



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY REKOMBINANTNÍHO PROTEINU ADIPONEKTINU POMOCÍ BUNĚČNÉ KULTURY

DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF ADIPONECTIN, A RECOMBINANT PROTEIN USING CELL CULTURE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Iva Pernicová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0977/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Iva Pernicová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	

Název diplomové práce:

Stanovení biologické aktivity rekombinantního proteinu adiponektinu pomocí buněčné kultury

Zadání diplomové práce:

1. Zvládnutí práce s buněčnými kulturami
2. Test stimulace buněčné kultury růstovými faktory
3. Test inhibice růstových faktorů rekombinantním adiponektinem
4. Zhodnocení výsledků testu biologické aktivity

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Iva Pernicová
Student(ka)

Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením biologické aktivity rekombinantního proteinu adiponektinu pomocí buněčné kultury. Nejprve bylo důležité zvládnout práci s buněčnými kulturami konkrétně s linií 3T3-L1. Na základě proliferačních testů byla vybrána koncentrace inaktivovaného séra, která byla používána pro všechny další experimenty. V proliferačním testu byla ověřena stimulace růstu buněk pomocí růstových faktorů HB-EGF, PDGF-BB a bFGF v různých koncentracích. Biologická aktivita adiponektinu poté byla stanovena jako inhibice stimulace růstu s 5 ng/ml PDGF-BB. Test biologické aktivity adiponektinu byl také proveden s lyofilizovaným adiponektinem a růstovým faktorem bFGF (0,1 ng/ml). Lyofilizace neměla vliv na biologickou aktivitu adiponektinu.

ABSTRACT

This thesis deals with the determination of biological activity of adiponectin, a recombinant protein using cell culture. First it was important to acquire the working skills for the cell culture of cell line 3T3-L1. An optimal concentration of inactivated fetal bovine serum in cell culture media was determined. A stimulation of the cell proliferation by HB-EGF, PDGF-BB and bFGF growth factors was observed at various concentration levels. Afterwards the biological activity of adiponectin was determined as an inhibition of growth stimulation with 5 ng/ml PDGF-BB. This biological activity assay for adiponectin was also conducted with lyophilized adiponectin and a growth factor bFGF (0.1 ng/ml). The lyophilization did not affect the biological activity of adiponectin.

KLÍČOVÁ SLOVA

Adiponektin, 3T3-L1, HB-EGF, PDGF-BB, bFGF

KEYWORDS

Adiponectin, 3T3-L1, HB-EGF, PDGF-BB, bFGF

PERNICOVÁ, I. *Stanovení biologické aktivity rekombinantního proteinu adiponektinu pomocí buněčné kultury*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 70 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu Mgr. Mojmíru Ševčíkovi, Ph.D. za odborné konzultace, cenné rady a pomoc při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Bc. Evě Smolíkové za pomoc při měření experimentální části a za její cenné rady a paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné konzultace.

OBSAH:

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. BUNĚČNÉ KULTURY	8
2.1.1. Buněčná linie 3T3-L1	9
2.1.2. Kultivace buněk	9
2.1.3. Uchovávání buněk	10
2.1.4. Proliferace.....	11
2.2. RŮSTOVÉ FAKTORY	11
2.2.1. Epidermální růstový faktor	12
2.2.2. Fibroblastový růstový faktor	13
2.2.3. Růstový faktor z destiček	14
2.3. ADIPONEKTIN	16
2.3.1. Rekombinantní protein	18
3. CÍLE PRÁCE	20
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1. POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	21
4.2. KULTIVAČNÍ MÉDIA	21
4.3. OSTATNÍ ROZTOKY	21
4.4. MATERIÁL A METODY	22
4.4.1. Buněčná kultura	22
4.4.2. Kultivace a pasážování buněk	22
4.4.3. Stanovení koncentrace buněk	23
Testování vlivu koncentrace fetálního bovinního séra na růst buněk	25
Testování vlivu koncentrace růstových faktorů HB-EGF a PDGF-BB na proliferaci buněk	26
Testování vlivu koncentrace růstového faktoru bFGF na proliferaci buněk ..	27
Testování inhibice růstového faktoru PDGF-BB adiponektinem	28
Testování inhibice růstových faktorů PDGF-BB a bFGF lyofilizovaným adiponektinem	29
4.4.4. Statistické vyhodnocení dat	30
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	31

5.1. VLIV KONCENTRACE SÉRA NA RŮST BUNĚK	31
5.2. VLIV KONCENTRACE RŮSTOVÝCH FAKTORŮ	33
5.2.1. Vliv koncentrace růstových faktorů HB-EGF a PDGF-BB na proliferaci buněk	35
5.2.2. Vliv koncentrace růstového faktoru bFGF na proliferaci buněk	36
5.3. INHIBICE RŮSTOVÉHO FAKTORU PDGF-BB ADIPONEKTINEM	38
5.4. INHIBICE RŮSTOVÝCH FAKTORŮ bFGF A PDGF-BB LYOFILIZOVANÝM ADIPONEKTINEM	40
6. ZÁVĚR	42
7. LITERATURA	44
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	48
9. PŘÍLOHY	49
10. NAMĚŘENÁ DATA	50
11. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT POMOCÍ MULTI-WAY ANOVY	60
11.1. MULTI-WAY ANOVA PRO VLIV KONCENTRACE SÉRA	60
11.2. MULTI-WAY ANOVA PRO VLIV KONCENTRACE RŮSTOVÉHO FAKTORU EGF	61
11.3. MULTI-WAY ANOVA PRO VLIV KONCENTRACE RŮSTOVÉHO FAKTORU PDGF	63
11.4. MULTI-WAY ANOVA PRO VLIV KONCENTRACE RŮSTOVÉHO FAKTORU FGF	64
11.5. MULTI-WAY ANOVA PRO INHIBICI PDGF-BB ADIPONEKTINEM	66
11.6. MULTI-WAY ANOVA PRO INHIBICI PDGF-BB LYOFILIZOVANÝM ADIPONEKTINEM	68
11.7. MULTI-WAY ANOVA PRO INHIBICI bFGF LYOFILIZOVANÝM ADIPONEKTINEM	69

1. ÚVOD

Adiponektin je důležitý hormon tukové tkáně, který se vyskytuje nejen v lidském těle. Tento protein se podílí na regulaci metabolismu glukózy a lipidů. Adiponektin se v těle vyskytuje ve třech oligomerních formách a to jako nízkomolekulární, středněmolekulární a vysokomolekulární.

Rekombinantní adiponektin by bylo možné využít při léčbě onemocnění, jako jsou například diabetes mellitus 2. typu, metabolického syndromu nebo také nádorových onemocnění. Adiponektin inhibuje aktivitu růstových faktorů, jejichž koncentrace je v oblasti nádoru zvýšená. Proto se výzkumy zabývají biologickou aktivitou adiponektinu.

Pro stanovení biologické aktivity adiponektinu lze využít buněčné kultury, které dnes mají široké uplatnění a využívají se v různých odvětvích výzkumu a například k testování toxicity, k výrobě rekombinantních proteinů či k testování nových způsobů léčby. K otestování biologické aktivity se musí nejprve vybrat vhodné podmínky pro kultivaci dané buněčné linie (např. koncentrace inaktivovaného séra). Také je nutné otestovat stimulaci růstových faktorů. Růstové faktory se v těle podílejí na mnoha biologických funkcích a také stimulují růst buněk či proliferaci. Přídavek adiponektinu do média s růstovým faktorem inhibuje jeho stimulační účinek, různé růstové faktory reagují s různými oligomerními formami adiponektinu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Buněčné kultury

Buněčné biotechnologie jsou v dnešní době velmi rozšířeny, používají se jak ve výzkumu, tak i ve výrobě. Jejich historie sahá až do roku 1885, kdy E. Roux kultivoval embryonální kuřecí buňky mimo organismus po několik dní. V roce 1913 Alexis Carrel zavedl aseptické techniky do tkáňových kultur, čím zvýšil jejich úspěšnost [1]. Aseptická práce je při práci se savčími buňkami velmi důležitá, protože bakteriální kontaminace ohrožuje přežití buněk. V roce 1916 byl poprvé použit trypsin pro uvolňování buněk z tkáňové matrice, což vedlo k dalšímu rozvoji a využití buněčných kultur. První lidská buněčná linie byla připravena v roce 1952 z nádoru děložního čípku Henrietty Lacksové a dostala označení HeLa. Dodnes jsou buňky HeLa hojně využívány ve výzkumu [1 - 3].

Dnes rozlišujeme několik druhů buněčných biotechnologií. Jedná se o buněčné kultury, tkáňové kultury a orgánové kultury. Jako tkáňová nebo orgánová kultura je označováno udržování části tkání či orgánu v *in vitro* podmínkách déle než 24 hodin. V orgánové kultuře jsou kultivovány části orgánů, které si zachovávají architektonické vlastnosti původního orgánu. Vzhledem ke špatnému přístupu živin ke všem buňkám má tato kultura krátkou životnost. Používá se například k testování teratogenů. Jako tkáňová kultura je označována kultivace *in vitro* izolovaných fragmentů, jedná se především o rostlinné kultivace. Jako tkáňové kultury bývají nesprávně označovány všechny typy používaných buněčných biotechnologií [1, 2].

Za buněčnou kulturu je označována *in vitro* kultivace buněk, které byly získány enzymatickým uvolněním buněk z původní tkáně. Tyto buňky si nezachovávají architektonické vlastnosti původní tkáně a ztrácí i některé biologické funkce svých původních tkání. K enzymatickému uvolňování buněk z tkání se nejčastěji používá trypsin. Buněčné kultury mohou být suspenzní nebo adherentní [1]. V suspenzní buněčné kultuře se buňky nacházejí v suspenzi, jedná se o buňky, které jsou schopny proliferace i bez přichycení k pevnému podkladu. Většinou se jedná o nádorové buňky. Adherentní buňky proliferují pouze tehdy, pokud jsou přichyceny k pevné podložce. Tento jev se anglicky označuje jako "anchorage dependent" čili závislost na ukotvení. Tyto buňky se přichytí k pevné podložce a proliferují do té doby, než vytvoří monovrstvu po celé ploše podložky, pak dochází ke kontaktní inhibici růstu a proliferace je zastavena. Pro další růst buněk musí být buňky uvolněny od podložky. Nejčastěji k tomu dochází za použití trypsinu, ten naruší povrch buněk, buňky se odlepí a přejdou do suspenze, kde mohou být naředěny. Po naředění opět dochází k uchycení na pevnou podložku a k proliferaci buněk [1, 2, 4].

Primokultura se získává přímou izolací buněk z orgánů či tkání. Tyto buňky rostou pomalu, ale nejvíce reprezentují původní tkáň. Jakmile vytvoří monovrstvu po celé ploše kultivační nádoby, musí být přesazeny a tím dochází ke vzniku sekundární kultury či linie. Sekundární linie má pouze omezený počet pasážování, záleží od typu buněk a jejich stáří při odebrání z původního materiálu. Stabilizované buněčné linie jsou nesmrtelné linie, které lze mnohokrát pasážovat. Tyto buňky vznikly vyselektováním z primární kultury a jsou plně adaptované na podmínky *in vitro*. Nemusí se jednat pouze o tumorové linie, mezi nesmrtelné netumorové linie patří například buňky HBK 21 (fibroblasty z ledvin mláďáte křečka) či 3T3 fibroblasty [1 - 3].

Buněčné technologie, ať už se jedná o orgánové, tkáňové či buněčné, mají řadu využití. Používají se například při přípravě hybridomů pro výrobu monoklonárních protilátek, k produkci rekombinantních proteinů, ale také jako reprezentanti tkání či orgánů pro výzkum nemocí a jejich léčbu, či pro cytotoxické testy [1, 2].

2.1.1. Buněčná linie 3T3-L1

Buněčná linie 3T3-L1 byla izolována doktorem H. Greenem z myších embryí. Původně byla určena pro výzkum metabolických dějů spojených s cukrovkou či obezitou. Morfologicky se jedná o fibroblasty z myších embryí druhu Swiss albino. 3T3-L1 lze diferencovat na adipocyty čili tukové buňky. Jedná se o adherentní buňky, pro svoji proliferaci potřebují pevné podloží. Většinou se kultivují v Dulbeccovu modifikovaném Eagleho médiu (DMEM) s 10 % fetálním bovinním sérem při 37°C a při 95 % vzduchu a 5 % oxidu uhličitého [4, 6].



Obrázek 1 Buňky 3T3-L1 pod mikroskopem, zvětšení 10x10.

2.1.2. Kultivace buněk

Pro správné pěstování buněk *in vitro* je důležité dodržovat několik zásad. Jednou z nejdůležitějších zásad je dodržovat aseptickou práci, aby nedocházelo ke kontaminaci a odumírání buněk. Důležité je také použité médium. Při práci s buněčnou kulturou se nejčastěji používá Dulbeccovo modifikované Eagleho médium, zkráceně DMEM. Také se používá obohacené médium o živné směsi Ham's F12 nebo kombinace těchto dvou médií (Obrázek 2). Hlavní složky média jsou anorganické soli, jako jsou chlorid sodný, chlorid hořečnatý, síran hořečnatý, heptahydrát síranu železnatého atd. Médium také obsahuje aminokyseliny (L-leucin, L-lysin, L-methionin, L-glutamin), vitamíny (kyselina listová, riboflavin) a další látky (glukóza, linolová kyselina či fenolová červeň) [7]. Často se do média přidává sérum, nejčastěji fetální bovinní sérum, které je bohaté na živiny a také obsahuje řadu růstových faktorů. Bovinní sérum se získává po vysrážení krve a odstranění červených

krvinek. Sérum se přidává k médiu pro zvýšení živin a lepší proliferaci buněk, nejčastěji se přidává v objemech odpovídajících 5 až 15% celkového objemu kapaliny přidávané k buněčným kulturám [7, 8].



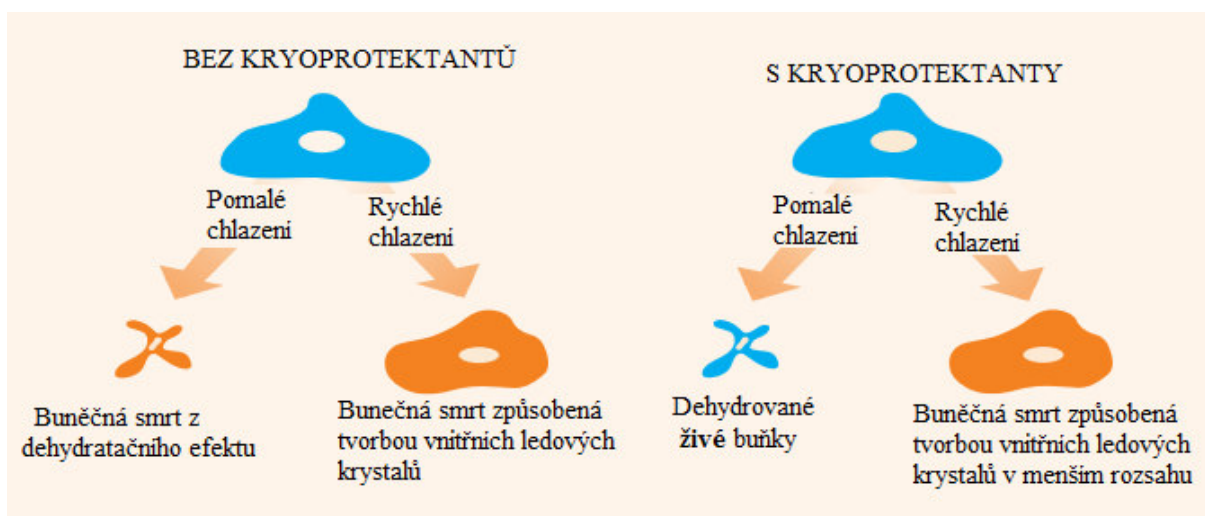
Obrázek 2 DMEM/F12 – použité médium

Kultivace savčích buněčných kultur probíhá při teplotě 35 až 37°C. Teplota hraje důležitou roli pro proliferaci buněk a také má vliv na rozpustnost plynů jako je oxid uhličitý a kyslík. Dalším důležitým faktorem je pH. Většina savčích buněk proliferuje při pH 7,4, fibroblasty se mohou množit i při pH 7,4 –7,7. Jako indikátor správného pH se do média přidává fenolová červeň, která je růžová při pH 7,8, červená při pH 7,4, oranžová při pH 7,0 a žlutá při pH 6,5. Správná hodnota pH v kultivačním médiu musí být vyrovnávána, protože je v průběhu kultivace snižována oxidem uhličitým a kyselinou mléčnou - produkty metabolismu glukózy. Proto se do média přidává hydrogenuhličitan sodný, který udržuje hodnotu pH na 7,4. Také je zapotřebí zvýšená koncentrace CO₂ na 5% v termostatu, kde se buňky kultivují [2].

2.1.3. Uchovávání buněk

Buněčné linie se uchovávají pomocí kryokonzervace. Tato metoda uchovávání buněčných linií je vhodná jak pro nesmrtelné linie, tak i k uchování sekundárních či primárních kultur. Kryokonzervace zabraňuje kontaminaci mikroorganismy, snižuje riziko morfologických změn či genetického driftu a také dochází ke snížení nákladů. Ke kryokonzervaci musí být vybraná kultura s životaschopnými buňkami (koncentrace životaschopných buněk by měla být větší jak 90%). Kultura musí být bez známky kontaminace. K uchovávání se používá tekutý dusík, plynný dusík nebo speciální vysokomrazicí mrazničky. Buněčné kultury se dají úspěšně uchovávat od -70 do -90°C po několik měsíců. Buněčné kultury lze uchovávat i roky při -196°C. Pro úspěšnou kryokonzervaci se k buněčným liniím přidává kryoprotektant, kterým je nejčastěji DMSO (dimethylsulfoxid) nebo lze též použít glycerol. Kryoprotektant slouží k ochraně buněk před prasknutím tvorbou ledových krystalů. DMSO se používá v koncentraci 5 až 15% (v/v). Zamrazování by mělo být pomalé, za snižování teploty asi o -1 až -3 °C za minutu. Přítomnost kryoprotektantů a rychlost zamrazování buněk má vliv

na životaschopnost buňky (Obrázek 3). Rozmrazování buněk by mělo být naopak rychlé, ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C asi na 3 až 5 minut [9, 10].



Obrázek 3 Rozdílnost zamrazování buněk bez a s kryoprotektanty [10]

2.1.4. Proliferace

Proliferace je proces dělení buněk, bývá označována jako buněčný růst. Jedná se o velmi důležitý děj pro existenci vícebuněčných organismů. Buněčná proliferace je nezbytná také v prenatálním období. Proliferační test spočívá v časovém nárůstu počtu buněk při působení různých látek umožňujících studovat jejich vliv na buněčný růst [1, 4].

2.2. Růstové faktory

Růstové faktory jsou bílkovinné induktory buněčných procesů. Jsou produkovány především buňkami mezenchymálního původu. Růstové faktory se váží na specifické membránové receptory a indukují buněčnou proliferaci, diferenciaci či migraci. Účastní se řady biologických procesů v organismu a mají celou řadu klinického využití [11, 12]. V organismu se vyskytuje hned několik růstových faktorů, které jsou produkovány různými typy buněk a také v organismu plní různé funkce (Obrázek 4).

Faktor	Hlavní zdroj	Hlavní funkce
EGF (epitelový růstový faktor)	submaxilární slinná žláza, Brunnerova žláza	podpora proliferace mezenchymálních, gliových a epiteliálních buněk
EPO (erythropoetin)	ledviny	podpora proliferace a diferenciacie erytrocytů
FGF (fibroblastový růstový faktor)	široké spektrum buněk	podpora proliferace širokého spektra buněk
IGF-I (inzulínu podobný růstový faktor)	primárně játra	podpora proliferace mnoha buněčných typů
IGF-II (inzulínu podobný růstový faktor)	množství buněk	podpora proliferace širokého spektra buněk primárně fetálního původu
NGF (nervový růstový faktor)	neurony resp. neurity	podpora růstu nervových buněk a jejich přežívání
PDGF (destičkový růstový faktor)	trombocyty, endoteliální buňky, placenta	podpora proliferace pojivové tkáně, glie a buněk hladkého svalstva
TGF- α (transformující růstový faktor)	T- B-lymfocyty	chemotaxe fibroblastů a eosinofilů angioneogeneze, proliferace embryonálních kmenových buněk
TGF- β (transformující růstový faktor)	aktivované TH ₁ a NK-buňky	protizánětlivý (suprese produkce cytokinů a exprese II. třídy MHC), podpora hojení ran, inhibice proliferace makrofágů a lymfocytů

Obrázek 4 Přehled několika růstových faktorů, jejich zdroje a hlavní funkce [11]

2.2.1. Epidermální růstový faktor

Epidermální růstový faktor (EGF) byl objeven v roce 1962 doktorem Stanley Cohenem při výzkumu nervových růstových faktorů [13]. Do rodiny EGF růstových faktorů patří transformační růstový faktor-alfa (TGF- α), heparin vázající EGF (HB-EGF), epiregulin a další [4, 13, 14]. EGF je jednořetězový polypeptid, který se skládá z 53 aminokyselin. Podle studie S. Cohena, kde byl zkoumán lidský epidermální růstový faktor, bylo prokázáno, že je strukturálně i funkčně podobný s myším EGF [15]. Epidermální růstový faktor můžeme najít v mnoha tělních tekutinách, od mléka, přes sliny, plazmu, střevní tekutinu až po plodovou vodu. U myši dochází k syntéze EGF v podčelistních žlázách, kde je také ukládán do granulí, a proto jsou myší sliny velmi bohaté na tento růstový faktor. U lidí jsou největším producentem EGF ledviny, proto je moč bohatým zdrojem EGF [4, 13]. Hlavní biologickou funkcí EGF je stimulace proliferace a diferenciacie buněk mezenchymálního původu a epiteliálních buněk [4].

