále používána tato úprava vzorků. Při porovnávání migrace endotelových buněk za vzorky zdravých dárců a onkologických pacientů nebyl prokázán významný statistický rozdíl v množství chemoatraktantů obsažených v trombocytech. V získaných datech se ale jistý trend vyšší migrace buněk za vzorky onkologických pacientů objevil. Při proměření početnější skupiny pacientů a potvrzení zjištěného trendu v datech, by mohlo být potvrzeno, že v trombocytech onkologických pacientů se vyskytuje vyšší množství chemoatraktantů podporujících nádorovou angiogenezi.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ANDRAE J., GALLINI R., BETSHOLTZ C.: *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine*. Genes & Development, **2008**, 22, p. 1276-1312.
2. BEENKEN A., MOHAMMADI M.: *The FGF family: biology, pathophysiology and therapy*. Nature Reviews Drug Discovery, **2009**, 8, p. 235-53.
3. BHARDWAJ B., KLASSEN J., COSSETTE N., STERNS E. et al.: *Localization of platelet-derived growth factor beta receptor expression in the periepithelial stroma of human breast carcinoma*. Clinical Cancer Research, **1996**, 2, p. 773-82.
4. BHAT T.A., SINGH R.P.: *Tumor angiogenesis – A potential target in cancer chemoprevention*. Food and Chemical Toxicology, **2008**, 46, p. 1334-45.
5. BIRD C., KIRSTEIN S.: *Real time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system*. Nature Methods, **2009**, 6, v-vi.
6. BLAIR P., FLAUMENHAFT R.: *Platelet alpha-granules: Basic biology and clinical correlates*. Blood Reviews, **2009**, 23, p. 177-89.
7. BOYD J.M., HUANG L., XIE L., MOE B. et al.: *A cell-microelectronic sensing technique for profiling cytotoxicity of chemicals*. Analytica Chimica Acta, **2008**, 615, p. 80-7.
8. BURGER R.A.: *Overview of anti-angiogenic agents in development for ovarian cancer*. Gynecologic Oncology, **2010**, 121, p. 230-8.
9. BUSSOLINO F., DIRENZO M.F., ZICHE M., BOCCHIETTO E. et al.: *Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth*. Journal of Cell Biology, **1992**, 119, p. 629-41.

10. CAO Y.H., CAO R.H., HEDLUND E.M.: *R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways*. Journal of Molecular Medicine, **2008**, 86, p. 785-9.
11. *Cell discovery: research products catalog* [online]. Lonza, **2009** [cit. 27. 4. 2012]. Dostupný z WWW:
http://www.takara-bio.co.jp/goods/catalog/pdf/lonza_celldiscovery.pdf.
12. CERRITO F., LAZZARO M.P., GAUDIO E., ARMINIO P., ALOISI G.: *5-HT₂-receptors and serotonin release: their role in human platelet aggregation*. Life Science, **1993**, 53, p. 209-15.
13. CERVI D., BHATTACHARYA N., PODUST V.N., PETERSON J. et al.: *Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth*. Blood, **2008**, 111, p. 1201-7.
14. DE CRISTOFARO R., DE CANDIA E.: *Thrombin domains: structure, function and interaction with platelet receptors*. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, **2003**, 15, p. 151-63.
15. DIEMERT S., DOLGA A.M., TOBABEN S., GROHM J. et al.: *Impedance measurement for real time detection of neuronal cell death*. Journal of Neuroscience Methods, **2012**, 203, p. 69-77.
16. DISTLER J.H.W., KUROWSKA-STOLARSKA M., GAY R.E., GAY S., DISTLER O.: *Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis*. Quarterly Journal of Nuclear Medicine, **2003**, 47, p. 149-61.
17. DUNN I.F., HEESE O., BLAFL P.M.: *Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs*. Journal of Neuro-oncology, **2000**, 50, p. 121-37.
18. EGEBLAD M., WERB Z.: *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nature Reviews, **2002**, 2, p. 161-74.

19. FERLAY J., PARKIN D.M., STELIAROVA-FOUCHER E.: *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008*. European Journal of Cancer, **2010**, 46, p. 765-781.
20. FRENETTE P.S., JOHNSON R.C., HYNES R.O., WAGNER D.D.: *Platelet roll on stimulated endothelium in-vivo – an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **1995**, 92, p. 7450-4.
21. GIAEVER I., KEESE C.R.: *Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1984**, 81, p. 3761-4.
22. GIAEVER I., KEESE C.R.: *Micromotion of mammalian cells measured electrically*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1991**, 88, p. 7896-900.
23. GREINER M., ZIMMERMANN R.: *Inhibition of cell migration by gene silencing* [online]. Issue 03. Penzberg (GE): Roche Diagnostics GmbH, **2009** [cit. 10. 3. 2012]. Dostupný z WWW: http://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/xce_docs/FA_xCELLigence%20Issue03_HR.pdf.
24. GUNSILIUS E., PETZER A., STOCKHAMMER G., NUSSBAUMER W. et al.: *Thrombocytes are the major source for soluble vascular endothelial growth factor in peripheral blood*. Oncology , **2000**, 58, p. 169-74.
25. HALPER J.: *Growth factor as active participants in carcinogenesis: A perspective*. Veterinary Pathology, **2010**, 47, p. 77-97.
26. HERBST R.S.: *Review of epidermal growth factor receptor biology*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, **2004**, 59, p. 21-26.