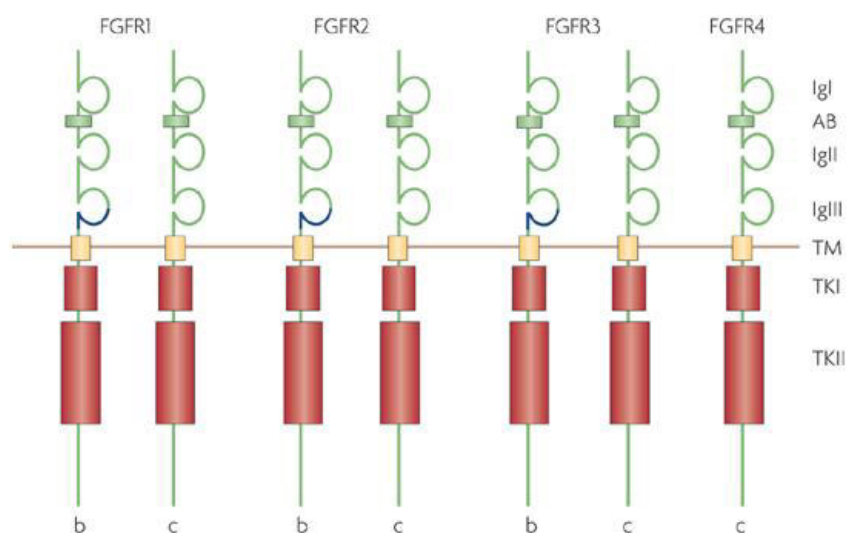
Receptor epidermálního růstového faktoru, zkráceně EGFR, je rovněž označován jako ErB1 nebo HER-1. Jedná se o transmembránový receptor tyrozin kinázy, který je aktivován několika ligandy. EGFR se skládá z extracelulární části, kde se navazují ligandy, následuje transmembránová část a poté intracelulární část. Navázání ligandu vede k aktivování různých signálních drah, které ovládají především proliferaci, diferenciaci a přežití buněk. EGFR hraje důležitou roli při regeneraci jater po akutním či chronickém poškození nebo při cirhóze jater [16].

Epidermální růstový faktor má i další funkce a využití. Klinické studie ukazují, že se EGF podílí na regulaci epiteliálních iontových kanálů [13]. Rodina růstových faktorů EGF se také hojně podílí na hojení ran. Hojení ran je složitý proces, který zahrnuje koordinovanou spolupráci několika typu buněk, jako jsou například keratinocyty, fibroblasty, makrofágy či krevní destičky. Na uzavření rány se podílí migrace, infiltrace, proliferace a diferenciaci těchto buněk. Podle studie Stephana Barrientose a kolektivu se na tomto složitém procesu podílí řada růstových faktorů, cytokinů a chemokinů. Těchto procesů se účastní mimo jiné také epidermální růstové faktory [14].

2.2.2. Fibroblastový růstový faktor

Rodina fibroblastových růstových faktorů čítá až 23 typů. Často jsou označovány zkratkou FGF a číslem (FGF-1 až 23). FGF-1 je označován také jako alkalický fibroblastový růstový faktor (aFGF) a FGF-2 je označován jako bazický (bFGF). FGF jsou polypeptidy o velikosti mezi 14 a 16 kDa, které mají řadu biologických funkcí. Mezi hlavní funkce patří stimulace proliferace pro fibroblasty, ale také pro buňky neuroektodermálního, endodermálního a mezodermálního typu. FGF také působí při obnově tkání, migraci či regulaci metabolismu. Rodina FGF je charakteristická vazbou na proteoglykany (heparin, heparansulfát) na povrchu buněk a také v extracelulární matrix [4, 17 - 19].

Lidské tělo obsahuje 18 typů FGF a čtyři druhy receptorů (FGFR). Signalizace je zprostředkována navázáním ligandů na receptory. Receptory obsahují sekvenci vázající heparin, tři extracelulární domény podobné imunoglobulinu, hydrofobní transmembránové domény a rozdělené intracelulární tyrozin kinázové domény [18]. Nákres receptoru fibroblastového růstového faktoru znázorňuje Obrázek 5 [20].



Nature Reviews | Neuroscience

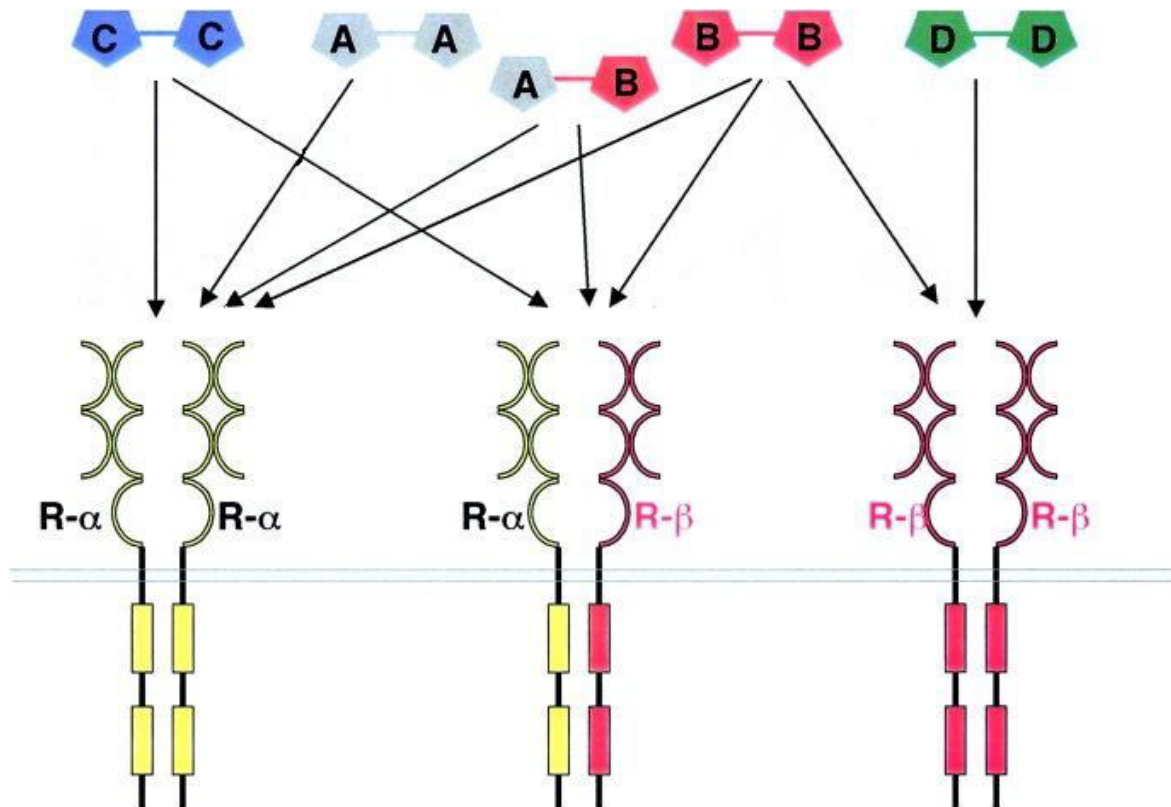
Obrázek 5 Receptor fibroblastového růstového faktoru [20], IgI–IgIII - domény podobné imunoglobulinu, AB - kyselinový box, TM - transmembránová doména, TKI a TKII - jednotlivé části tyrosin kinázové domény, b, c - isoformy.

Bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF, FGF-2) je mitogenní pro mnoho typů buněk mezodermálního a neuroektodermálního původu. Podílí se také na angiogenezi čili na novotvorbě cév, je důležitý při hojení ran či při morfogenezi srdce, mozku a kostí. Bazický FGF se nachází v různých tkáních, včetně nervové tkáně, hypofýzy, žlutého tělíska, placenty či kůry nadledvinek. Jeho zvýšená hladina byla také zaznamenána u různých typů nádorů [17 - 19].

2.2.3. Růstový faktor z destiček

Růstový faktor z destiček, zkráceně PDGF, byl identifikován v 70. letech 20. století jako růstový faktor v séru pro fibroblasty [21]. Do rodiny PDGF řadíme také vaskulární endoteliální růstové faktory (VEGF). U růstových faktorů z destiček byly identifikovány čtyři formy a to PDGFA, PDGFB, PDGFC a PDGFD. PDGF můžeme rozdělit na homodimery a heterodimery. Formy C a D tvoří pouze homodimery (PDGF-CC, PDGF-DD), formy A a B tvoří každý svůj homodimer (PDGF-AA, PDGF-BB) a společný heterodimer (PDGF-AB) [4, 12, 21]. PDGF jsou tvořeny cysteinem a jsou pro ně charakteristické intermolekulární a intramolekulární disulfidické můstky [12, 21]. Růstové faktory z destiček jsou produkovány kromě trombocytů (krevní destičky), také aktivovanými makrofágy, endoteliálními buňkami, fibroblasty, keratinocyty a buňkami hladkého svalstva [4, 14]. Růstové faktory z destiček jsou vysoce mitogenní pro mezenchymální buňky, včetně fibroblastů a buněk hladkého svalstva, podporují také migraci buněk a jejich diferenciaci [4, 12]. PDGF působí primárně jako parakrinní růstové faktory, mohou však být zapojeny i do autokrinních smyček v nádorech [21].

PDGF působí prostřednictvím dvou transmembránových receptorů tyrosin kinázy, PDGFR- α a PDGFR- β . Po navázání ligandu na receptor dojde k dimerizaci, která způsobí autofosforylaci receptoru na tyrosinových zbytcích v intracelulární doméně. Fosforylovaný tyrosin slouží k navázání proteinů obsahujících SH₂, což vede ke spuštění signálních drah. Receptor PDGFR- α vykazuje vysokou afinitu pro PDGF-AA, PDGF-BB a PDGF-CC, receptor *beta* má vysokou afinitu k PDGF-BB a PDGF-DD. Heterodimer PDGF-AB se může vázat buď na receptor PDGF- α nebo na dimer receptoru α a β [12, 14, 21, 22]. Afinitu jednotlivých dimerů PDGF v *in vitro* systémech znázorňuje Obrázek 6.



Obrázek 6 Vazba dimeru PDGF na receptor [22]. Obrázek znázorňuje jednotlivé dimery PDGF a jejich afinitu k receptorům. PDGF-CC vykazuje vazebnou afinitu k receptoru α i β , PDGF-AA vykazuje afinitu k receptoru α , heterodimer PDGF-AB vykazuje afinitu k receptorům α i k dimeru receptoru α , β , PDGF-BB vykazuje afinitu ke všem receptorům, PDGF-DD se váže pouze na receptor β .

Růstový faktor z destiček má významné uplatnění ve vývoji organismu a také v medicíně. PDGF se používá k hojení ran, rekombinantní lidské varianty PDGF-BB byly úspěšně použity při léčení diabetických zánětů. Jsou s úspěchem používány při léčbě chronických ran či vředů [14]. PDGF je také zapojen do celé řady nemocí. V případech genetické poruchy dochází k nekontrolované signalizaci a tvorbě nádorů. Všechny formy PDGF byly také nalezeny ve zvýšené koncentraci v arterosklerotických lézích. PDGF má vliv na kardiovaskulární onemocnění a zvýšený krevní tlak [12, 21].

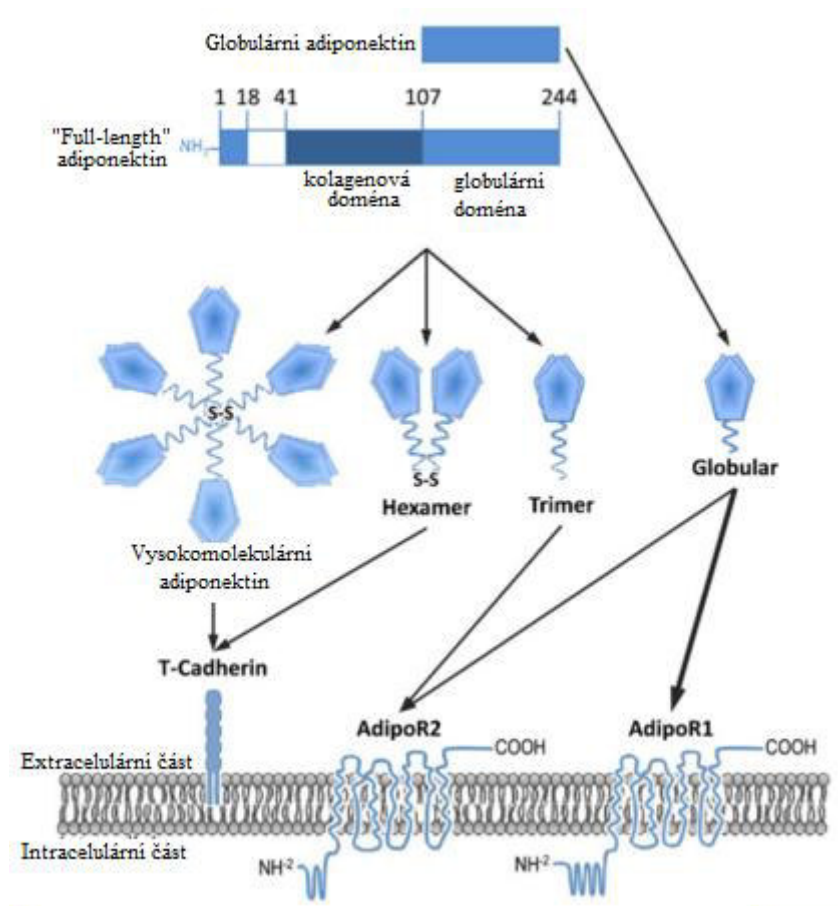
2.3. Adiponektin

Tuková tkáň je tvořena tukovými buňkami neboli adipocyty. Dříve bylo za hlavní funkci tukové tkáně považováno především ukládání energetických zásob, termoregulace či mechanická ochrana organismu. Na konci 20. století bylo prokázáno, že tuková tkáň produkuje také proteiny s endokrinní, parakrinní a autokrinní funkcí. Tyto látky se nazývají adipokiny. Adipokiny jsou peptidové hormony, které se účastní především regulace energetického příjmu a výdeje, regulace metabolismu glukózy a lipidů a také ovlivňují apetit či tělesnou hmotnost. Mezi nejznámější adipokiny patří leptin, adiponektin a rezistin [23 - 25].

Adiponektin byl objeven v roce 1995 v tukové tkáni myši, o rok později v lidské tukové tkáni [23]. Protože byl objeven několika laboratořemi, dostal více označení například Acpr 30, AdipoQ, apM1 či protein 28, nejrozšířenějším názvem je však adiponektin [23]. Adiponektin se nachází jak v tukové tkáni, tak v krevní plazmě. Jedná se o protein o velikosti 30kDa. Lidský adiponektin obsahuje 244 aminokyselin, je kódován na chromozomu 3q27 a obsahuje tři exony a dva introny. Adiponektin se skládá ze tří domén: aminotermální signální peptid, doména podobná kolagenu na N-konci a globulární doména na C-konci [24, 26]. Adiponektin cirkuluje v různých oligomerních formách, první z nich je označována jako nízkomolekulární forma (LMW) a jedná se o trimer. Další formou je hexamer, který se nazývá středněmolekulární (MMW), a třetí formou je vysokomolekulární adiponektin (HMW). Během cirkulace se adiponektin vyskytuje neštěpený (tzv. full-length) a jeho proteolytickým štěpením vzniká globulární adiponektin [27].

Adiponektin působí přes dva specifické receptory. Jedná se o isoformy s označením AdipoR1 a AdipoR2. Především v kosterním svalstvu se nachází AdipoR1, v játrech se vyskytuje AdipoR2. Oba dva receptory mají sedm transmembránových domén. Nedávno byl také objeven třetí receptor, nazývá se T-cadherin a je exprimován v endoteliálních buňkách a buňkách hladkého svalstva [23, 26, 27].

Oligomerní formy adiponektinu a jeho receptory znázorňuje Obrázek 7 [26].



Obrázek 7 Oligomerní formy adiponektinu a jeho receptory

Adiponektin je převážně produkován tukovou tkání, studie však potvrzují také expresi v dalších tkáních, včetně jater, sleziny, mezimozku, hypofýzy či vaječníků. U lidí se adiponektin nachází navíc ještě v buňkách kostní dřeně, fetálních buňkách, kardiomyocytech nebo v epiteliálních buňkách slinných žláz [26].

Hladina adiponektinu v těle je ovlivňována mnoha faktory. Hlavním faktorem je obsah tuku, čím více je tuku v organismu, tím méně cirkuluje adiponektinu. Hladina adiponektinu v těle je také snižována podáváním glukokortikoidů [23]. Při ztrátě tělesné hmotnosti dochází k navýšení koncentrace adiponektinu v séru. Plazmatická koncentrace adiponektinu je mnohonásobně vyšší než třeba koncentrace leptinu, koncentrace adiponektinu se pohybuje v rozmezí 0,5 až 30 $\mu\text{g/ml}$. Jeho koncentrace negativně koreluje s BMI (body mass index) [23, 24, 29].

Mezi hlavní biologické funkce adiponektinu patří regulace metabolismu glukózy a zvyšování katabolismu lipidů ve svalech a játrech. Adiponektin také redukuje tělesnou hmotnost, má protizánětlivý účinek a zvyšuje citlivost k inzulínu ve svalech i v játrech [28, 29].

Obezita a diabetes mellitus 2. typu negativně ovlivňují expresi adiponektinu. Adiponektin hraje velkou roli v léčení těchto onemocnění, stejně jako v metabolickém syndromu či arteroskleróze [27].

Adiponektin je důležitým regulátorem buněčné proliferace. V pokusech na myších adiponektin inhiboval patologickou angiogenezi a růst nádorů. Adiponektin se váže na některé růstové faktory a tím zabraňuje jejich stimulaci růstu buněk. Interakce adiponektinu s růstovými faktory zabraňuje jejich navázání na receptory. Různé oligomerní formy adiponektinu interagují s různými růstovými faktory. Růstový faktor z destiček (PDGF-BB) se váže na vysokomolekulární a středněmolekulární adiponektin, ale neváže se k nízkomolekulárnímu. Bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) má vysokou vazební afinitu k vysokomolekulárnímu adiponektinu. Epidermální růstový faktor se váže na všechny tři formy adiponektinu se stejnou afinitou. Tento fakt dokazuje, že různé formy adiponektinu mají v těle různé biologické funkce [30].

2.3.1. Rekombinantní protein

První rekombinantní proteiny byly produkovány pomocí mikroorganismů. V dnešní době je řada rekombinantních proteinů produkována pomocí bakterií, kvasinek či vláknitých hub, stejně tak pomocí hmyzích buněk či rostlinných nebo živočišných buněk. Některé rekombinantní proteiny se prodávají ve velkých objemech. Využití našly v lékařství či farmacii, ale i ve výzkumu [31].

Nejčastěji jsou rekombinantní proteiny připravovány pomocí molekulárního klonování. Jedná se o proces, kdy jsou geny kódující protein vloženy do expresních vektorů. Tyto vektory jsou vpraveny do produkčních buněk, může se jednat jak o prokaryotické tak eukaryotické buňky. V těchto buňkách poté dochází k syntéze rekombinantního proteinu [32].

Obrázek 8 znázorňuje shrnutí jednotlivých expresních systémů a jejich výhody a nevýhody [32].

Rekombinantní lidský adiponektin bývá často produkován bakterií *Escherichia coli* nebo pomocí buněčné linie s označením HEK-293 (embryonální lidské buňky ledvin). Díky posttranslační modifikaci proteinu u produkce pomocí linie HEK-293 má takto připravený adiponektin shodnou biologickou aktivitu s přirozeným proteinem.

	<i>E. coli</i>	Kvasinky	Hmyzí buňky	Savčí buňky															
<i>Obecné vlastnosti</i>																			
rychlost růstu/doba zdvojení	30 min	90 min	18–24 hod	24 hod															
cena růstového média	nízká	nízká	vysoká	vysoká															
hladina exprese	vysoká	nízká až vysoká	nízká až vysoká	nízká															
sekrece proteinu	sekrece do periplazmy	sekrece do média	sekrece do média	sekrece do média															
sekundární struktura proteinu	často denaturované	většinou správná	správná	správná															
<i>Posttranslační modifikace proteinu</i>																			
N-glykosylace	ne	manóзовý typ	jednoduchá, chybí kyselina sialová	komplexní															
O-glykosylace	ne	ano	ano	ano															
fosforylace	ne	ano	ano	ano															
acetylace	ne	ano	ano	ano															
acylace	ne	ano	ano	ano															
gama-karboxylace	ne	ne	ne	ano															
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">Výhody</th> <th style="text-align: center;">Nevýhody</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>E. coli</i></td> <td>nejpoužívanější expresní systém (zkušenosti, velký výběr klonovacích vektorů), snadná kultivace, rychlý růst, snadná kontrola genové exprese, vysoké výtěžky, možnost sekrece proteinu do média, nízké náklady</td> <td>chybí posttranslační modifikace, protein může postrádat biologickou aktivitu, vysoký obsah endotoxinů</td> </tr> <tr> <td>kvasinky</td> <td>neprodukují endotoxiny, probíhá glykosylace a tvorba disulfidických můstků, snadná purifikace sekretovaných proteinů, metody pro velkoobjemovou kultivaci, relativně nízké náklady</td> <td>obtížněji regulovatelná genová exprese, glykosylace odlišná od savčích buněk, nižší výtěžek než u <i>E. coli</i></td> </tr> <tr> <td>hmyzí buňky (vektory založené na bakulovirech)</td> <td>posttranslační modifikace podobné savcím, bezpečné (bakulovirus není vůči savcům infekční), relativně vysoká exprese proteinu</td> <td>produkt nemusí být vždy plně funkční, mírně odlišné N-glykosylace, kultivace časově i finančně náročná</td> </tr> <tr> <td>savčí buňky</td> <td>biologická aktivita shodná s přirozenými proteiny</td> <td>kultivace časově i finančně velmi náročná, nízké výtěžky</td> </tr> </tbody> </table>						Výhody	Nevýhody	<i>E. coli</i>	nejpoužívanější expresní systém (zkušenosti, velký výběr klonovacích vektorů), snadná kultivace, rychlý růst, snadná kontrola genové exprese, vysoké výtěžky, možnost sekrece proteinu do média, nízké náklady	chybí posttranslační modifikace, protein může postrádat biologickou aktivitu, vysoký obsah endotoxinů	kvasinky	neprodukují endotoxiny, probíhá glykosylace a tvorba disulfidických můstků, snadná purifikace sekretovaných proteinů, metody pro velkoobjemovou kultivaci, relativně nízké náklady	obtížněji regulovatelná genová exprese, glykosylace odlišná od savčích buněk, nižší výtěžek než u <i>E. coli</i>	hmyzí buňky (vektory založené na bakulovirech)	posttranslační modifikace podobné savcím, bezpečné (bakulovirus není vůči savcům infekční), relativně vysoká exprese proteinu	produkt nemusí být vždy plně funkční, mírně odlišné N-glykosylace, kultivace časově i finančně náročná	savčí buňky	biologická aktivita shodná s přirozenými proteiny	kultivace časově i finančně velmi náročná, nízké výtěžky
	Výhody	Nevýhody																	
<i>E. coli</i>	nejpoužívanější expresní systém (zkušenosti, velký výběr klonovacích vektorů), snadná kultivace, rychlý růst, snadná kontrola genové exprese, vysoké výtěžky, možnost sekrece proteinu do média, nízké náklady	chybí posttranslační modifikace, protein může postrádat biologickou aktivitu, vysoký obsah endotoxinů																	
kvasinky	neprodukují endotoxiny, probíhá glykosylace a tvorba disulfidických můstků, snadná purifikace sekretovaných proteinů, metody pro velkoobjemovou kultivaci, relativně nízké náklady	obtížněji regulovatelná genová exprese, glykosylace odlišná od savčích buněk, nižší výtěžek než u <i>E. coli</i>																	
hmyzí buňky (vektory založené na bakulovirech)	posttranslační modifikace podobné savcím, bezpečné (bakulovirus není vůči savcům infekční), relativně vysoká exprese proteinu	produkt nemusí být vždy plně funkční, mírně odlišné N-glykosylace, kultivace časově i finančně náročná																	
savčí buňky	biologická aktivita shodná s přirozenými proteiny	kultivace časově i finančně velmi náročná, nízké výtěžky																	

Obrázek 8 Shrnutí jednotlivých expresních systémů [32]

3. CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo stanovení biologické aktivity rekombinantního proteinu adiponektinu pomocí buněčné kultury 3T3-L1. Nejprve byla testována vhodná koncentrace inaktivovaného séra, poté byla testována vhodná koncentrace růstových faktorů HB-EGF, PDGF-BB a bFGF. Biologická aktivita adiponektinu byla otestována pomocí proliferačních testů.

Jednotlivé cíle práce:

1. Zvládnutí práce s buněčnými kulturami
2. Test stimulace buněčné kultury růstovými faktory
3. Test inhibice růstových faktorů rekombinantním adiponektinem
4. Zhodnocení výsledků testu biologické aktivity

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité přístroje

Flowbox – Esco Class II Type A2, Labculture

Odsávačka – Integra Vacusafe

Termostat se zvýšenou tenzí CO₂ – Hera cell 240, Thermo Electron Corporation

Inverzní mikroskop – AXIO, Zeiss

Nádoba s tekutým dusíkem – Aspede 170

Serologické sterilní pipety

Jamkové sterilní kultivační destičky

Sterilní kultivační láhve T75

Bürkerova komůrka

Sterilní rukavice

4.2. Kultivační média

Dubleccovo modifikované Eagleho médium – DMEM/F12 – PAN-Biotech

4.3. Ostatní roztoky

bFGF – R&D systems

Fetální telecí sérum – PAN-Biotech

Fyziologický infuzní roztok – Ardeapharma a.s.

HB-EGF – R&D systems

Hovězí sérový albumin – Sigma-Aldrich

Inaktivované fetální telecí sérum – PAN-Biotech

PDGF-BB – PeproTech

Rekombinantní adiponektin (lidský) – Biovendor

Trypsin – PAN-Biotech

Voda pro injekci – Ardeapharma a.s.

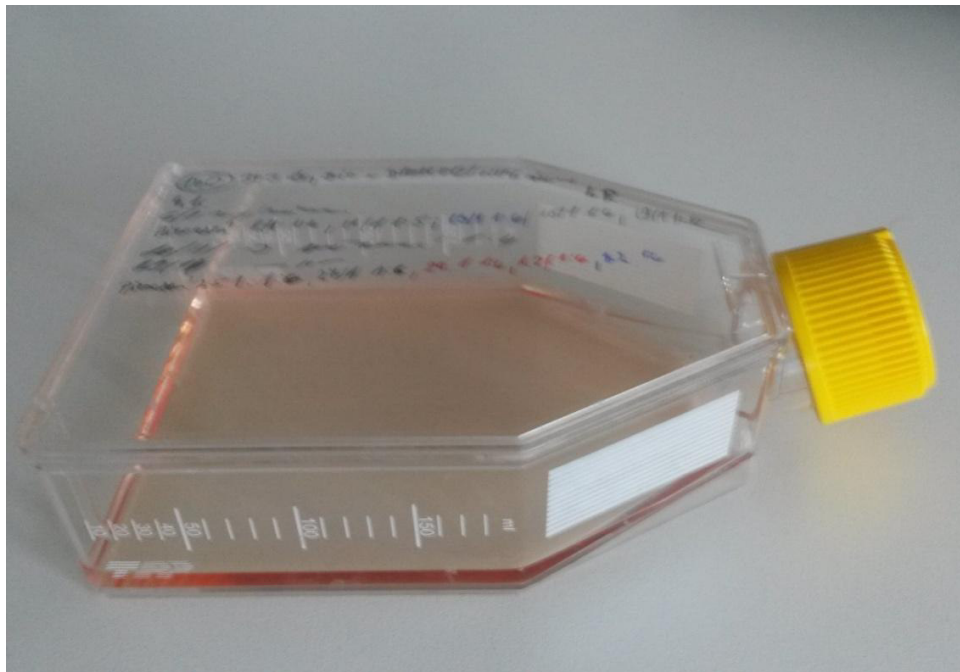
4.4. Materiál a metody

4.4.1. Buněčná kultura

Pro stanovení biologické aktivity adiponektinu byla použita buněčná linie s označením 3T3-L1 klon 140, jedná se o fibroblasty z myších embryí od společnosti Zen-Bio (Severní Karolína, USA)

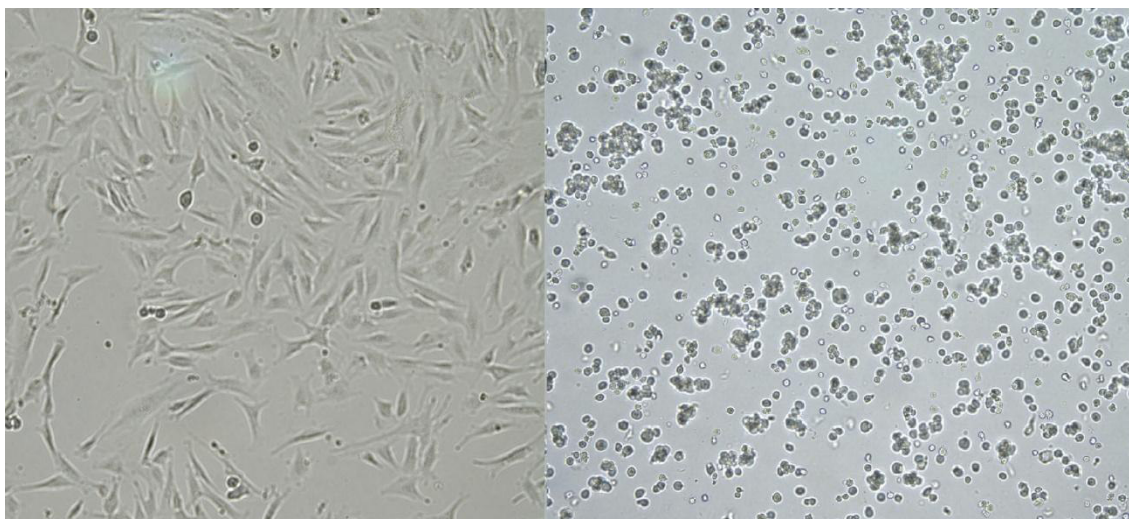
4.4.2. Kultivace a pasážování buněk

Jako základní médium bylo použito Dulbeccovo modifikované Eagleho médium (DMEM/ F12) s 10 % fetálním bovinním sérem (FBS). Kultivace probíhala v kultivačních lahvích o objemu 75 cm³ (Obrázek 9) v termostatu při 37°C a s 5 % oxidu uhličitého a v souladu s doporučením výrobce bylo médium třikrát za týden měněno.



Obrázek 9 Kultivační láhev (T75)

Přesazování (pasážování) buněk bylo prováděno při 70 až 80 % konfluenci, tedy při 70 až 80 % obsazení dna buňkami. Při pasážování buněk bylo nejprve odsáto staré médium, buňky byly opláchnuty 10 ml sterilním fyziologickým roztokem a po jeho odstranění byly přidány 4 ml sterilního roztoku trypsinu. Trypsin odlepí buňky ode dna kultivační láhve a buňky přejdou do suspenze (Obrázek 10). Po přibližně 10 minutové inkubaci při 37°C byl účinek trypsinu zastaven přidávkem 4 ml média s 10 % fetálním bovinním sérem (FBS). Poté je část buněčné suspenze odpipetována z kultivační láhve a je přidáno 20 ml média s 10% FBS. Kultivační láhev je opět vrácena do termostatu, kde buňky opět adherují na dno lahve a rostou. Buňky byly nejčastěji přesazovány v poměru 1:6 a 1:8 a to třikrát do týdne. Růst buněk a jejich adherence byla pravidelně kontrolována pod inverzním mikroskopem.



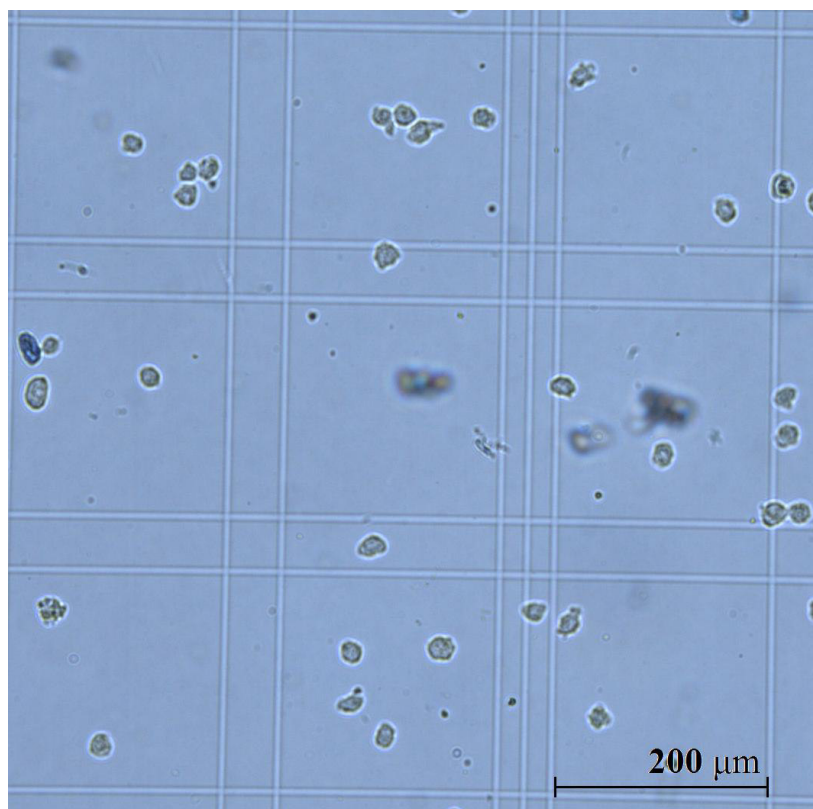
A) Buňky přisednuté na dně kultivační lahve

B) Buňky v suspenzi po působení trypsinu

Obrázek 10 Přesazování buněk. Snímky byly pořízeny inverzním mikroskopem s kamerou při zvětšení 10x10. A) Buňky přisednuté na dně kultivační lahve – buňky 3T3-L1 v kultivační lahvi těsně před přesazením, B) Buňky v suspenzi po působení trypsinu – buňky 3T3-L1 po působení trypsinu po 10 minutách.

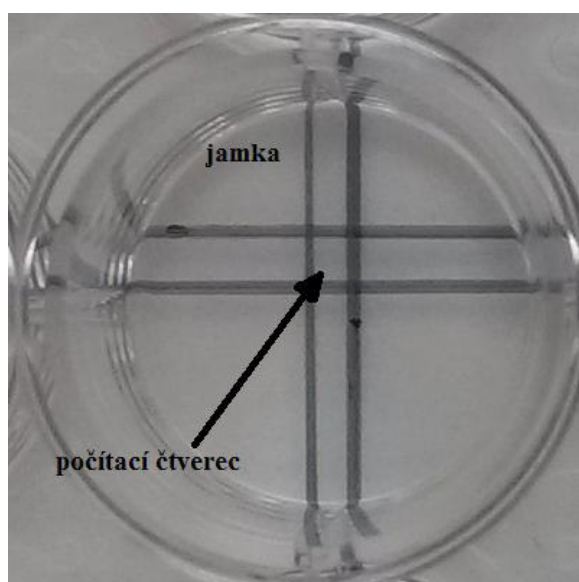
4.4.3. Stanovení koncentrace buněk

Koncentrace buněk v suspenzi byla stanovena pomocí Bürkerovy komůrky (hemocytometru). Při pasážování buněk byly buňky pomocí trypsinu převedeny do suspenze. Po zastavení účinku trypsinu 4 ml média s 10 % FBS byl odebrán 1 ml buněčné suspenze. Suspenze byla pořádně promíchána a 20 μ l buněčné suspenze bylo obarveno trypanovou modří v poměru 1:1. Obarvená suspenze byla napipetována do Bürkerovy komůrky, kde byly živé buňky spočítány (Obrázek 11). Živé buňky zůstaly bezbarvé, mrtvé buňky byly obarveny do modra. Poté byly buňky naředěny do požadované koncentrace pro jednotlivé proliferační testy do připraveného média DMEM/F12 s 10% FBS.



Obrázek 11 Počítání buněk v Bürkerově komůrce. Snímek byl pořízen kamerou na inverzním mikroskopu. Na obrázku lze pozorovat neobarvené živé buňky i obarvené mrtvé buňky.

Počet buněk v proliferačních testech byl stanoven spočítáním buněk v jednotlivých jamkách v nichž byly nakresleny počítací čtverce o ploše 2×2 mm (Obrázek 12) pro jednotlivé časy a jednotlivé proliferační testy.



Obrázek 12 Jamka kultivační desky s počítacím čtvercem

Testování vlivu koncentrace fetálního bovinního séra na růst buněk

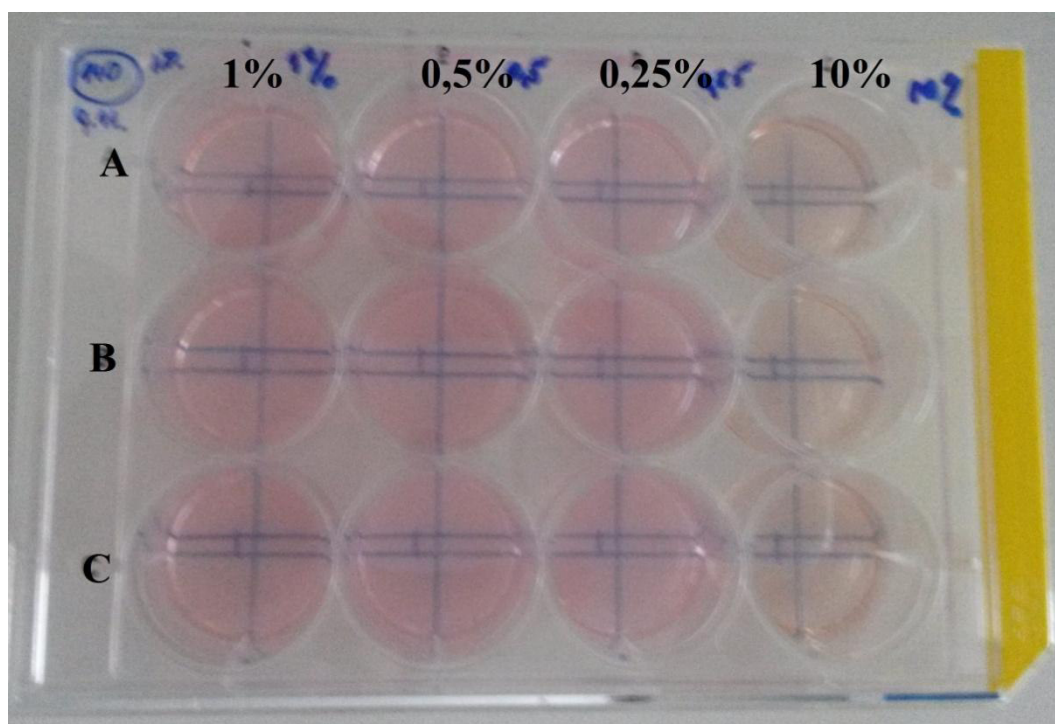
Nejprve byla připravena dvanácti jamková deska a to tak, že na spodní straně každé jamky byl narýsován čtverec o straně 2×2 mm, který byl pravidelně fotografován pomocí kamery na inverzním mikroskopu. Při pasážování buněk byla spočítána četnost (denzita) v buněčné suspenzi pomocí Bürkerovy komůrky.

T0	pasážování buněk, naředění buněčné suspenze a rozpipetování do jamkové desky, buňky v médiu DMEM/F12 s 10% FBS
T1	první vyfotografování jamek, spočítání buněk v počítacích čtvercích na jamkách, výměna média za médium DMEM/F12 s 0,1 % BSA
T2	druhé vyfotografování jamek, spočítání buněk v počítacích čtvercích na jamkách, výměna média za médium DMEM/F12 s příslušnou koncentrací séra
T3	třetí vyfotografování jamek, spočítání buněk v počítacích čtvercích na jamkách
T4	čtvrté vyfotografování jamek, spočítání buněk v počítacích čtvercích na jamkách, výměna média za nové médium DMEM/F12 s příslušnou koncentrací séra
T7	poslední vyfotografování jamek, spočítání buněk v počítacích čtvercích na jamkách

Obrázek 13 Schéma průběhu prací při testování vlivu koncentrace séra na růst buněk, doba mezi jednotlivými kroky je 24 hodin. Další experimenty měly stejný průběh. FBS – fetální bovinní sérum

Pro proliferační test byly buňky v čase T0 (Obrázek 13) přesazeny do dvanácti jamkové desky o koncentraci 9 000 buněk/ml s 1 ml kultivačního média (DMEM) s 10 % fetálním bovinním sérem (FBS) pro každou jamku. Na 24 hodin byla jamková deska umístěna do termostatu s 5 % oxidu uhličitého a 37°C. Během této doby buňky adherovaly a začaly proliferovat. V čase T1 byly jamky zdokumentovány pomocí kamery na mikroskopu. Poté bylo základní médium odsáto a bylo nahrazeno 1 ml média s 0,1% roztokem BSA (bovinní sérový albumin) pro každou jamku. Po 24 hodinové kultivaci byla jamková deska vyfotografována (T2) a poté bylo médium s 0,1% roztokem BSA nahrazeno základním médiem s tepelně inaktivovaným fetálním bovinním sérem o různých koncentracích. Zvolené koncentrace inaktivovaného FBS byly 1%, 0,5%, 0,25% a 10%. Vždy do tří jamek byl napipetován 1 ml média se stejnou zvolenou koncentrací inaktivovaného séra (Obrázek 14). Deska byla znovu 24 hodin kultivována a následně vyfotografována v čase T3. Poté byla opět provedena kultivace do druhého dne, kde byly jamky opět vyfotografovány v čase T4 a bylo jim vyměněno médium za nové, koncentrace inaktivovaného séra byly pro dané jamky zachovány. Následovala kultivace do času T7, kdy byly jamky opět vyfotografovány. Pro zpracování výsledků byly buňky v jednotlivých jamkách a časech spočítány. Pro každou

koncentraci byla provedena tři opakování v rámci jednoho testu a tento test byl opakován třikrát.



Obrázek 14 Proliferační test – vliv koncentrace séra na růst buněk. Snímek kultivační desky s narýsovanými počítacími čtverci 2×2 mm, sloupce znázorňují jednotlivé použité koncentrace tepelně inaktivovaného fetálního séra, řádky A, B, C znamenají jednotlivé opakování v rámci testu.

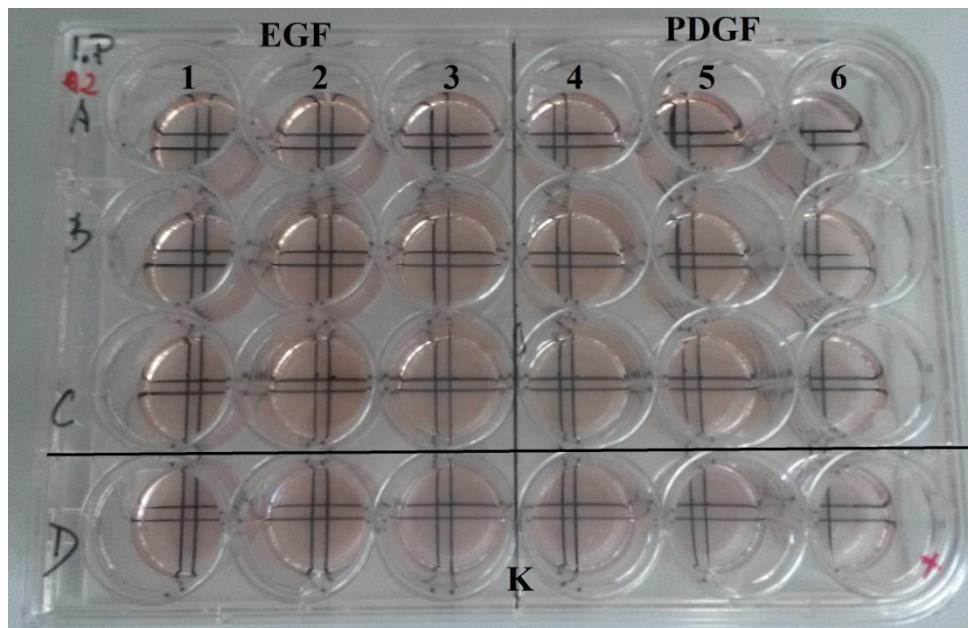
Testování vlivu koncentrace růstových faktorů HB-EGF a PDGF-BB na proliferaci buněk

Proliferační test pro vliv koncentrace růstových faktorů měl podobný průběh jako test pro vliv koncentrace séra, probíhal však ve dvaceti čtyř jamkové desce. Opět byly na spodní stranu jamek narýsovány 2×2 mm čtverce, které byly pravidelně dokumentovány pomocí kamery na mikroskopu. Pro experiment byly zvoleny následující koncentrace růstových faktorů:

pro EGF 0,5 ng/ml (tato koncentrace je doporučena výrobcem), 5 ng/ml a 50 ng/ml,
pro PDGF 0,5 ng/ml, 5 ng/ml (koncentrace doporučená výrobcem) a 50 ng/ml.