27. ITALIANO J.E., RICHARDSON J.L., PATEL-HETT S., BATTINELLI E. et al.: *Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet α granules and differentially released*. *Blood*, **2008**, 111, p. 1227-33.
28. JACKSON S.P.: *The growing complexity of platelet aggregation*. *Blood*, **2007**, 109, p. 5087-95.
29. KILVAER T.K., VALKOV A., SORBYE S.W., SMELAND E. et al.: *Fibroblast growth factor 2 orchestrates angiogenic networking in non-GIST STS patients*. *Journal of Translational Medicine*, **2011**, 9, p. 104.
30. KING S.M., REED G.L.: *Development of platelet secretory granules*. *Seminars in Cell & Developmental*, **2002**, 13, p. 293-302.
31. KLEMENT G.L., YIP T.T., CASSIOLA F., KIKUCHI L. et al.: *Platelets actively sequester angiogenesis regulators*. *Blood*, **2008**, 113, p. 2835-42.
32. KÖHIDAI L.: *Method for determination of chemoattraction in Tetrahymena pyriformis*. *Current Microbiology*, **1995**, 30, p. 251-3.
33. LE ROITH D., KARAS M., YAKAR S., QU B.H. et al.: *The role of the insulin-like growth factor in cancer*. *Israel Medical Association Journal*, **1999**, 1, p. 25-30.
34. LIEKENS S., BRONCKAERS A., PEREZ-PEREZ M.J., BALZARINI J.: *Targeting platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase for cancer therapy*. *Biochemical Pharmacology*, **2007**, 74, p. 1555-67.
35. MENDELSON K., SWENDEMAN S., SAFTIG P., BLOBEL C.P.: *Stimulation of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR beta) activates ADAM17 and promotes metalloproteinase-dependent cross-talk between the PDGFR beta and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways*. *Journal of Biological Chemistry*, **2010**, 285, p. 25024-32.

36. METHENY-BARLOW L.J., LI Y.L.: *The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis*. Cell Research, **2003**, 13, p. 309-17.
37. NAKAMURA T., TERAMOTO H., ICHIHARA A.: *Purification and characterization of a growthfactor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **1986**, 83, p. 6489-93.
38. NASH G.F., WALSH D.C., KAKKAR A.K.: *The role of the coagulation system in tumour angiogenesis*. Lancet Oncology, **2001**, 2, p. 608-13.
39. NASH G.F., TURNER L.F., SCULLY M.F., KAKKAR A.K.: *Platelets and cancer*. Lancet Oncology, **2002**, 3, p. 425-30.
40. NIERS T.H.M., RICHEL D.J., MEIJERS J.M.C., SCHLINGEMANN R.O.: *Vascular endothelial growth factor in the circulation in cancer patients may not be a relevant biomarker*. Plos One, **2011**, 6, e19873.
41. PAPAPETROPOULOS A., FULTON D., MAHBOUBI K., KALB R.G. et al.: *Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway*. Journal of Biological Chemistry, **2000**, 275, p. 9102-5.
42. PETERSON J.E., ZURAKOWSKI D., ITALIANO J.E., MICHEL L.V. et al.: *Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets*. American Journal of Hematology, **2010**, 85, p. 487-93.
43. PINEDO H.M., VERHEUL H.M.V., D'AMATO R.J., FOLKMAN J.: *Involvement of platelets in tumor angiogenesis?* Lancet , **1998**, 352, p. 1775-7.
44. PRESTA M., DELL'ERA P., MITOLA S., MORONI E. et al.: *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*. Cytokine & Growth Factor Reviews, **2005**, 16, p. 159-78.

45. RAHIM S., ÜREN A.: *A real-time electrical impedance based technique to measure invasion of endothelial cell monolayer by cancer cells*. Journal of Visualized Experiments, **2011**, 50, e2792.
46. *Real-time and dynamic monitoring of cell proliferation and viability for adherent cells* [online]. No. 1. Penzberg (GE): Roche Diagnostics GmbH, **2008** [cit. 14. 3. 2012]. Dostupný z WWW:
http://www.um.es/sai/documentos/historico/2009/sct_Excelligence_2009//excellig1.pdf.
47. RENDU F., BROHARD-BOHN B.: *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets, **2001**, 12, p. 261-73.
48. ROBERTS A.B., SPORN M.B.: *Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta*. The American Review of Respiratory Disease, **1989**, 140, p. 1126-8.
49. RUGGERI Z.M., MENDOLICCHIO G.L.: *Adhesion mechanisms in platelet function*. Circulation Research, **2007**, 100, p. 1673-85.
50. SABRKHANY S., GRFFIOEN A.W., EGBRINK M.G.: *The role of blood platelets in tumor angiogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta, **2011**, 1815, p. 189-96.
51. SEO H.Y., PARK J.M., PARK K.H., KIM S.J. et al.: *Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor per platelet count in unresectable advanced gastric cancer patients*. Japanese Journal of Clinical Oncology, **2010**, 40, p. 1147-53.
52. SHEN J.Q., VIL M.D., ZHANG H.F., TONRA J.R. et al.: *An antibody directed against PDGF receptor beta enhances the antitumor and the antiangiogenic activities of an anti-VEGF receptor 2 antibody*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **2007**, 357, p. 1142-7.
53. SLUNGAARD A.: *Platelet factor 4: a chemokine enigma*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **2005**, 37, p. 1162-7.