Při pasážování buněk v základní láhvi T75 byla odebrána buněčná suspenze a pomocí Bürkerovy komůrky byly buňky spočítány (čas T₀). Buňky byly zředěny na koncentraci 15 000 buněk/ml v základním médiu s 10% FBS. Takto připravená buněčná suspenze byla rozpipetována po 0,5 ml do jamek a deska byla vložena do termostatu vyhřátého na 37°C s 5% CO₂ atmosférou na 24 hodin. Po uplynulé době byly jednotlivé jamky vyfotografovány (T₁), médium bylo odsáto a vyměněno za nové médium s 0,1% BSA a deska byla opět vložena do termostatu. Po dalších 24 hodinách byly jamky opět vyfotografovány (T₂). Bylo připraveno médium (DMEM/F12) s 1% inaktivovaným fetálním bovinním sérem. Takto připravené médium sloužilo pro přípravu jednotlivých koncentrací růstových faktorů

a pro kontrolu. Pro každý test musely být nachystány čerstvé roztoky růstových faktorů. Staré médium bylo z desky odsáto a nahrazeno připraveným médiem s 1% inaktivovaným FBS a danou koncentrací růstového faktoru. Také byla provedena kontrola, kde bylo přidáno pouze médium s 1% inaktivovaným FBS bez růstových faktorů (Obrázek 15). Deska byla opět vložena do termostatu na 24 hodin, poté byla opět vyfotografována (T3) a uložena zpět do termostatu. Po dalších 24 hodinách v čase T4 byla deska opět vyfotografována a médium bylo vyměněno za nové, umístění jednotlivých koncentrací růstových faktorů a kontroly bylo zachováno. V čase T7, teda po 7 dnech od začátku testu, byly jednotlivé jamky naposledy vyfotografovány. Pro zpracování výsledků byly buňky v jednotlivých jamkách a časech spočítány. V rámci jednoho testu byla pro každou koncentraci provedena tři opakování a celý test byl opakován třikrát.

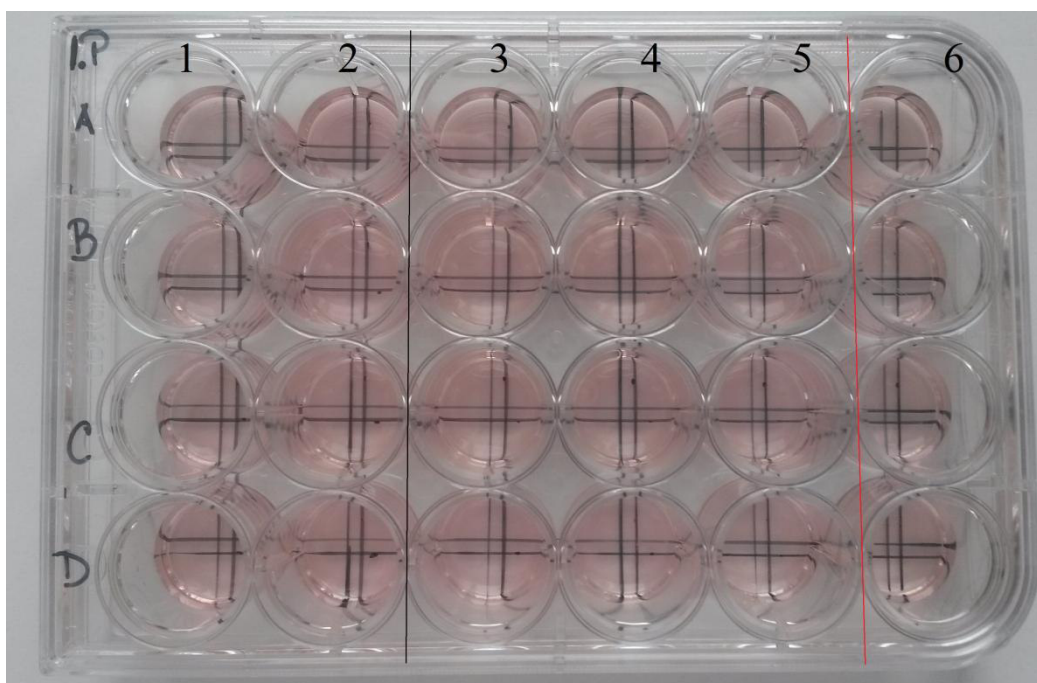


Obrázek 15 Proliferační test – vliv koncentrace růstových faktorů EGF a PDGF na proliferaci buněk. Snímek kultivační desky s narýsovanými počítacími čtverci 2×2 mm, na levé straně desky bylo médium s EGF - jamky A1, A2, A3 obsahovaly médium s 1% inaktivovaným FBS a EGF v koncentraci 0,5 ng/ml, jamky B1, B2, B3 obsahovaly médium s 1% inaktivovaným FBS a EGF v koncentraci 5 ng/ml, jamky C1, C2, C3 obsahovaly médium s 1% inaktivovaným FBS a EGF v koncentraci 50 ng/ml, pravá strana obsahovala médium s 1% inaktivovaným FBS a příslušnou koncentrací PDGF a to tak, že jamky A4, A5, A6 obsahovaly 0,5 ng/ml PDGF, B4, B5, B6 obsahovaly 5 ng/ml PDGF a jamky C4, C5, C6 obsahovaly 50 ng/ml PDGF, jamky D1 až D6 sloužily jako kontrola (K) a obsahovaly pouze médium s 1% inaktivovaným fetálním bovinním sérem (FBS).

Testování vlivu koncentrace růstového faktoru bFGF na proliferaci buněk

Proliferační test pro vliv koncentrace bFGF byl prováděn samostatně. Probíhal stejným způsobem jako proliferační test pro vliv koncentrace růstových faktorů HB-EGF a PDGF-BB. V čase T0 byly na dvacet čtyř jamkovou desku narýsovány čtverce o straně 2×2 mm, které byly pravidelně dokumentovány pomocí kamery na inverzním mikroskopu a také v nich byly počítány buňky. Při pasážování byla buněčná suspenze naředěna na 12000 buněk/ml do kultivačního média s 10 % FBS a rozpipetována po 0,5 ml do jamek. Po 24 hodinách

v termostatu byly čtverce vyfotografovány (T1) a médium bylo vyměněno za nové s 0,1% BSA. V čase T2 byly čtverce opět vyfotografovány a médium bylo vyměněno za nové (Obrázek 16). První sloupec jamek byl použit jako kontrola a tudíž dostal médium pouze s 1% inaktivovaným FBS, druhý sloupec sloužil jako pozitivní kontrola a médium bylo vyměněno za médium s 1% inaktivovaným FBS a 5 ng/ml PDGF-BB. Další tři sloupce obsahovaly médium s 1% inaktivovaným FBS a příslušnou koncentraci bFGF. V pořadí třetí sloupec obsahoval 0,01 ng/ml bFGF, čtvrtý sloupec 0,1 ng/ml bFGF, což je také koncentrace doporučená výrobcem. Pátý sloupec obsahoval 0,5 ng/ml bFGF. Poslední sloupec zůstal nevyužitý. Kultivace probíhala dalších 48 hodin, kdy byly čtverce po 24 hodinách v čase T3 a následně T4 vyfotografovány. V čase T4 bylo také buňkám vyměněno médium za nové, složení médií zůstalo pro sloupce stejné. Kultivace jamkové desky probíhala až do času T7, kdy byla deska naposledy vyfotografována. Buňky byly v jednotlivých čtvercích a časech spočítány a vyhodnoceny. V rámci jednoho testu byla prováděna čtyři opakování a test byl dvakrát opakován.



Obrázek 16 Proliferační test – vliv koncentrace bFGF na proliferaci buněk. Snímek kultivační desky s narýsovanými počítacími čtverci 2×2 mm, sloupec 1 obsahoval kontrolu čili médium s 1% inaktivovaným FBS, ostatní sloupce obsahovaly médium s 1 % inaktivovaným FBS a příslušnou koncentraci růstového faktoru – sloupec 2 obsahoval 5 ng/ml PDGF-BB, sloupec 3 obsahoval 0,01 ng/ml bFGF, sloupec 4 obsahoval 0,1 ng/ml bFGF, sloupec 5 obsahoval 0,5 ng/ml bFGF, sloupec 6 se neúčastnil testu, jednotlivé řádky A, B, C, D znamenají opakování pro daný typ složení kultivačního média.

Testování inhibice růstového faktoru PDGF-BB adiponektinem

Proliferační test, při kterém byla stanovena biologická aktivita adiponektinu, probíhal podobně jako dva výše uvedené typy testů. V čase T0 byla přichystána dvaceti čtyř jamková

deska, na jejíž spodní stranu byly narýsovány čtverce o straně 2×2 mm. Při pasážování buněk v kultivační láhvi T75 byl odebrán 1 ml suspenze buněk, po obarvení trypanovou modří byly buňky spočítány pod mikroskopem pomocí Bürkerovy komůrky. Poté byla buněčná suspenze naředěna do zkumavky obsahující 12 ml média s 10% sérem (FBS) na požadovanou koncentraci 12 000 buněk/ml. Takto připravená buněčná suspenze byla rozpipetována po 0,5 ml do každé jamky a deska byla vložena do termostatu na 24 hodin. V čase T1 byly buňky v jamkách vyfotografovány a bylo jim vyměněno médium za médium s 0,1% BSA a opět byla deska vložena do termostatu. Po dalších 24 hodinách v čase T2 byly jamky opět vyfotografovány a bylo přichystáno nové médium. Deska byla rozdělena do šesti sloupců. Prvnímu sloupci jamek bylo médium vyměněno za médium s 1% inaktivovaným FBS (kontrola). Druhému sloupci jamek se staré médium vyměnilo za médium, které obsahovalo 1% inaktivovaného FBS a 5 ng/ml růstového faktoru PDGF-BB. Třetí a čtvrtý sloupec jamek dostal nové médium s 1% inaktivovaným FBS a s adiponektinem, kde třetí sloupec obsahoval 20 µg/ml adiponektinu a čtvrtý 30 µg/ml. Pátému sloupci jamek bylo médium vyměněno za médium s 1% inaktivovaným FBS, 5 ng/ml PDGF-BB a 20 µg/ml adiponektinu, poslední sloupec po výměně média obsahoval médium s 1% inaktivovaným FBS, 5 ng/ml PDGF-BB a 30 µg/ml adiponektinu (Tabulka 1). Takto připravená deska byla opět vložena na 24 hodin do termostatu. V časech T3 a T4 byly jednotlivé čtverce na jamkách vyfotografovány. Buňky na jednotlivých fotografiích byly spočítány. V rámci jednoho testu byla pro každý sloupec čtyři opakování (A až D) a test byl dvakrát celý zopakován.

Tabulka 1 Rozdělení koncentrací na jamkové desce, schematické znázornění rozložení jednotlivých typů složení média pro kultivační desku, řádky A, B, C, D jsou opakování pro daný typ složení média. DMEM/F12 – použité médium, inaktiv. FBS – inaktivované fetální bovinní sérum, PDGF – růstový faktor.

	1	2	3	4	5	6
A	Kontrola	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
B	DMEM/F12	s 1%	s 1%	s 1%	s 1%	s 1%
C	inaktiv. FBS	inaktiv. FBS +	inaktiv. FBS	inaktiv. FBS	inaktiv. FBS	inaktiv. FBS
D	FBS	5 ng/ml	+ 20 µg/ml	+ 30 µg/ml	+ 20 µg/ml	+ 30 µg/ml
		PDGF	adiponektinu	adiponektinu	adiponektinu	adiponektinu
					+ 5 ng/ml	+ 5 ng/ml
					PDGF	PDGF

Testování inhibice růstových faktorů PDGF-BB a bFGF lyofilizovaným adiponektinem

Tento proliferační test probíhal podobným způsobem jako předchozí proliferační test pro biologickou aktivitu adiponektinu. Pro tento test byl použit lyofilizovaný adiponektin, který byl rozpuštěn v DMEM/F12 na koncentraci 250 µg/ml. Kromě bFGF byla biologická aktivita adiponektinu znovu stanovena pro 5 ng/ml PDGF-BB. Na spodní stranu jamkové kultivační desky byly narýsovány čtverce o straně 2×2 mm. Při pasážování buněk byl odebrán 1 ml buněčné suspenze. Po obarvení trypanovou modří byla spočtena koncentrace buněk pomocí Bürkerovy komůrky. Bylo připraveno médium s 10% FBS o koncentraci

12 000 buněk/ml. Tato suspenze buněk byla rozpipetována po 0,5 ml do každé jamky kultivační desky a deska byla vložena do termostatu na 24 hodin. Poté byly čtverce na desce v čase T1 zdokumentovány pomocí kamery na mikroskopu a médium bylo vyměněno za médium s 0,1% BSA. Po 24 hodinách v čase T2 byla deska opět vyfotografována. Médium s BSA bylo nahrazeno novým médiem. První sloupec obsahoval kontrolu, tedy pouze médium s 1 % inaktivovaným FBS. Druhý sloupec obsahoval médium s 1 % inaktivovaným FBS a 30 µg/ml adiponektinu. Třetí sloupec obsahoval médium s 1 % inaktivovaným FBS a 0,1 ng/ml bFGF. Čtvrtý sloupec obsahoval médium s 1 % inaktivovaným FBS, 0,1 ng/ml bFGF a 30 µg/ml adiponektinu. Pátý sloupec obsahoval médium s 1 % inaktivovaným FBS a 5 ng/ml PDGF-BB. Šestý sloupec obsahoval médium s 1 % inaktivovaným FBS, 5 ng/ml PDGF-BB a 30 µg/ml adiponektinu. Deska po výměně média byla vložena do termostatu a po 24 hodinách vyfotografována v čase T3. Po čtyřech dnech od začátku testu (T4) byla deska vyfotografována a médium bylo vyměněno za nové. Po sedmi dnech od začátku testu (T7) byla deska opět vyfotografována. Rozmístění jednotlivých koncentrací na desce znázorňuje tabulka 2. Buňky v jednotlivých časech a jamkách byly spočítány a výsledky zpracovány. V rámci jednoho testu byly tři opakování.

Tabulka 2 Rozdělení jednotlivých koncentrací na kultivační desce, schematické znázornění rozložení jednotlivých typů složení média pro kultivační desku, řádky A, B, C jsou opakování pro daný typ složení média. DMEM/F12 – použité médium, inaktiv. FBS – inaktivované fetální bovinní sérum, PDGF, bFGF – růstové faktory.

	1	2	3	4	5	6
A	Kontrola DMEM/F12 s 1% inaktiv. FBS	DMEM/F12 s 1% inaktiv. FBS + 30 µg/ml adiponektinu	DMEM/F12 s 1% inaktiv. FBS + 0,1 ng/ml bFGF	DMEM/F12 s 1% inaktiv. FBS + 30 µg/ml adiponektinu + 0,1 ng/ml bFGF	DMEM/F12 s 1% inaktiv. FBS + 5 ng/ml PDGF	DMEM/F12 s 1% inaktiv. FBS + 30 µg/ml adiponektinu + 5 ng/ml PDGF
B						
C						

4.4.4. Statistické vyhodnocení dat

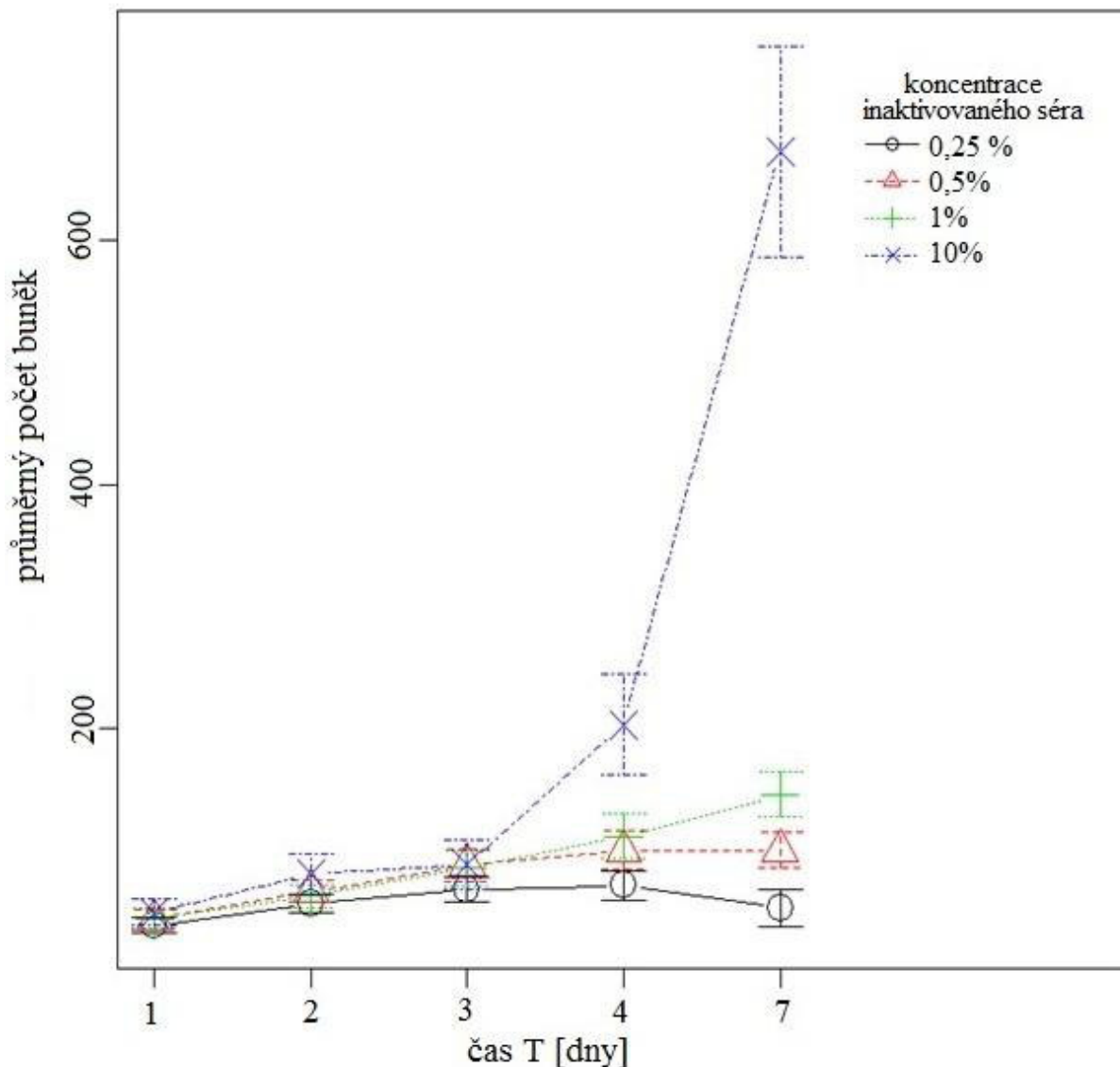
Všechna data byla statisticky zpracována pomocí statistického programu "R" a jeho podprogramu R commander. Data byla podle potřeby transformována (logaritmována, odmocněna), aby odpovídala normálnímu rozložení. Normalita data byla ověřena pomocí Shapiro-Wilk test normality. Data byla zpracována statistickou metodou ANOVA (Analysis of variance - analýza rozptylu). Byla také provedena sumarizace dat. Vybrané grafy byly zpracovány tímto programem funkcí plot of means. Výsledky z analýzy rozptylu jsou uvedeny v kapitole 11.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Experimentální část byla zaměřena na stanovení biologické aktivity rekombinantního adiponektinu s růstovými faktory, které se běžně vyskytují v lidském těle. Jednalo se o epidermální růstový faktor HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor), růstový faktor z destiček PDGF-BB (platelet derived growth factor) a bazický fibroblastový růstový faktor bFGF (basic fibroblast growth factor). Různé formy adiponektinu (LMW, MMW, HMW) interagují s různými růstovými faktory. PDGF-BB interaguje s vysokomolekulární (HMW) a středněmolekulární (MMW) formou adiponektinu. bFGF se váže na vysokomolekulární formu a HB-EGF má stejnou afinitu ke všem formám adiponektinu. Experimenty byly provedeny pomocí proliferačních testů buněčné kultury 3T3-L1 buněk. Nejprve musela být vybrána vhodná koncentrace séra. Poté byl růst buněk stimulován růstovými faktory. Biologická aktivita adiponektinu byla následně stanovena mírou inhibice růstu buněčné kultury 3T3-L1 při použití vybraného růstového faktoru, který vykazoval největší stimulaci pro růst buněk. Také byla otestována biologická aktivita lyofilizovaného adiponektinu.

5.1. Vliv koncentrace séra na růst buněk

Pro správný růst a dělení buněk *in vitro* se většinou do kultivačního média přidává sérum. Jeho koncentrace hraje důležitou roli pro proliferaci buněk, proto bylo nezbytné, nejprve zjistit minimální možnou koncentraci séra, aby neovlivňovala dalších experimenty. Vhodná koncentrace séra byla stanovena s využitím průběhu nárůstu počtu buněk. Bylo požadováno, aby počet buněk během proliferačního testu plynule stoupal a aby ani na konci testu nevykazoval úbytek buněk například vyčerpáním potřebných živin. Pro tento experiment bylo zvoleno tepelně inaktivované fetální bovinní sérum. Zahříváním na 56°C při 30 minutách dochází k inaktivaci komplementů a dalších důležitých faktorů v séru. Pro další experimenty je důležité tyto látky inaktivovat, aby nedocházelo k ovlivnění výsledků [33]. Byly zvoleny tři minimální koncentrace inaktivovaného FBS a to 1%, 0,5% a 0,25%. Do experimentu byla také zařazena koncentrace s 10% inaktivovaného FBS, při které jsou buňky běžně kultivovány.



Obrázek 17 Vliv koncentrace inaktivovaného FBS na růst buněk 3T3-L1. Růst buněčné linie 3T3-L1 vyjádřený jako průměrný počet buněk pro danou koncentraci inaktivovaného fetálního séra v daném čase měření, černá křivka znázorňuje přidavek 0,25% séra, červená přidavek 0,5% séra, zelená přidavek 1% séra a modrá přidavek 10% séra, průměr počtu buněk je vyhodnocen z devíti naměřených hodnot, chybové úsečky zobrazují standardní chybu. Analýza rozptylu (Multi-way ANOVA) potvrdila, že koncentrace inaktivovaného PBS má statisticky významný vliv na počet buněk (proliferaci), $P < 0,001$.

Koncentrace inaktivovaného séra měla vliv na růst buněk 3T3-L1 (Obrázek 17). Počet buněk pro koncentraci inaktivovaného FBS 0,25% až do času T4 pozvolna stoupl, ale v čase T7 došlo k úbytku buněk. Tento úbytek mohl být způsoben vyčerpáním živin. Podobný průběh měla i růstová křivka pro přidavek 0,5% inaktivovaného FBS, ale počet buněk se na konci experimentu neměnil. Počet buněk pro přidavek 1% FBS pozvolna rostl během celého experimentu. Také počet buněk při použití 10% inaktivovaného FBS rostl během celého experimentu. Avšak v čase T4 a T7 došlo k vysokému nárůstu buněk. Z průběhu růstových křivek vyplývá, že koncentrace séra 0,25% a 0,5% nebyly vhodné pro další experimenty. Pro další test bylo nezbytné, aby počet buněk během celého experimentu stoupl. Tento

požadavek splňuje koncentrace inaktivovaného séra 1% a 10%. Byla však vybrána koncentrace s 1% sérem, protože se jedná o nejnižší možný obsah séra, který podporuje růst buněk.

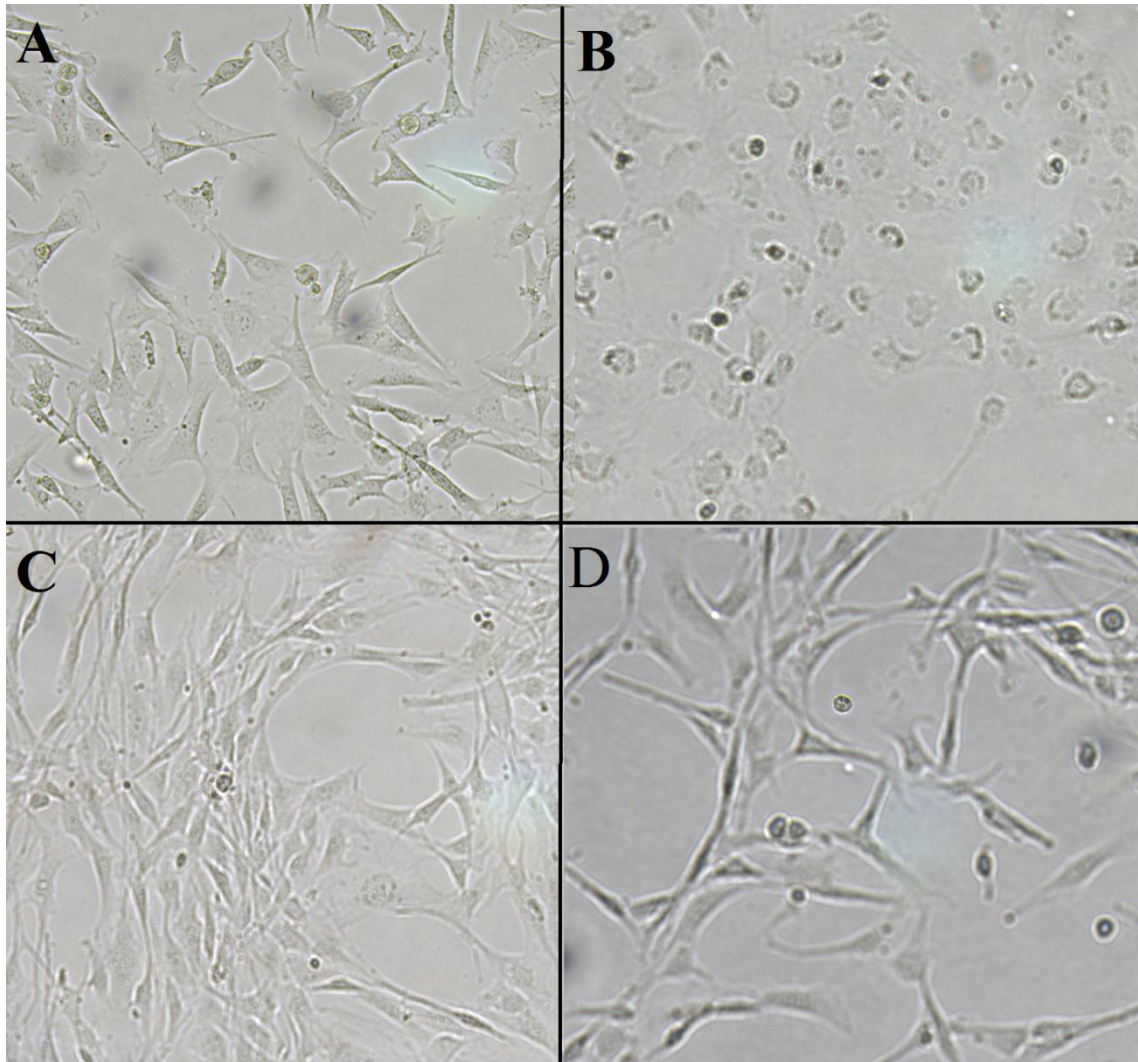
Běžně se pro kultivaci buněk 3T3-L1 používá 10% FBS [6]. V imunologických pokusech a pro testování růstových faktorů, kde by mohly složky séra ovlivňovat výsledky, se používá inaktivované sérum. Médium s 1% inaktivovaným FBS, které v experimentu bylo vybráno jako nejvhodnější pro další plánované pokusy, používaly také v jiných výzkumech s buněčnou linií 3T3-L1 [30].

Počet buněk byl stanoven jednoduchým počítáním buněk v narýsovaném čtverci. Na začátku experimentu byly buňky naředěny na požadovanou koncentraci buněk/ml a tato suspenze byla napipetována do jamek. Druhý den (po usazení buněk - T1) byly buňky vyfotografovány a spočítány. Koncentraci buněk lze stanovit i jinými metodami, například pomocí luminiscence či fluorescence. Při luminiscenci jsou buňky na konci experimentu transfekovány luciferázovým vektorem [34]. Pro fluorescenční stanovení se využívá ^3H tyminu a 5'-BrdUrd fluorescenční imunolabelingu [35].

5.2. Vliv koncentrace růstových faktorů

Pro stimulaci růstu se využívají růstové faktory. Stimulace růstu byla provedena pomocí tří růstových faktorů: epidermální růstový faktor vázající heparin HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor), růstový faktor z destiček PDGF-BB (platelet derived growth factor) a bazický fibroblastový růstový faktor bFGF (basic fibroblast growth factor). První proliferační test pro vliv koncentrace růstových faktorů byl proveden s HB-EGF a PDGF-BB. U těchto růstových faktorů byly zvoleny tři koncentrace (0,5 ng/ml, 5 ng/ml a 50 ng/ml). V testu s bFGF byla zvolena koncentrace 0,01ng/ml, 0,1 ng/ml a 0,5 ng/ml. U každého testu byla také provedena kontrola, která obsahovala pouze médium s přídavkem 1% inaktivovaného FBS bez růstových faktorů.

Během průběhu testu byly pozorovány morfologické změny buněk. Přítomnost růstových faktorů ovlivnila tvar buněk (Obrázek 18).



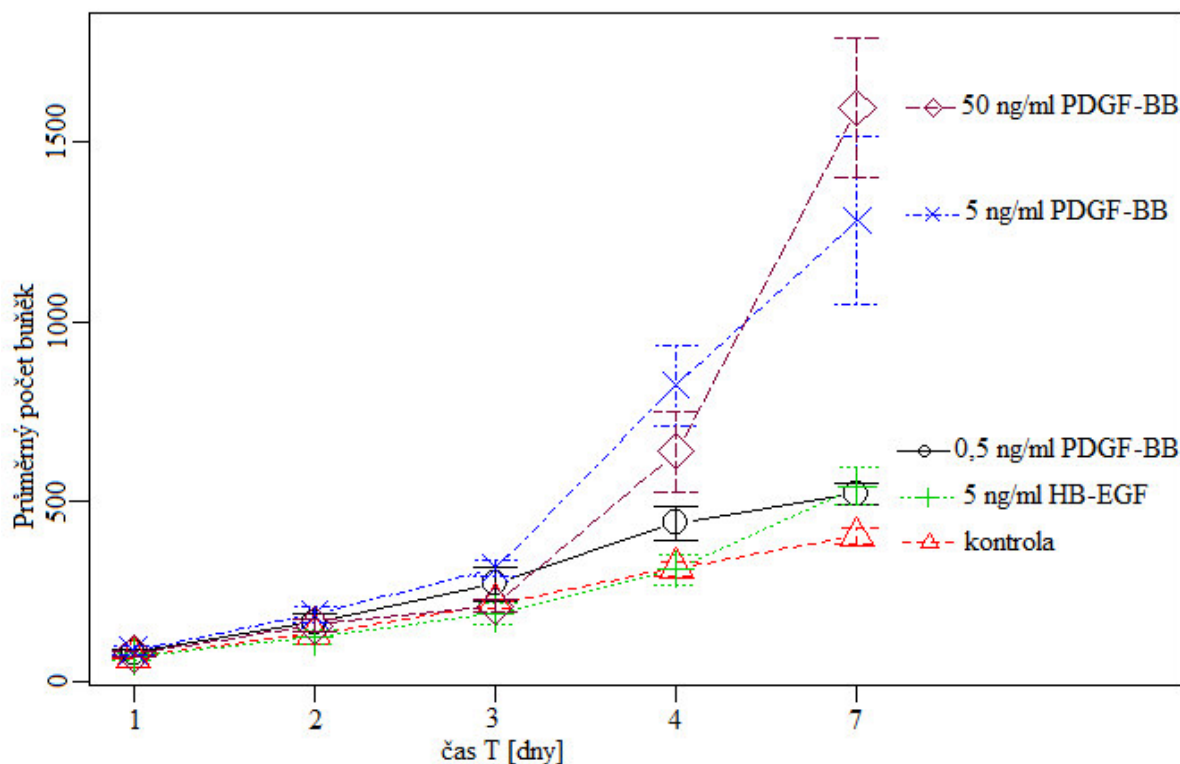
Obrázek 18 Změna tvaru buněk v přítomnosti růstových faktorů. Jednotlivé snímky byly pořízeny kamerou mikroskopu během experimentu, zvětšení 10x10, A – běžný tvar buněk v médiu s FBS, B – tvar buněk v médiu s 1% inaktivovaným FBS a 5 ng/ml HB-EGF v čase T7, C – tvar buněk v médiu, které obsahovalo 1% inaktivované FBS a 5 ng/ml PDGF-BB v čase T4, D – tvar buněk v médiu s 1% inaktivovaným FBS a 0,1 ng/ml bFGF v čase T4.

Změna tvaru buňky za přítomnosti EGF byla pomalejší, největší rozdíly proti kontrole byly znatelné až za sedm dní. Zatímco změna za přítomnosti faktorů PDGF-BB a bFGF byla zjevná již za 4 dny od začátku pokusu.

Buňky v přítomnosti PDGF-BB měly protáhlý tvar, což mohlo být způsobeno tím, že PDGF ovlivňuje migraci buněk a chemotaxi [4]. Také přítomnost bFGF v médiu způsobila protažení buněk. I tento faktor podporuje migraci buněk [4]. Protažení buněk v přítomnosti FGF je například popsán ve studii CHoh Hao Li, kde přítomnost FGF způsobila protažení buněk 3T3. Po působení trypsinu měly buňky opět svůj původní tvar [36]. Přítomnost EGF měla na buňky odlišný účinek. Kontakt mezi buňkami zůstal zachován, ale dominantní je kulovitý útvar buňky.

5.2.1. Vliv koncentrace růstových faktorů HB-EGF a PDGF-BB na proliferaci buněk

Růstové faktory stimulují růst buněk, proto by měl být nárůst buněk za přítomnosti růstových faktorů znatelně vyšší než nárůst buněk pouze v přítomnosti séra (kontrola).



Obrázek 19 Vliv koncentrace růstových faktorů HB-EGF a PDGF-BB na proliferaci buněk, růst buněčné linie 3T3-L1 vyjádřený jako průměrný počet buněk v čase, průměrné hodnoty jsou spočítány ze 6 naměřených hodnot, chybové úsečky znázorňují standardní chybu. Analýza rozptylu (Multi-way ANOVA) potvrdila, že přítomnost růstového faktoru PDGF-BB má statisticky významný vliv na proliferaci buněk, $P < 0,001$.

Přítomnost růstových faktorů neměla vliv pouze na změnu morfologie buněk, ale také na růst buněk (Obrázek 19). Počet buněk u kontroly, kde bylo použito pouze médium s 1% inaktivovaným FBS, pozvolna narůstal během celého testu. Za přítomnosti růstového faktoru HB-EGF ve všech použitých koncentracích (0,5 ng/ml, 5 ng/ml, 50 ng/ml) buňky rostly podobně jako kontrola. Pro přehlednost byla v grafu vyznačena pouze koncentrace 5 ng/ml EGF, protože všechny koncentrace měly stejný průběh. Stimulace pomocí PDGF-BB je rozdílná pro různé použité koncentrace (0,5 ng/ml, 5 ng/ml a 50 ng/ml). Průběh nárůstu počtu buněk s 0,5 ng/ml PDGF-BB je pozvolný a nejmenší z ostatních koncentrací a také se příliš neliší od průběhu nárůstu buněk u kontroly. U koncentrací růstového faktoru PDGF-BB 5 ng/ml a 50 ng/ml je již stimulace růstu buněk 3T3-L1 znatelná. Celkový průběh jejich růstových křivek je odlišný proti průběhu růstové křivky kontroly. Po čtyřech dnech od rozsazení buněk (T4) dochází k výraznému zvýšení počtu buněk. Dokonce nárůst buněk s 5 ng/ml PDGF-BB je vyšší nežli nárůst buněk s 50 ng/ml PDGF-BB. Po sedmi dnech se počet buněk dokonce zněkolikanásobnil proti kontrole. V tomto čase ale byla stimulace buněk v přítomnosti 50 ng/ml PDGF-BB vyšší nežli u buněk s 5 ng/ml PDGF-BB.

V přítomnosti růstového faktoru HB-EGF při všech testovacích koncentracích docházelo pouze k mírné stimulaci růstu buněk 3T3-L1, ale přítomnost HB-EGF měla staticky významný vliv na růst buněk ($P < 0,001$). Díky nízké stimulaci však HB-EGF nebylo využíváno v dalších experimentech. Průběhy křivek pro všechny použité koncentrace HB-EGF byly srovnatelné s kontrolou.

Všeobecně však růstový faktor EGF dostatečně stimuluje růst buněk 3T3-L1. Vliv EGF na růst buněk je popsán v několika studiích [30, 37]. Mírná stimulace v experimentu mohla být zapříčiněná změnou buněk 3T3-L1 při pasážování buněk nebo inaktivováním stimulace dlouhým uchováním růstového faktoru při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

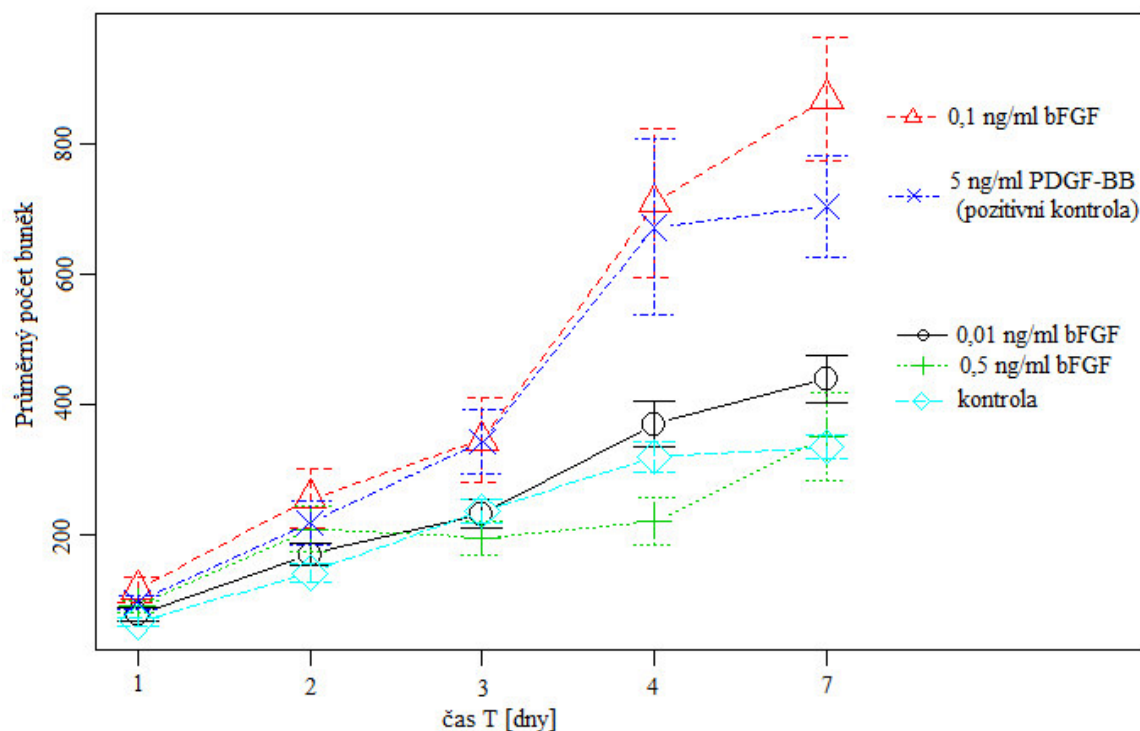
Koncentrace 5 ng/ml a 50 ng/ml růstového faktoru PDGF-BB stimulovala růst buněk 3T3-L1. Již druhý den po přidání růstových faktorů (T4) dochází k znatelnému nárůstu buněk. Pro další experimenty byl vybrán růstový faktor PDGF-BB a to o koncentraci 5 ng/ml. Také byl nadcházející experiment (stanovení biologické aktivity adiponektinu) zkrácen do času T4, protože již v tomto čase byla stimulace buněk prokazatelná.

Pro další experimenty tedy byla vybrána koncentrace růstového faktoru PDGF 5 ng/ml. Tato koncentrace vykazovala prokazatelnou stimulaci růstu. Často je také využívána pro stimulaci růstu buněk 3T3-L1 koncentrace růstového faktoru PDGF 10 ng/ml [30, 38].

5.2.2. Vliv koncentrace růstového faktoru bFGF na proliferaci buněk

Pro stimulaci buněk byl také vybrán růstový faktor bFGF. Pro tento experiment byla koncentrace buněk/ml na počátku snížena na 12 000 buněk/ml od předchozího testu (stimulace růstu pomocí HB-EGF a PDGF-BB), kde byla původní koncentrace 15 000 buněk/ml. Koncentrace buněk/ml byla snížena z důvodu rychlého růstu buněk a kvůli kontaktní inhibici buněk v čase T7.

Stimulace buněk pomocí bFGF probíhala ve třech koncentracích 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml a 0,5 ng/ml. Také byla provedena kontrola, která obsahovala pouze médium s 1% inaktivovaným FBS a také byla do pokusu zařazena pozitivní kontrola s růstovým faktorem PDGF-BB. Jeho stimulace růstu buněk 3T3-L1 byla potvrzena v předchozím testu. Také použitá koncentrace 5 ng/ml PDGF-BB byla vybrána vzhledem k výsledkům předchozího testu.



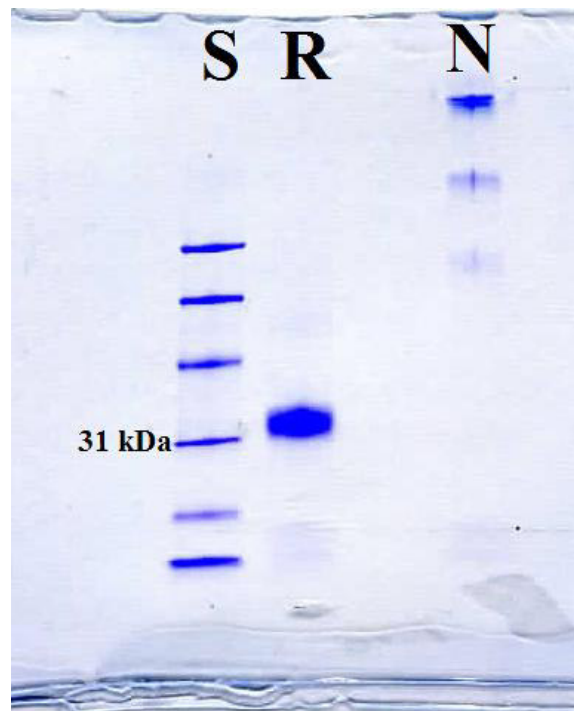
Obrázek 20 Vliv koncentrace růstového faktoru bFGF na proliferaci buněk 3T3-L1. Graf znázorňuje závislost průměrného počtu buněk na čase pro jednotlivé koncentrace bFGF, pozitivní kontrolu (PDGF-BB) a kontrolu, průměrné hodnoty jsou spočítány ze 7 naměřených hodnot, chybové úsečky znázorňují standardní chybu. Analýzou rozptylu (Multi-way ANOVA) byl stanoven statisticky významný vliv ($P < 0,001$) růstového faktoru bFGF na proliferaci buněk 3T3-L1.

Růstový faktor bFGF měl ve všech použitých koncentracích vliv jak na tvar buněk, tak na jejich růst. Vliv bFGF na proliferaci buněk však nebyl pro všechny koncentrace pozitivní (Obrázek 20). Kontrola, kde bylo použito pouze médium s 1% inaktivovaným FBS, vykazovala po celý průběh testu nárůst buněk. Stimulace pomocí růstového faktoru PDGF-BB (pozitivní kontrola) je i v tomto případě znatelná proti kontrole. Křivka vykazuje po celý průběh testu stoupající trend, i když v čase T7 se nárůst buněk zpomalil. Koncentrace 0,01 ng/ml bFGF nevykazuje stimulaci buněk. Křivka této koncentrace má sice stále narůstající trend, ale příliš se neliší od kontroly. Médium s 0,1 ng/ml bFGF stimulovalo růst buněk. Průběh křivky vykazuje po celou dobu testu stoupající trend. Průměrný nárůst buněk koreluje s průměrným nárůstem buněk stimulovaných růstovým faktorem PDGF-BB o koncentraci 5 ng/ml. Přítomnost 0,5 ng/ml bFGF měla na růst buněk spíše negativní vliv. V čase T4 došlo pouze k malému nárůstu počtu buněk a růstová křivka se nachází pod kontrolou. Až v čase T7 dochází k výraznějšímu nárůstu buněk.

Přítomnost růstového faktoru bFGF v médiu DMEM/F12 ovlivnila růst buněk. K významné stimulaci růstu buněk 3T3-L1 došlo v médiu s 0,1 ng/ml bFGF. Tato koncentrace růstového faktoru bFGF je vhodná pro další experiment, který může být zkrácen do času T4, kde vykazoval dostatečný nárůst buněk proti kontrole. Zato vyšší koncentrace růstového faktoru bFGF (0,5 ng/ml) mírně inhibovala růst buněk. Počet buněk po přidání 0,5 ng/ml bFGF klesl. Aklimatizace buněk trvala okolo 3 až 5 dní, poté počet buněk mírně stoupl.