54. SUN J.Z., WANG D.A., JAIN R.K., CARIE A. et al.: *Inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by a synthetic molecule that blocks binding of both VEGF and PDGF to their receptors*. *Oncogene*, **2005**, 24, p. 4701-9.
55. TAKAHASHI S.: *Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **2011**, 34, p. 1785-8.
56. TESSITORE A., DUGGAN K., BARO V.: *HUVEC Cell Culture: Technical Guide*. [online]. Pennsylvania (USA): Villanova University, **2010** [cit. 4. 1. 2012]. Dostupný z WWW:
<http://vincentbaro.com/HUVEC%20Culture%20Manual%20Baro%202010.pdf>.
57. *The xCELLigence system: new horizons in cellular analysis* [online]. Penzberg (GE): Roche Diagnostics GmbH, **2009** [cit. 10. 3. 2012]. Dostupný z WWW:
http://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/xce_docs/xCELL-SystBrosch_NL2_LR.pdf.
58. TIRUPPATHI C., MALIK A.B., DELVECCHIO P.J., KEESE C.R., GIAEVER I.: *Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: Assessment of endothelial barrier function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1992**, 89, p. 7919-23.
59. TSAI J.C., GOLDMAN C.K., GILLESPIE G.Y.: *Vascular endothelial growth-factor in human glioma cell-lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and BFGF*. *Journal of Neurosurgery*, **1995**, 82, p. 864-73.
60. VANDERCAPPELLEN J., VAN DAMME J., STRUYF S.: *The role of CXC chemokines and their receptors in cancer*. *Cancer Letters*, **2008**, 267, p. 226-44.
61. VON HUNDELSHAUSEN P., PETERSEN F., BRANDT E.: *Platelet-derived chemokines in vascular biology*. *Thrombosis and Haemostasis*, **2007**, 97, p. 704-13.

62. VONDRÁČKOVÁ L., HORVATH V., ŽŮREK D.: *O zlatých elektrodách*. Labor Aktuell, **2010**, 1, p. 18-20.
63. WHITEHEART S.W.: *Platelet granules: surprise packages*. Blood, **2011**, 118, p. 1190-1.
64. WU J., ZHU J.: *Automated continuous monitoring of drowth factor-mediated endothelial cell migration using CIM-Plate 16 and xCELLigence RTCA DP Instrument* [online]. Issue 04. Penzberg (GE): Roche Diagnostics GmbH, **2009** [cit. 5. 3. 2012]. Dostupný z WWW: http://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/xce_docs/FA_xCELLigence_Issue04_HR.pdf.
65. *xCELLigence RTCA DP Instrument: Flexible real-time cell monitoring* [online]. Penzberg (GE): Roche Diagnostics GmbH, **2009** [cit. 14. 3. 2012]. Dostupný z WWW: http://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/xce_docs/RTCA-DP-Folder_LoRes.pdf.
66. YANG L.J., DU J., HOU J., JIANG H., ZOU J.F.: *Platelet factor-4 and its p17-70 peptide inhibit myeloma proliferation and angiogenesis in vivo*. BMC Cancer, **2011**, 11, 1-10.
67. YOSHIKAWA T., TSUBURAYA A., KOBAYASHI O., SAIRENJI M. et al.: *Plasma concentrations of VEGF and bFGF in patients with gastric carcinoma*. Cancer letters, **2000**, 153, p. 7-12.
68. YU H., ROHAN T.: *Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression*. Journal of the National Cancer Institute, **2000**, 92, p. 1472-89.
69. ZICHA D., DUNN G.A., BROWN A.F.: *A new direct-viewing chemotaxis chamber*, Journal of cell science, **1991**, 99, p. 769-75.

70. ZIEBOLZ B.: *Reducing animal testing: real-time cell analysis with Roche's xCELLigence system for the early detection of hepatic cytotoxicity* [online]. Penzberg (GE): Roche Diagnostics GmbH, **2010** [cit. 10. 3. 2012]. Dostupný z WWW: http://www.roche.com/media/media_releases/med_dia_2010-06-08/med_dia_2010-06-10.htm