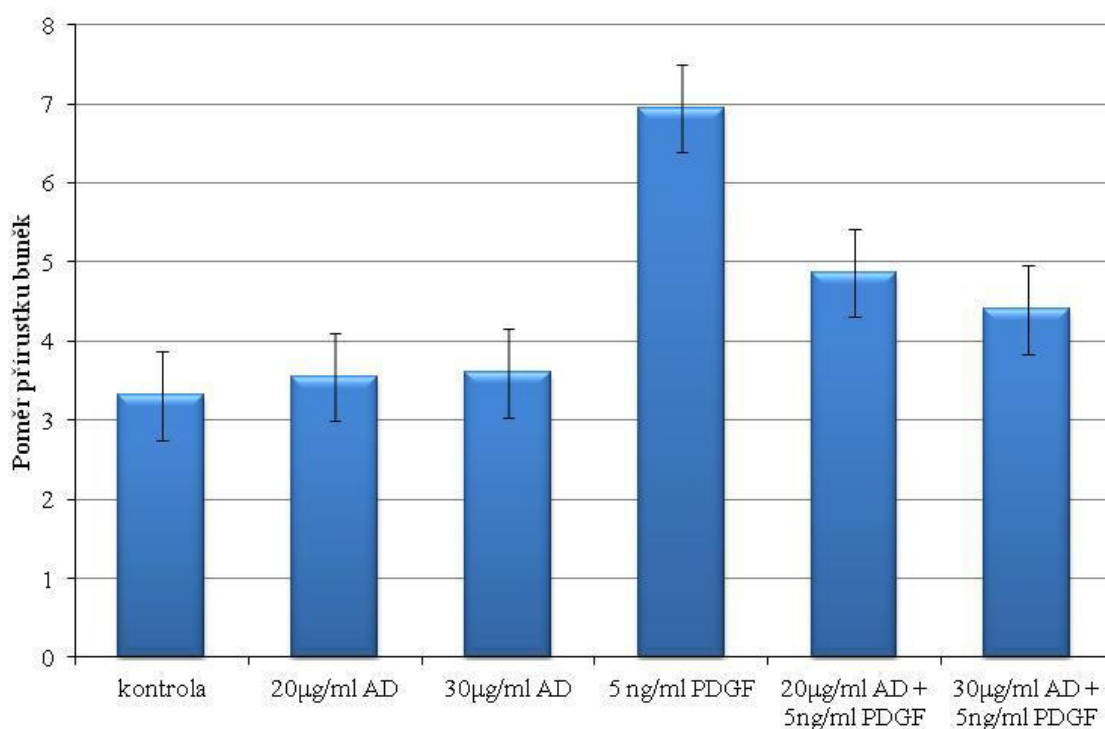
5.3. Inhibice růstového faktoru PDGF-BB adiponektinem

Biologická aktivita adiponektinu byla stanovena jako míra inhibice stimulace růstu buněk v přítomnosti růstového faktoru PDGF-BB. Růstový faktor PDGF-BB interaguje s vysokomolekulární (HMW) a středněmolekulární (MMW) formou adiponektinu. Adiponektin použitý pro tento experiment obsahoval všechny tři oligomerní formy, nejvíce však vysokomolekulární formu (Obrázek 21).



Obrázek 21 Detekce adiponektinu pomocí SDS-PAGE elektroforézy, S – standard 14 až 97 kDa, R – redukovaný vzorek adiponektinu, N – neredukovaný vzorek adiponektinu. Neredukovaný vzorek adiponektinu ukazuje tři oligomerní formy adiponektinu (LMW, MMW, HMW). Záznam o provedení SDS-PAGE elektroforézy adiponektinu znázorňuje příloha 1.

Do experimentu byla opět zařazena kontrola, která obsahovala pouze médium s 1% inaktivovaným FBS. Pro stimulaci buněk byl vybrán růstový faktor PDGF-BB o koncentraci 5 ng/ml. Adiponektin byl zvolen v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ a 30 $\mu\text{g/ml}$. Také bylo ověřeno samotné působení adiponektinu na růst buněk. Rozdílná složení média měla vliv na proliferaci buněk 3T3-L1 (Obrázek 22).



Obrázek 22 Inhibice růstového faktoru PDGF-BB adiponektinem. Sloupcový graf znázorňuje poměr přírůstku buněk v posledním čase (poměr počtu buněk v čase T4/T1). Průměrné hodnoty jsou spočítány z 8 naměřených hodnot, chybové úsečky znázorňují standardní chybu, PDGF-BB – růstový faktor, AD – adiponektin. Analýzou rozptylu (multi-way ANOVA) byla potvrzena statistická významnost inhibice růstového faktoru PDGF adiponektinem, $P < 0,001$.

Přítomnost samotného adiponektinu v médiu s 1% inaktivovaným FBS neměl vliv na růst buněk, počet buněk byl podobný jako u kontroly. Přítomnost 5 ng/ml růstového faktoru PDGF-BB v médiu stimulovala růst buněk. Přítomnost adiponektinu v médiu s růstovým faktorem PDGF ovlivnila růst buněk. Adiponektin interakcí s PDGF inhiboval jeho stimulaci na proliferaci buněk. Již 20 µg/ml adiponektinu v médiu inhibuje stimulaci 5 ng/ml PDGF-BB. Míra nárůstu buněk v posledním čase je výrazně nižší než při použití pouze PDGF-BB. Použití 30 µg/ml adiponektinu vykazuje vyšší inhibici růstového faktoru PDGF-BB.

Tímto testem byla potvrzena biologická aktivita adiponektinu, tedy inhibice stimulace růstového faktoru PDGF-BB.

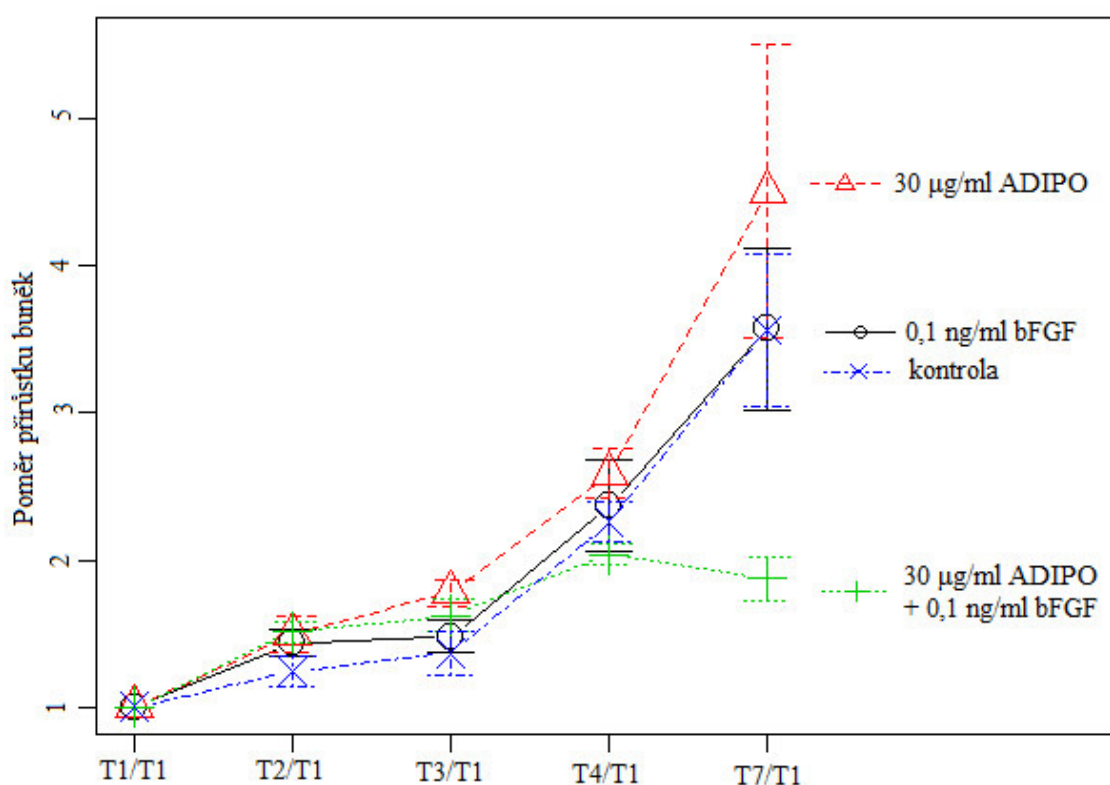
Biologickou aktivitu adiponektinu také dokazuje výzkum Yu Wang a kol. (2005). Jejich studie prokázala, že se adiponektin váže na některé růstové faktory (např. PDGF-BB) a zamezuje jejich vazbě na receptor, což vede k zeslabení mitotického účinku růstového faktoru. Vazba mezi adiponektinem a PDGF-BB je reversibilní. Také se tato studie zabývala interakcí různých forem adiponektinu s jednotlivými růstovými faktory, kde prokázala, že PDGF-BB má vazebnou afinitu k HMW a MMW formě adiponektinu [30].

Přítomnost adiponektinu v médiu s PDGF-BB nejenže inhibuje stimulaci růstu buněk, ale také inhibuje vliv PDGF-BB na migraci buněk [39].

Vliv inhibice adiponektinu s PDGF-BB se projevuje i u jiných buněk než jsou preadipocyty (linie 3T3-L1). Biologická aktivita adiponektinu byla také sledována a potvrzena v *in vitro* pokusech s lidskými aortálními buňkami hladké svaloviny (HASMCs) [30] či s mesangiálními buňkami krysy (RMC, tkáň - ledviny) [40].

5.4. Inhibice růstových faktorů bFGF a PDGF-BB lyofilizovaným adiponektinem

Adiponektin používaný v experimentu je převážně určen k prodeji a dalšímu využití například výzkumnými laboratořemi. Adiponektin se distribuuje v lyofilizovaném stavu, proto byla jeho biologická aktivita stanovena i po lyofilizaci. Pro stanovení biologické aktivity adiponektinu byl použit růstový faktor bFGF o koncentraci 0,1 ng/ml a PDGF-BB o koncentraci 5 ng/ml. Do experimentu byla opět zařazena kontrola, která obsahovala pouze médium DMEM/F12 s 1% inaktivovaným FBS. Také byl ověřen vliv samotného adiponektinu v médiu s 1% inaktivovaným FBS na růst buněk. Na základě předchozího stanovení biologické aktivity adiponektinu byla jeho použitá koncentrace 30 µg/ml, protože u této koncentrace docházelo k většímu poklesu nárůstu buněk 3T3-L1. Celý experiment byl proveden až do času T7, tedy sedm dní od začátku experimentu. PDGF-BB interaguje s HMW i MMW formou adiponektinu, stimulaci bFGF inhibuje pouze HMW forma adiponektinu.



Obrázek 23 Inhibice růstového faktoru bFGF lyofilizovaným adiponektinem. Graf závislosti průměrného poměru přírůstku buněk na poměru času pro jednotlivé typy složení média a pro kontrolu, hodnoty vynesené v grafu byly získány poměrem počtu buněk v čase T1, T2, T3, T4, T7 k počtu buněk v čase T1 pro příslušné složení média. Průměrné hodnoty poměru byly získány z 3 naměřených hodnot, chybové úsečky znázorňují standardní chybu, bFGF – růstový faktor, ADIPO – lyofilizovaný adiponektin.

Výsledky pro PDGF-BB byly stejné jako v předchozím testu. Koncentrace 5 ng/ml PDGF-BB stimulovala růst buněk dostatečně již v T4. V přítomnosti růstového faktoru PDGF-BB s adiponektinem se výrazně snížil nárůst buněk čili adiponektin inhiboval stimulaci růstového faktoru PDGF-BB.

Stimulace růstu pomocí bFGF je nepatrná po celou dobu experimentu a růstová křivka kopíruje průběh růstové křivky kontroly. Přítomnost adiponektinu s bFGF měla na růst buněk spíše negativní vliv, protože na konci experimentu dochází k úbytku buněk. Samotný adiponektin nevykazuje negativní vliv na proliferaci a nárůst buněk v jeho přítomnosti je po celou dobu experimentu.

Oba růstové faktory měly opět vliv na morfologii buněk. Biologická aktivita adiponektinu byla však prokazatelná pouze v přítomnosti PDGF-BB, protože samotný bFGF nevykazoval stimulaci růstu buněk 3T3-L1. V předešlých testech však přítomnost 0,1 ng/ml bFGF stimulovala růst buněk, tato změna může být zapříčiněna změnou citlivosti buněk k tomuto faktoru častým pasážováním nebo špatným skladováním tohoto růstového faktoru. Přídavek adiponektinu k bFGF však snížil počet buněk, lze tedy usuzovat, že inhiboval stimulační účinek růstového faktoru, protože došlo ke snížení počtu buněk. Ze získaných výsledků je možno říci, že lyofilizace neměla vliv na biologickou aktivitu adiponektinu.

I když stimulace růstu buněk 3T3-L1 pomocí bFGF nebyla výrazná, lze pozorovat inhibici růstu v přítomnosti bFGF a adiponektinu. Snížení počtu buněk v přítomnosti bFGF s adiponektinem na konci experimentu (T7) pod počet buněk kontroly byl pozorován již v několika nepublikovaných pokusech v téže laboratoři. Růstový faktor bFGF interaguje pouze s HMW formou adiponektinu. Inhibice bFGF adiponektinem byla také zkoumána a potvrzena jak na buňkách 3T3-L1, tak na lidských aortálních buňkách hladké svaloviny (HASMCs) [30].

6. ZÁVĚR

Adiponektin je důležitý hormon tukové tkáně. V těle se vyskytuje ve třech oligomerních formách a plní různé biologické funkce. Mezi jeho biologické funkce patří například inhibice růstových faktorů. S využitím jeho inhibice růstových faktorů by bylo možno v budoucnu například léčit nádorová onemocnění, kde je koncentrace růstových faktorů zvýšená. Výzkumy se také zabývají vlivem adiponektinu při diabetu II. typu či při metabolickém syndromu.

Biologická aktivita adiponektinu byla stanovena jako míra inhibice stimulace růstového faktoru. Pro stanovení biologické aktivity adiponektinu byla využita buněčná kultura, konkrétně linie 3T3-L1. Nejprve však musela být otestována minimální koncentrace inaktivovaného FBS, která podporovala růst buněk 3T3-L1. Aby bylo možné stanovit inhibiční účinek adiponektinu, byla nejprve otestována stimulace růstu buněk 3T3-L1 pomocí růstových faktorů HB-EGF, PDGF-BB a bFGF o různých koncentracích (HB-EGF, PDGF-BB: 0,5 ng/ml, 5 ng/ml, 50 ng/ml; bFGF: 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml). Poté byla otestována biologická aktivita adiponektinu s růstovým faktorem, který vykazoval nejvyšší stimulaci růstu buněk 3T3-L1. Byl ověřen také samotný vliv adiponektinu na růst buněk.

Z testovaných koncentrací inaktivovaného FBS (0,25%, 0,5%, 1% a 10%) byla vybrána 1% koncentrace inaktivovaného FBS. Při této koncentraci inaktivovaného séra počet buněk 3T3-L1 po celou dobu experimentu (po 7 dní) pozvolna narůstal, což bylo žádoucí pro další experimenty. Médium DMEM/F12 s 1% inaktivovaným FBS bylo použito ve všech dalších pokusech. Při testování vlivu růstových faktorů na růst buněk byla pozorována změna morfologie buněk v přítomnosti růstových faktorů. V přítomnosti PDGF-BB a bFGF měly buňky spíše protáhlý tvar, naopak v přítomnosti EGF dominovaly buňky s kulatým tvarem. Růstový faktor EGF pouze mírně stimuloval růst buněk ve všech použitých koncentracích, proto již nebyl nadále používán v následujících pokusech. Nejvhodnější koncentrace růstového faktoru PDGF-BB byla 5 ng/ml. Tato koncentrace dostatečně stimulovala růst buněk již po čtyřech dnech (T4) experimentu a v čase T7 nedocházelo ke 100% konfluenci, jako tomu bylo při použití 50 ng/ml PDGF-BB. Také růstový faktor bFGF ve své koncentraci 0,1 ng/ml dostatečně stimuloval růst buněk. Naopak jako vyšší koncentrace 0,5 ng/ml měla z počátku na růst buněk spíše negativní vliv, až po 3-4 denní aklimatizaci buňky začaly proliferovat.

Přítomnost adiponektinu v médiu s 5 ng/ml PDGF-BB měla vliv na počet buněk. Počet buněk v přítomnosti samotného PDGF-BB byl více než dvojnásobný proti kontrole (pouze médium s 1% FBS), ale v přítomnosti PDGF-BB s 20 µg/ml adiponektinu nebyl stimulační účinek tak znatelný a počet buněk byl výrazně nižší. Adiponektin tedy inhiboval stimulaci PDGF-BB. O něco účinnější byla koncentrace 30 µg/ml adiponektinu v médiu s PDGF-BB, kde byl inhibiční účinek výraznější. Samotný adiponektin v médiu neměl vliv na růst buněk. Také byla ověřena biologická aktivita adiponektinu po lyofilizaci a to s 5 ng/ml PDGF-BB a 0,1 ng/ml bFGF. S růstovým faktorem PDGF-BB byl výsledek shodný jako s nelyofilizovaným adiponektinem. Lyofilizace teda neměla vliv na biologickou aktivitu adiponektinu. Růstový faktor bFGF v tomto pokusu nedostatečně stimuloval růst buněk (počet buněk podobný jako kontrola), ale v přítomnosti adiponektinu s bFGF počet buněk dokonce klesl pod hodnotu kontroly.

Pro stanovení biologické aktivity adiponektinu byla využita buněčná linie 3T3-L1. Je však možné použít i jiné buněčné kultury, které mohou mít shodné nebo dokonce lepší výsledky

(například buněčná linie HASMCs). Četnost buněk byla stanovena počítáním buněk v počítacích čtvercích narýsovaných na dno kultivační jamky. Toto stanovení buněk může být však nepřesné a je velmi zdlouhavé. Kromě počítací metody je možné použít fluorescenčních nebo luminiscenčních metod pro stanovení počtu buněk. Tyto metody jsou sice finančně náročnější, avšak jsou rychlejší a přesnější. Pro stimulaci růstu byly otestovány tři růstové faktory (HB-EGF, PDGF-BB, bFGF), kde nejvyšší stimulační účinek na linii 3T3-L1 měl růstový faktor PDGF-BB. Je však možné otestovat i jiné růstové faktory a jiné buněčné linie, pro které může být nejvhodnější jiný růstový faktor.

7. LITERATURA

- [1] DR. P. R. YADAV AND DR. RAJIV TYAGI. *Cell culture* [online]. 1st ed. New Delhi: Discovery Publishing House, 2005 [cit. 2016-03-05]. ISBN 81-835-6019-9. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=eRkFWciT4I0C&printsec=frontcover&dq=cell+culture&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwiTs7ripO3KAhVBCywkHc8HDBcQ6AEINjAB#v=onepage&q=cell%20culture&f=false>
- [2] EDITED BY LEDA R. CASTILHO .. [ET AL.]. *Animal cell technology from biopharmaceuticals to gene therapy* [online]. New York: Taylor, 2008 [cit. 2016-03-05]. ISBN 02-038-9516-9. Dostupné z: <https://majkf.files.wordpress.com/2010/08/animal-cell-technology.pdf>
- [3] KOVÁŘ, Jan. *Buněčná proliferace a mechanismy její regulace II*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-718-4429-2.
- [4] KOVÁŘ, Jan. *Buněčná proliferace a mechanismy její regulace*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999, 2 sv. ISBN 80-718-4429-2.
- [5] Zen-Bio. *3T3-L1* [online]. [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://www.zen-bio.com/products/cells/3T3L1.php>
- [6] ATCC. *3T3-L1 (ATCC® CL-173™)* [online]. [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://www.lgcstandards-atcc.org/en.aspx>
- [7] Pan-BioTech. *DMEM / F12* [online]. [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://www.pan-biotech.de/en/media-en/cell-culture-media/dmem-overview/dmem-f12>
- [8] Pan-BioTech. *Sera: Introduction* [online]. [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://www.pan-biotech.de/en/sera/introduction-sera>
- [9] CELIS, J (ed.). *Cell biology: a laboratory handbook* [online]. 3rd ed. Boston: Elsevier Academic, c2006 [cit. 2016-03-09]. ISBN 01-216-4734-X. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=02mLqzXwStUC&printsec=frontcover&dq=Laboratory+Handbook&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjh_PPU07PLAhXra5oKHfCIAAdAQ6AEIKTAC#v=onepage&q=Laboratory%20Handbook&f=false
- [10] RYAN, PH.D., John. *General Guide for Cryogenically Storing Animal Cell Cultures*. Life Sciences [online]. [cit. 2016-03-09]. Dostupné z: https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/t_cryoanimalcc.pdf
- [11] R. FREI, F. E. BIOSCA, M. HANDL, T. TRČ. *The Role of Growth Factors in the Human Organism and Their Use in Medicine, Especially in Orthopedics and Traumatology* [online]. 2008, (75), 247–252 [cit. 2016-02-11]. Dostupné z: http://www.achot.cz/dwnld/0804_247.pdf
- [12] SHERBET, G. *Growth factors and their receptors in cell differentiation, cancer and cancer therapy* [online]. 1st ed. Waltham, MA: Elsevier, 2011, xix, 347 p. [cit. 2016-02-09]. Elsevier insights. ISBN 01-238-7819-5. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=9qlS8leBmJcC&printsec=frontcover&dq=growth+factor&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwiXmI-d4-rKAhXC7A4KHZg4AiMQ6AEIZTAI#v=onepage&q=growth%20factor&f=false>
- [13] ZENG, Fenghua a Raymond C. HARRIS. *Epidermal growth factor, from gene organization to bedside* [online]. [cit. 2016-02-08]. DOI: 10.1016/j.semcd.2014.01.011. ISBN 10.1016/j.semcd.2014.01.011. PMC432524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952114000135>
- [14] BARRIENTOS, Stephan, O. STOJADINOVIC a kol. *PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing*. *Wound Repair and Regeneration* [online]. 2008, (Volume 16, 5), str. 585–601 [cit. 2016-02-11]. DOI:

- 10,1111/j.1524-475X.2008.00410.x. Dostupné z:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x/full>
- [15] COHEN, S., G. CARPANTER. *Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1975;72(4):1317-1321. [online]. [cit. 2016-02-08]. PMC432524 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC432524/>
- [16] KOMPOSCH, Karin a Maria SIBILIA. *EGFR Signaling in Liver Diseases* [online]. [cit. 2016-02-08]. DOI: 10,3390 / ijms17010030. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/1/30/htm>
- [17] PIMENTEL, Enrique. *Handbook of growth factors* [online]. Boca Raton: CRC Press, c1994 [cit. 2016-03-01]. ISBN 08-493-2507-2. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=kUS0RCirWz4C&pg=PA187&dq=FGF&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjU6te53pZLAhUGDZoKHUIBA5YQ6AEIXzAI#v=onepage&q=FGF&f=false>
- [18] TEVEN Chad M., E. M. FARINA, Jane RIVAS, R. R. REID, *Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases*, Genes & Diseases [online], Volume 1, Issue 2, December 2014, str. 199-213 [cit. 2016-03-01], ISSN 2352-3042, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2014.09.005>. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304214000294>
- [19] POWERS, C. *Fibroblast growth factors, their receptors and signaling* [online]. 2000, (7), 165-197 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1677/erc.0.0070165. ISBN 10.1677/erc.0.0070165. Dostupné z: <http://erc.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/erc.0.0070165>
- [20] MASON, Ivor. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. 2007, (8), 583-596 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1038/nrn2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/nrn/journal/v8/n8/full/nrn2189.html>
- [21] ANDRAE, J., R. GALLINI a C. BETSHOLTZ. *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine* [online]. [cit. 2016-02-09]. DOI: 10.1101/gad.1653708. ISBN 10.1101/gad.1653708. Dostupné z: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1653708>
- [22] BETSHOLTZ, Christer. Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* [online]. 2003, 69(4), 272-285 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1002/bdrc.10030. ISSN 1542-975x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bdrc.10030>
- [23] HOUSOVÁ, J., D. HOUSA a M. HALUZÍK. *Adiponektin – nový adipocytární hormon se vztahem k obezitě a inzulinové rezistenci* [online]. [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=v1_05_02_15.pdf
- [24] LIHN, A. S., PEDERSEN, S. B. AND RICHELSEN, B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obesity Reviews* [online]. 2005, 6(1), 13-21 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10,1111/j.1467-789X.2005.00159.x. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-789X.2005.00159.x/full>
- [25] LAFONTAN, Max a Nathalie VIGUERIE. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Current Opinion in Pharmacology* [online]. 2006, 6(6), 580-585 [cit. 2016-02-22]. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.002. ISSN 1471-4892. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489206001597>
- [26] KASTIN, Abba J (ed.). *Handbook of biologically active peptides* [online]. 2nd ed. San Diego: Elsevier, 2013 [cit. 2016-03-06]. ISBN 978-0-12-385095-9. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=Xz4yFpdSRrWC&pg=PA983&dq=adiponectin&hl=c>

- s&sa=X&ved=0ahUKEwi00v3XIIvLAhUDG5oKHWZtA6QQ6AEIVTAI#v=onepage&q=adiponectin&f=false
- [27] LITWACK, Gerald. *Adiponectin* [online]. 2012. Waltham, MA: Elsevier/Academic Press, 2012 [cit. 2016-03-06]. Vitamins and hormones, v. 90. ISBN 01-239-8313-4. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=JsS-61ctg4EC&printsec=frontcover&dq=adiponectin&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwj_98iTIIvLAhWFNJoKHTAUAHwQ6AEIGzAA#v=onepage&q=adiponectin&f=false
- [28] LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.
- [29] HAINER, Vojtěch. *Základy klinické obezitologie*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3252-7.
- [30] WANG, Y., K. S. L. LAM, J. Y. XU, G. LU, L. Y. XU, G. J. S. COOPER a A. XU. Adiponectin Inhibits Cell Proliferation by Interacting with Several Growth Factors in an Oligomerization-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2005, **280**(18): 18341-18347 [cit. 2015-12-30]. DOI: 10.1074/jbc.M501149200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/280/18/18341.full>
- [31] MERTEN, O., W. MATTANOVICH a D. LANG. *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. A Comparative View on Host Physiology* [online]. 1. Springer Netherlands, 2001 [cit. 2016-03-14]. ISBN 978-94-015-9749-4. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=sFD1CAAQAQBAJ&pg=PA179&dq=rekombinant+protein&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjBnuKsgcDLAhVEvXIKHdIZDzkQ6AEIMzAA#v=onepage&q=rekombinant%20protein&f=false>
- [32] RŮČKOVÁ, E., P. MÜLLER a B. VOJTĚŠEK. *Expres a purifikace proteinů*. Klin Onkol [online]. 2014, , 92-97 [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4494.pdf>
- [33] *Fetal Bovine Serum: USA origin, Heat Inactivated, sterile-filtered, suitable for cell culture, suitable for insect cell culture* [online]. [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f4135?lang=en@ion=CZ>
- [34] XU, Aimin, Lai Ching WONG, Yu WANG, Jian Yu XU, Garth J.S COOPER a Karen S.L LAM. Chronic treatment with growth hormone stimulates adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes [online]. [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.07.020. ISBN 10.1016/j.febslet.2004.07.020. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2004.07.020>
- [35] XU, A., P.-G. SUH, N. MARMY-CONUS, R. B. PEARSON, O. Y. SEOK, L. COCCO a R. S. GILMOUR. Phosphorylation of Nuclear Phospholipase C 1 by Extracellular Signal-Regulated Kinase Mediates the Mitogenic Action of Insulin-Like Growth Factor I. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2001, 21(9), 2981-2990 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1128/MCB.21.9.2981-2990.2001. ISSN 0270-7306. Dostupné z: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.21.9.2981-2990.2001>
- [36] (ed.). CHOH HAO LI. *Growth factors: Hormonal proteins and peptides* [online]. Orlando: Academic Press, 1984 [cit. 2016-04-01]. ISBN 0124472125. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=VSuIXx4J-o4C&pg=PA210&dq=FGF+on+morphology+cells&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwi2xd-Tuu3LahVBAZoKHYnTA2MQ6AEIMzAA#v=onepage&q=FGF%20on%20morphology%20cells&f=false>
- [37] HARRINGTON, Molly, Sunthorn Pond-Tor and Charlotte M. Boney POND-TOR a Charlotte M. BONEY. Role of Epidermal Growth Factor and ErbB2 Receptors in 3T3-L1 Adipogenesis. *Obesity* [online]. 2007, **15**(3), 563–571 [cit. 2016-04-11]. DOI:

- 10.1038/oby.2007.562. Dostupné z:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/oby.2007.562/full>
- [38] ARTEMENKO, Yulia, AnneMarie GAGNON a Alexander SORISKY. *Catalytically inactive SHIP2 inhibits proliferation by attenuating pdgf signaling in 3T3-L1 preadipocytes* [online]. [cit. 2016-04-18]. ISBN 10.1002/jcp.21595. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.21595>
- [39] ARITA, Y. Adipocyte-Derived Plasma Protein Adiponectin Acts as a Platelet-Derived Growth Factor-BB-Binding Protein and Regulates Growth Factor-Induced Common Postreceptor Signal in Vascular Smooth Muscle Cell. *Circulation* [online]. **105**(24), 2893-2898 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1161/01.CIR.0000018622.84402.FF. ISSN 00097322. Dostupné z: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000018622.84402.FF>
- [40] ISHIZAWA, K., N. DORJSUREN, Y. IZAWA-ISHIZAWA, et al. Inhibitory effects of adiponectin on platelet-derived growth factor-induced mesangial cell migration. *Obesity* [online]. 2007, **15**(3), 563–571 [cit. 2016-04-11]. DOI: 10.1677/JOE-08-0469. ISBN 10.1677/JOE-08-0469. Dostupné z: <http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/JOE-08-0469>

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AD, ADIPO – adiponektin

bFGF – bazický fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor)

BSA – hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)

DMEM – Dulbeccovo modifikované Eagleho médium

DMSO – dimethylsulfoxid

EGF – epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)

EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)

FBS – fetální bovinní sérum

FGF – fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)

FGFR – receptor fibroblastového růstového faktoru

HASMCs – lidské aortální buňky hladké svaloviny (human aortic smooth muscle cells)

HB-EGF – heparin vázající epidermální růstový faktor

HMW – vysokomolekulární (high molecular weight)

LMW – nízkomolekulární (low molecular weight)

MMW – středněmolekulární (medium molecular weight)

PDGF – růstový faktor z destiček (platelet derived growth factor)

PDGFR – receptor růstového faktoru z destiček

T75 – kultivační láhev o objemu 75 cm³

9. PŘÍLOHY

Příloha 1 Záznam o SDS-PAGE elektroforéze adiponektinu

Záznam o SDS-PAGE elektroforéze (SDS-PAGE Report)

Odd. proteinové chemie
(Protein Chemistry Dep.)

Datum (Date):	5.2.2016
Provedl (Person):	Lenka Dvořáčková

Koncentrace akrylamidu (Acrylamide concentration):	grad
---	------

Barvení (Staining):	Coomassie blue
---------------------	----------------

Zaostřovací (Stacking) gel:	4%
Napětí (Voltage):	100 V

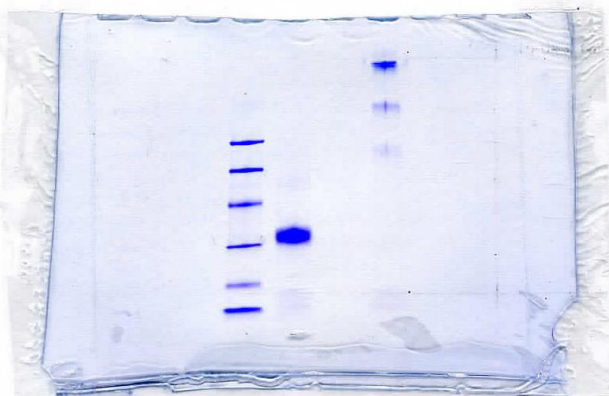
Separáčnický (Resolving) gel:	grad
Napětí (Voltage):	200 V

Klad vzorků (Sample layout):

Číslo jamky (Lane number)	Popis vzorku (Sample description)	Čís. vyr.	Úprava vzorku (Sample processing)
		LOT	
1			
2			
3			
4	standard (Bio-Rad low range 14-97 kDa)		
5	Hu Adiponectin O (1mg)- výstupní kontrola po lyof.	NP-15-038, NP-15-043, NP-15-050	redukční (reduced)
6			
7	Hu Adiponectin O (1mg)- výstupní kontrola po lyof.	NP-15-038, NP-15-043, NP-15-050	neredukční (non-red.)
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			

Použitý standard (Standard used): BIO-RAD low range, 14.4 - 21.5 - 31 - 45 - 66.2 - 97.4 kDa

Poznámky (Notes):



Handwritten signature

SOP-1-3011 Příprava a provedení SDS PAGE

(SOP-1-3011) SDS-PAGE Preparation and Processing Protocol

10. NAMĚŘENÁ DATA

Tabulka 3 Naměřená data pro vliv koncentrace séra

jamka	c séra [%]	číslo testu	počet buněk				
			po 1 dni	po 2 dnech	po 3 dnech	po 4 dnech	po 7 dnech
A1	1	1	47	61	56	88	170
A2	0,5	1	106	120	177	203	189
A3	0,25	1	77	91	115	139	142
A4	10	1	108	163	2	12	103
B1	1	1	67	81	113	161	179
B2	0,5	1	19	31	41	49	61
B3	0,25	1	52	57	74	79	70
B4	10	1	62	103	125	256	728
C1	1	1	85	97	162	193	220
C2	0,5	1	38	49	61	77	98
C3	0,25	1	47	71	82	95	78
C4	10	1	88	142	187	385	968
A1	1	2	71	108	126	157	176
A2	0,5	2	53	73	98	111	114
A3	0,25	2	35	58	65	65	50
A4	10	2	32	51	77	157	768
B1	1	2	42	64	108	138	166
B2	0,5	2	57	94	118	145	123
B3	0,25	2	44	77	99	95	77
B4	10	2	57	99	164	376	952
C1	1	2	36	51	81	100	160
C2	0,5	2	37	66	87	102	111
C3	0,25	2	26	49	51	53	47
C4	10	2	36	61	98	234	728
A1	1	3	22	46	47	77	113
A2	0,5	3	26	55	70	87	61
A3	0,25	3	13	21	24	25	3
A4	10	3	28	52	70	188	508
B1	1	3	9	15	19	17	34
B2	0,5	3	32	63	84	72	100
B3	0,25	3	32	57	72	63	4
B4	10	3	19	31	44	126	680
C1	1	3	22	45	60	78	97
C2	0,5	3	25	48	61	61	49
C3	0,25	3	24	29	32	32	7
C4	10	3	16	29	31	98	624

Tabulka 4 Naměřená data pro vliv koncentrace růstových faktorů HB-EGF a PDGF-BB na proliferaci buněk

jamka	c	číslo testu	počet buněk				
			po 1 dni	po 2 dnech	po 3 dnech	po 4 dnech	po 7 dnech
A1	5 ng/ml EGF	4	52	81	149	248	564
A2	5 ng/ml EGF	4	83	153	246	392	620
A3	5 ng/ml EGF	4	69	132	167	292	440
A4	5 ng/ml PDGF	4	78	187	307	688	2408
A5	5 ng/ml PDGF	4	51	120	236	532	1280
A6	5 ng/ml PDGF	4	67	132	297	516	1232
B1	0,5 ng/ml EGF	4	44	96	167	336	480
B2	0,5 ng/ml EGF	4	56	107	168	396	592
B3	0,5 ng/ml EGF	4	55	112	154	256	387
B4	0,5 ng/ml PDGF	4	86	163	238	484	608
B5	0,5 ng/ml PDGF	4	38	72	129	304	584
B6	0,5 ng/ml PDGF	4	74	164	312	512	568
C1	kontrola	4	59	139	226	416	508
C2	kontrola	4	58	118	264	329	464
C3	kontrola	4	70	154	304	412	497
C4	kontrola	4	55	103	168	323	359
C5	kontrola	4	70	130	188	327	460
C6	kontrola	4	60	116	172	312	356
D1	50 ng/ml EGF	4	80	151	192	284	476
D2	50 ng/ml EGF	4	47	84	204	270	468
D3	50 ng/ml EGF	4	61	123	189	288	423
D4	50 ng/ml PDGF	4	88	156	184	436	1965
D5	50 ng/ml PDGF	4	81	167	174	492	2250
D6	50 ng/ml PDGF	4	60	92	196	324	1806
A1	0,5 ng/ml EGF	5	95	193	229	320	446
A2	0,5 ng/ml EGF	5	85	194	274	389	428
A3	0,5 ng/ml EGF	5	99	234	308	389	416
A4	0,5 ng/ml PDGF	5	115	230	352	528	468
A5	0,5 ng/ml PDGF	5	91	215	430	520	484
A6	0,5 ng/ml PDGF	5	68	131	162	284	419
B1	5 ng/ml EGF	5	94	238	324	446	448
B2	5 ng/ml EGF	5	138	308	368	452	528
B3	5 ng/ml EGF	5	66	183	235	376	548

jamka	c	číslo testu	počet buněk				
			po 1 dni	po 2 dnech	po 3 dnech	po 4 dnech	po 7 dnech
B4	5 ng/ml PDGF	5	139	261	401	1024	956
B5	5 ng/ml PDGF	5	94	198	357	1056	914
B6	5 ng/ml PDGF	5	78	210	284	1120	896
C1	50 ng/ml EGF	5	92	186	268	319	392
C2	50 ng/ml EGF	5	67	207	334	345	384
C3	50 ng/ml EGF	5	97	214	259	344	458
C4	50 ng/ml PDGF	5	96	204	288	1058	1184
C5	50 ng/ml PDGF	5	78	189	244	784	1261
C6	50 ng/ml PDGF	5	47	118	167	736	1098
D1	kontrola	5	87	123	228	269	460
D2	kontrola	5	93	187	272	384	412
D3	kontrola	5	51	121	187	209	264
D4	kontrola	5	63	127	196	301	344
D5	kontrola	5	69	122	201	272	368
D6	kontrola	5	72	128	168	208	332

Tabulka 5 Naměřené výsledky pro vliv koncentrace růstového faktoru bFGF na proliferaci buněk

jamka	c	číslo testu	počet buněk				
			po 1 dni	po 2 dnech	po 3 dnech	po 4 dnech	po 7 dnech
A1	kontrola	6	59	119	230	259	296
A2	kontrola	6	51	83	168	198	200
A3	kontrola	6	74	152	275	299	352
A4	0,5 ng/ml bFGF	6	87	179	169	197	270
A5	0,5 ng/ml bFGF	6	55	93	82	118	126
A6	0,5 ng/ml bFGF	6	64	123	147	94	138
B1	5 ng/ml PDGF-BB	6	67	154	240	416	880
B2	5 ng/ml PDGF-BB	6	76	153	249	236	736
B3	5 ng/ml PDGF-BB	6	77	156	223	380	928
C1	0,01 ng/ml bFGF	6	58	109	144	248	388
C2	0,01 ng/ml bFGF	6	44	107	169	245	380
C3	0,01 ng/ml bFGF	6	73	214	275	364	544
D1	0,1 ng/ml bFGF	6	52	104	159	326	576
D2	0,1 ng/ml bFGF	6	73	163	189	496	1024
D3	0,1 ng/ml bFGF	6	59	123	153	392	487
D4	kontrola	6	51	119	227	259	336
D5	kontrola	6	67	150	292	406	388
D6	kontrola	6	32	65	123	295	376
A1	kontrola	7	93	169	244	306	345
A2	5 ng/ml PDGF-BB	7	109	226	380	881	898
A3	0,01 ng/ml bFGF	7	102	215	303	476	562
A4	0,1 ng/ml bFGF	7	177	375	476	963	1184
A5	0,5 ng/ml bFGF	7	102	215	238	248	401
B1	kontrola	7	80	198	282	398	385
B2	5 ng/ml PDGF-BB	7	145	384	556	1158	469
B3	0,01 ng/ml bFGF	7	69	161	222	412	504
B4	0,1 ng/ml bFGF	7	142	318	480	869	944
B5	0,5 ng/ml bFGF	7	93	232	256	330	584
C1	kontrola	7	83	198	288	416	348
C2	5 ng/ml PDGF-BB	7	92	291	472	1036	536
C3	0,01 ng/ml bFGF	7	78	185	255	412	384
C4	0,1 ng/ml bFGF	7	150	393	546	1106	912
C5	0,5 ng/ml bFGF	7	116	384	272	348	541
D1	kontrola	7	86	168	242	364	328
D2	5 ng/ml PDGF-BB	7	110	173	282	596	481

jamka	c	číslo testu	počet buněk				
			po 1 dni	po 2 dnech	po 3 dnech	po 4 dnech	po 7 dnech
D3	0,01 ng/ml bFGF	7	122	203	258	436	312
D4	0,1 ng/ml bFGF	7	165	318	415	816	956
D5	0,5 ng/ml bFGF	7	120	240	211	215	398

Tabulka 6 Naměřená data pro inhibici PDGF-BB adiponektinem

jamka	c	číslo testu	počet buněk			
			po 1 dni	po 2 dnech	po 3 dnech	po 4 dnech
A1	kontrola	8	124	226	324	413
A2	5 ng/ml PDGF-BB	8	130	269	348	1056
A3	20μg/ml ADIPO	8	94	170	237	361
A4	30μg/ml ADIPO	8	93	219	266	462
A5	20μg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	149	278	336	744
A6	30μg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	137	281	322	568
B1	kontrola	8	114	238	340	394
B2	5 ng/ml PDGF-BB	8	109	217	382	948
B3	20μg/ml ADIPO	8	115	197	278	424
B4	30μg/ml ADIPO	8	86	157	201	314
B5	20μg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	125	215	329	697
B6	30μg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	173	275	310	704
C1	kontrola	8	139	282	311	483
C2	5 ng/ml PDGF-BB	8	87	159	278	868
C3	20μg/ml ADIPO	8	114	213	304	453
C4	30μg/ml ADIPO	8	117	203	241	385
C5	20μg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	98	194	239	528
C6	30μg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	159	284	306	676
D1	kontrola	8	109	219	304	448
D2	5 ng/ml PDGF-BB	8	118	207	351	896
D3	20μg/ml ADIPO	8	107	170	210	408
D4	30μg/ml ADIPO	8	106	173	226	388
D5	20μg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	102	176	186	556
D6	30μg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	61	112	125	272
A1	kontrola	9	138	251	296	408
A2	5 ng/ml PDGF-BB	9	120	210	324	676
A3	20μg/ml ADIPO	9	121	211	304	432
A4	30μg/ml ADIPO	9	93	191	276	364
A5	20μg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	109	212	263	464
A6	30μg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	143	252	309	548
B1	kontrola	9	127	272	346	404

jamka	c	číslo testu	počet buněk			
			po 1 dni	po 2 dnech	po 3 dnech	po 4 dnech
B2	5 ng/ml PDGF-BB	9	85	156	296	492
B3	20µg/ml ADIPO	9	112	225	273	352
B4	30µg/ml ADIPO	9	118	246	283	326
B5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	114	217	275	508
B6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	103	185	239	396
C1	kontrola	9	111	243	317	359
C2	5 ng/ml PDGF-BB	9	98	207	354	528
C3	20µg/ml ADIPO	9	131	313	397	388
C4	30µg/ml ADIPO	9	87	201	259	320
C5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	88	183	244	432
C6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	72	166	254	432
D1	kontrola	9	115	199	297	315
D2	5 ng/ml PDGF-BB	9	86	147	224	379
D3	20µg/ml ADIPO	9	109	211	297	368
D4	30µg/ml ADIPO	9	108	198	252	308
D5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	106	196	216	418
D6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	94	170	223	432

Tabulka 7 Přepočítaná data pro inhibici PDGF-BB adiponektinem

jamka	c	číslo testu	počet buněk			
			T1/T1	T2/T1	T3/T1	T4/T1
A1	kontrola	8	1	1,823	2,613	3,331
A2	5 ng/ml PDGF-BB	8	1	2,069	2,677	8,123
A3	20µg/ml ADIPO	8	1	1,809	2,521	3,840
A4	30µg/ml ADIPO	8	1	2,355	2,860	4,968
A5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	1	1,866	2,255	4,993
A6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	1	2,051	2,350	4,146
B1	kontrola	8	1	2,088	2,982	3,456
B2	5 ng/ml PDGF-BB	8	1	1,991	3,505	8,697
B3	20µg/ml ADIPO	8	1	1,713	2,417	3,687
B4	30µg/ml ADIPO	8	1	1,826	2,337	3,651
B5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	1	1,720	2,632	5,576
B6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	1	1,590	1,792	4,069
C1	kontrola	8	1	2,029	2,237	3,475
C2	5 ng/ml PDGF-BB	8	1	1,828	3,195	9,977
C3	20µg/ml ADIPO	8	1	1,868	2,667	3,974
C4	30µg/ml ADIPO	8	1	1,735	2,060	3,291
C5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	1	1,980	2,439	5,388
C6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	1	1,786	1,925	4,252
D1	kontrola	8	1	2,009	2,789	4,110
D2	5 ng/ml PDGF-BB	8	1	1,754	2,975	7,593
D3	20µg/ml ADIPO	8	1	1,589	1,963	3,813
D4	30µg/ml ADIPO	8	1	1,632	2,132	3,660
D5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	1	1,725	1,824	5,451
D6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	8	1	1,836	2,049	4,459
A1	kontrola	9	1	1,819	2,145	2,957
A2	5 ng/ml PDGF-BB	9	1	1,750	2,700	5,633
A3	20µg/ml ADIPO	9	1	1,744	2,512	3,570
A4	30µg/ml ADIPO	9	1	2,054	2,968	3,914
A5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	1	1,945	2,413	4,257
A6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	1	1,762	2,161	3,832
B1	kontrola	9	1	2,142	2,724	3,181

jamka	c	číslo testu	počet buněk			
			T1/T1	T2/T1	T3/T1	T4/T1
B2	5 ng/ml PDGF-BB	9	1	1,835	3,482	5,788
B3	20µg/ml ADIPO	9	1	2,009	2,438	3,143
B4	30µg/ml ADIPO	9	1	2,085	2,398	2,763
B5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	1	1,904	2,412	4,456
B6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	1	1,796	2,320	3,845
C1	kontrola	9	1	2,189	2,856	3,234
C2	5 ng/ml PDGF-BB	9	1	2,112	3,612	5,388
C3	20µg/ml ADIPO	9	1	2,389	3,031	2,962
C4	30µg/ml ADIPO	9	1	2,310	2,977	3,678
C5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	1	2,080	2,773	4,909
C6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	1	2,306	3,528	6,000
D1	kontrola	9	1	1,730	2,583	2,739
D2	5 ng/ml PDGF-BB	9	1	1,709	2,605	4,407
D3	20µg/ml ADIPO	9	1	1,936	2,725	3,376
D4	30µg/ml ADIPO	9	1	1,833	2,333	2,852
D5	20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	1	1,849	2,038	3,943
D6	30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	9	1	1,809	2,372	4,596

Tabulka 8 Naměřená data pro inhibici bFGF a PDGF-BB lyofilizovaným adiponektinem

jamka	c	číslo testu	počet buněk				
			po 1 dni	po 2 dnech	po 3 dnech	po 4 dnech	po 7 dnech
A1	kontrola	10	131	186	213	331	524
A2	30µg/ml AD	10	124	177	208	288	432
A3	0,1 ng/ml bFGF	10	109	139	140	194	298
A4	30µg/ml AD+ FGF	10	110	167	180	210	192
A5	5 ng/ml PDGF	10	93	134	165	296	846
A6	30µg/ml AD +PDGF	10	119	149	194	338	796
B1	kontrola	10	124	132	136	256	315
B2	30µg/ml AD	10	147	193	249	373	520
B3	0,1 ng/ml bFGF	10	104	164	173	296	479
B4	30µg/ml AD+ FGF	10	85	138	154	174	184
B5	5 ng/ml PDGF	10	76	115	157	340	691
B6	30µg/ml AD +PDGF	10	115	160	213	294	768
C1	kontrola	10	132	164	182	289	548
C2	30µg/ml AD	10	107	186	210	310	696
C3	0,1 ng/ml bFGF	10	82	119	122	204	277
C4	30µg/ml AD+ FGF	10	113	157	161	243	193
C5	5 ng/ml PDGF	10	35	60	68	151	359
C6	30µg/ml AD +PDGF	10	108	137	177	279	705

Tabulka 9 Přepočítaná data pro inhibici bFGF a PDGF-BB lyofilizovaným adiponektinem

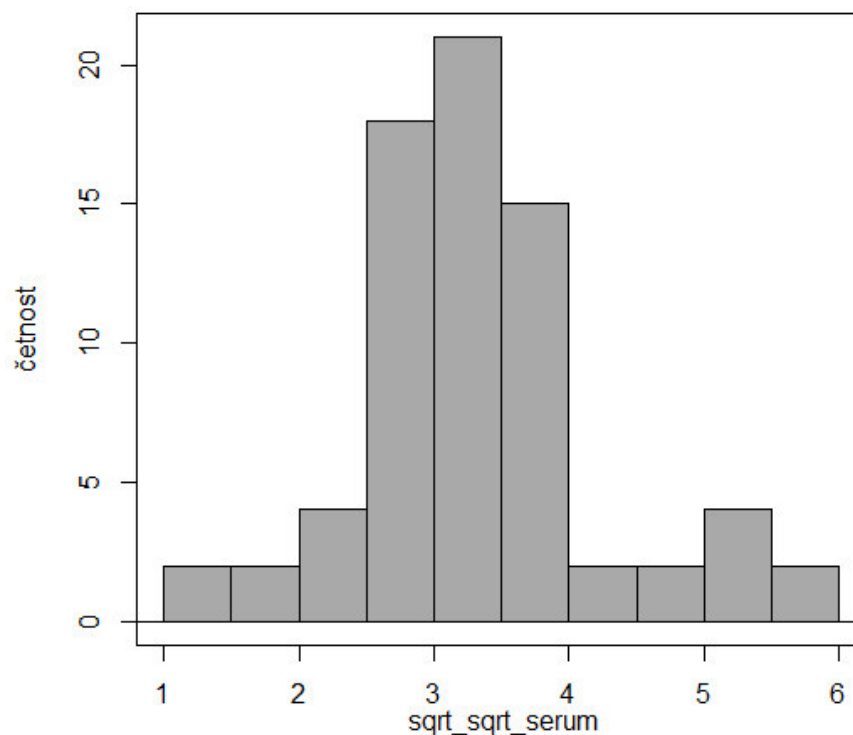
jamka	c	číslo testu	Poměr počtu buněk				
			T1/T1	T2/T1	T3/T1	T4/T1	T7/T1
A1	kontrola	10	1	1,419847	1,625954	2,526718	4
A2	30µg/ml AD	10	1	1,427419	1,677419	2,322581	3,483871
A3	0,1 ng/ml bFGF	10	1	1,275229	1,284404	1,779817	2,733945
A4	30µg/ml AD+ FGF	10	1	1,518182	1,636364	1,909091	1,745455
A5	5 ng/ml PDGF	10	1	1,44086	1,774194	3,182796	9,096774
A6	30µg/ml AD +PDGF	10	1	1,252101	1,630252	2,840336	6,689076
B1	kontrola	10	1	1,064516	1,096774	2,064516	2,540323
B2	30µg/ml AD	10	1	1,312925	1,693878	2,537415	3,537415
B3	0,1 ng/ml bFGF	10	1	1,576923	1,663462	2,846154	4,605769
B4	30µg/ml AD+ FGF	10	1	1,623529	1,811765	2,047059	2,164706
B5	5 ng/ml PDGF	10	1	1,513158	2,065789	4,473684	9,092105
B6	30µg/ml AD +PDGF	10	1	1,391304	1,852174	2,556522	6,678261
C1	kontrola	10	1	1,242424	1,378788	2,189394	4,151515
C2	30µg/ml AD	10	1	1,738318	1,962617	2,897196	6,504673
C3	0,1 ng/ml bFGF	10	1	1,45122	1,487805	2,487805	3,378049
C4	30µg/ml AD+ FGF	10	1	1,389381	1,424779	2,150442	1,707965
C5	5 ng/ml PDGF	10	1	1,714286	1,942857	4,314286	10,25714
C6	30µg/ml AD +PDGF	10	1	1,268519	1,638889	2,583333	6,527778

11. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT POMOCÍ MULTI-WAY ANOVY

11.1. Multi-way ANOVA pro vliv koncentrace séra

Data byla transformována dvojitým odmocněním pro test multi-way ANOVA, který vyžaduje normální rozložení. Normalita rozložení dat byla testována testem Shapiro-Wilk. Také byla použita pouze data s časem T4 a T7 (čtyři a sedm dní od začátku testu). Použitá data jsou zobrazena v tabulce 3. Bylo zjištěno, že koncentrace séra měla vliv na proliferaci buněk ($P < 0,001$).

<u>Summary statistic</u>				
conc	test	T	count	sqrt_sqrt_serum
0.25:18	1:24	4:36	Min. : 3.00	Min. :1.316
0.5 :18	2:24	7:36	1st Qu.: 68.75	1 st Qu.:2.879
1 :18	3:24		Median :102.50	Median :3.182
10 :18			Mean :182.67	Mean :3.333
			3rd Qu.:176.75	3rd Qu.:3.646
			Max. :968.00	Max. :5.578



Obrázek 24 Histogram - vliv koncentrace séra, data byla dvakrát odmocněna a byly použity pouze časy T4 a T7

Shapiro-Wilk normality test
data: sqrt_sqrt_serum
W = 0.93663, p-value = 0.001287

Anova Table (Type II tests)
Response: sqrt_sqrt_serum

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
conc	25.8672	3	37.1825	1.431e-12 ***
T	1.7099	1	7.3735	0.009172 **
test	5.1548	2	11.1144	0.000108 ***
conc:T	7.9956	3	11.4932	8.491e-06 ***
conc:test	3.1733	6	2.2807	0.051242 .
T:test	0.1284	2	0.2768	0.759393
conc:T:test	0.8183	6	0.5881	0.738085
Residuals	11.1309	48		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Průměr (means)

test:	1		2		3	
T:	4	7	4	7	4	7
0.25	3.178975	3.105449	2.886522	2.746578	2.477265	1.452288
0.5	3.127545	3.216274	3.297980	3.281231	2.920570	2.867570
1	3.450725	3.706634	3.376495	3.596107	2.654876	2.937805
10	3.430272	4.652659	3.951468	5.337783	3.399865	4.950685

Směrodatná odchylka (std.deviation)

test:	1		2		3	
T:	4	7	4	7	4	7
0.25	0.2314846	0.3027403	0.2158006	0.18789453	0.3029689	0.1587142
0.5	0.5823058	0.4605540	0.1528775	0.04381435	0.1298644	0.2658653
1	0.3459405	0.1274448	0.1938334	0.04326758	0.5407092	0.4570864
10	1.3757210	1.2847859	0.4332698	0.19106690	0.2815482	0.1841346

Počet dat (count)

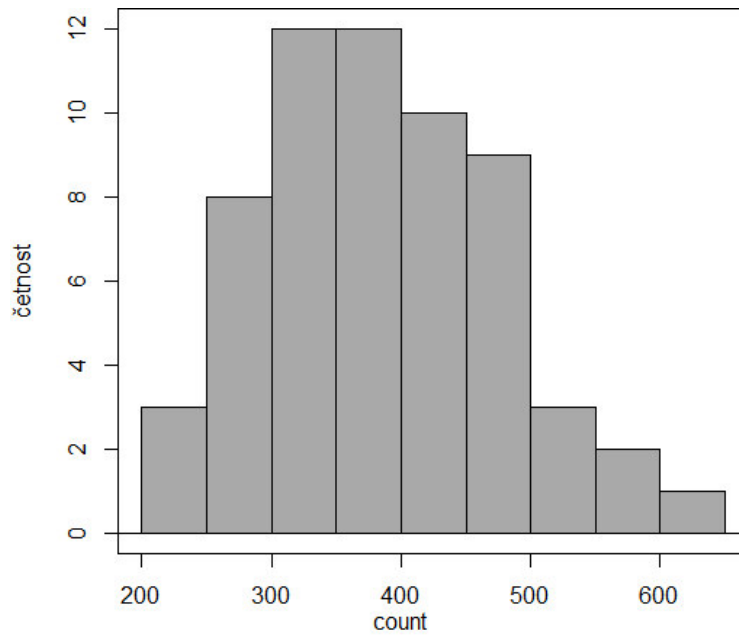
test:	1		2		3	
T:	4	7	4	7	4	7
0.25	3	3	3	3	3	3
0.5	3	3	3	3	3	3
1	3	3	3	3	3	3
10	3	3	3	3	3	3

11.2. Multi-way ANOVA pro vliv koncentrace růstového faktoru EGF

Test multi-way ANOVA vyžaduje normální rozložení. Normalita rozložení dat byla testována testem Shapiro-Wilk. Použitá data zobrazuje tabulka 4. Pro dodržení normality byla použita pouze data s časem T4 a T7 (čtyři a sedm dní od začátku testu). Bylo zjištěno, že koncentrace EGF měla vliv na proliferaci buněk ($P < 0,001$).

Summary statistic

	conc	test	T	count
0,5 ng/ml EGF:	12	4:30	4:30	Min. :208.0
5 ng/ml EGF:	12	5:30	7:30	1st Qu.:322.2
50 ng/ml EGF:	12			Median :388.0
kontrola:	24			Mean :387.1
				3rd Qu.:449.0
				Max. :620.0



Obrázek 25 Histogram - vliv koncentrace EGF, byly použity pouze časy T4 a T7

Shapiro-Wilk normality test

data: count

W = 0.98644, p-value = 0.7448

Anova Table (Type II tests)

Response: count

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
conc	68685	3	6.4872	0.0009885 ***
T	194712	1	55.1707	2.712e-09 ***
test	8736	1	2.4754	0.1228056
conc:T	9859	3	0.9312	0.4336725
conc:test	33342	3	3.1491	0.0342794 *
T:test	16934	1	4.7983	0.0338309 *
conc:T:test	13289	3	1.2551	0.3014260
Residuals	155288	44		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Průměr (means)

test:	4		5	
T:	4	7	4	7
0,5 ng/ml EGF	329.3333	486.3333	366.0000	430.0000
5 ng/ml EGF	310.6667	541.3333	424.6667	508.0000
50 ng/ml EGF	280.6667	455.6667	336.0000	411.3333
kontrola	353.1667	440.6667	273.8333	363.3333

Směrodatná odchylka (std. deviations)

test:	4		5	
T:	4	7	4	7
0,5 ng/ml EGF	70.237692	102.64664	39.83717	15.09967
5 ng/ml EGF	73.792502	92.11587	42.25321	52.91503
50 ng/ml EGF	9.451631	28.57155	14.73092	40.61199
kontrola	47.503333	67.02736	65.48104	67.76036

Počet dat (counts)

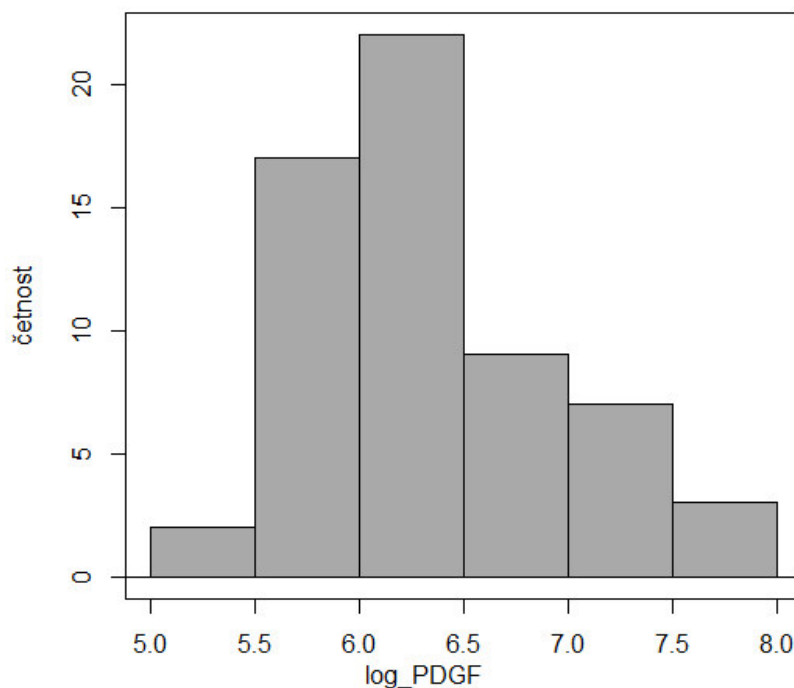
test:	4	5
T:	4 7	4 7
0,5 ng/ml EGF	3 3	3 3
5 ng/ml EGF	3 3	3 3
50 ng/ml EGF	3 3	3 3
kontrola	6 6	6 6

11.3. Multi-way ANOVA pro vliv koncentrace růstového faktoru PDGF

Data byla transformována logaritmicizací pro test multi-way ANOVA, který vyžaduje normální rozložení. Normalita rozložení dat byla testována testem Shapiro-Wilk. Použitá data zobrazuje tabulka 3. Z těchto dat byla použita pouze data s časem T4 a T7 (čtyři a sedm dní od začátku testu). Bylo zjištěno, že přítomnost PDGF měla vliv na proliferaci buněk ($P < 0,001$).

Summary statistic

conc	test	T	count	log_PDGF	
0,5 ng/ml PDGF:	12	4:30	4:30	Min. : 208.0	Min. : 5.338
5 ng/ml PDGF	:12	5:30	7:30	1st Qu.: 353.0	1st Qu.: 5.866
50 ng/ml PDGF	:12			Median : 488.0	Median : 6.190
kontrola	:24			Mean : 672.8	Mean : 6.318
				3rd Qu.: 900.5	3rd Qu.: 6.803
				Max. : 2408.0	Max. : 7.787



Obrázek 26 Histogram - vliv koncentrace PDGF, data byla logaritmována a byly použity pouze časy T4 a T7

Shapiro-Wilk normality test

data: log_PDGF

W = 0.94121, p-value = 0.006138

Anova Table (Type II tests)

Response: log_PDGF

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
conc	12.7916	3	114.9425	< 2.2e-16 ***
T	2.6174	1	70.5585	1.083e-10 ***
test	0.1177	1	3.1719	0.08182 .
conc:T	1.1734	3	10.5438	2.392e-05 ***
conc:test	0.2891	3	2.5982	0.06418 .
T:test	0.9495	1	25.5959	7.927e-06 ***
conc:T:test	1.2704	3	11.4159	1.156e-05 ***
Residuals	1.6322	44		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Průměr (means)

test:	4		5	
T:	4	7	4	7
0,5 ng/ml PDGF	6.045812	6.374066	6.057300	6.122808
5 ng/ml PDGF	6.352180	7.352520	6.971600	6.826176
50 ng/ml PDGF	6.018955	7.600268	6.743258	7.072520
kontrola	5.859730	6.078073	5.589690	5.880343

Směrodatná odchylna (std. deviations)

test:	4		5	
T:	4	7	4	7
0,5 ng/ml PDGF	0.2861211	0.03421736	0.35370268	0.07545366
5 ng/ml PDGF	0.1580175	0.37636769	0.04553284	0.03320490
50 ng/ml PDGF	0.2149624	0.11089186	0.19387625	0.06929989
kontrola	0.1300193	0.15881031	0.23200195	0.19151558

Počet dat (counts)

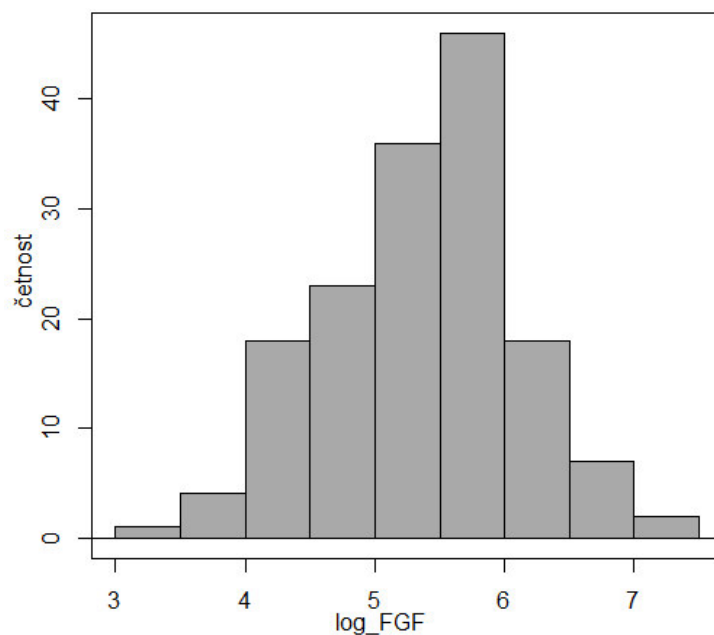
test:	4		5	
T:	4	7	4	7
0,5 ng/ml PDGF	3	3	3	3
5 ng/ml PDGF	3	3	3	3
50 ng/ml PDGF	3	3	3	3
kontrola	6	6	6	6

11.4. Multi-way ANOVA pro vliv koncentrace růstového faktoru FGF

Data byla transformována logaritmizací pro test multi-way ANOVA, který vyžaduje normální rozložení. Normalita rozložení dat byla testována testem Shapiro-Wilk. Použitá data zobrazuje tabulka 5. Bylo zjištěno, že přítomnost růstového faktoru FGF měla vliv na proliferaci buněk ($P < 0,001$).

Summary statistic

	conc	test	T	count	log_FGF
0,01 ng/ml bFGF:	35	6:75	1:31	Min. : 32.0	Min. :3.466
0,1 ng/ml bFGF :	35	7:80	2:31	1 st Qu.: 123.0	1st Qu.:4.812
0,5 ng/ml bFGF :	35		3:31	Median : 232.0	Median :5.447
kontrola :	50		4:31	Mean : 281.4	Mean :5.372
			7:31	3rd Qu.: 375.5	3rd Qu.:5.928
				Max. :1184.0	Max. :7.077



Obrázek 27 Histogram - vliv koncentrace FGF, data byla logaritmována

Shapiro-Wilk normality test

data: log_FGF

W = 0.98761, p-value = 0.1857

Anova Table (Type II tests)

Response: log_FGF

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
conc	7.595	3	46.8640	< 2.2e-16 ***
T	53.379	4	247.0189	< 2.2e-16 ***
test	10.588	1	195.9882	< 2.2e-16 ***
conc:T	3.932	12	6.0650	3.864e-08 ***
conc:test	2.222	3	13.7127	1.044e-07 ***
T:test	0.312	4	1.4454	0.2236
conc:T:test	0.964	12	1.4874	0.1387
Residuals	6.213	115		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Průměr (means)

test:

	6				
T:	1	2	3	4	7
0,01 ng/ml bFGF	4.045031	4.910051	5.238828	5.637280	6.066709
0,1 ng/ml bFGF	4.106414	4.850108	5.113696	5.988245	6.491948
0,5 ng/ml bFGF	4.210708	4.844057	4.842350	4.865728	5.120653
kontrola	3.985947	4.697665	5.348784	5.632616	5.760002

test:

	7				
T:	1	2	3	4	7
0,01 ng/ml bFGF	4.504952	5.246401	5.552658	6.071277	6.061931
0,1 ng/ml bFGF	5.062139	5.856210	6.167525	6.837579	6.901294
0,5 ng/ml bFGF	4.674664	5.562164	5.493777	5.633840	6.160933
kontrola	4.446954	5.207599	5.572743	5.909469	5.860501

Směrodatná odchylka (std. deviations)

test:	6				
T:	1	2	3	4	7
0,01 ng/ml bFGF	0.2534866	0.3949513	0.3369536	0.2251394	0.2013959
0,1 ng/ml bFGF	0.1714415	0.2270674	0.1125506	0.2103541	0.3897805
0,5 ng/ml bFGF	0.2336389	0.3285546	0.3836580	0.3790003	0.4162532
kontrola	0.2945897	0.3374020	0.3260796	0.2354990	0.2454243

test:	7				
T:	1	2	3	4	7
0,01 ng/ml bFGF	0.25766943	0.12622729	0.12723889	0.06820038	0.26619255
0,1 ng/ml bFGF	0.09810252	0.11039643	0.11207677	0.13283605	0.11859012
0,5 ng/ml bFGF	0.11777235	0.26303829	0.10923233	0.23004692	0.19961910
kontrola	0.06427995	0.09317871	0.09248015	0.13579918	0.06711204

Počet dat (counts)

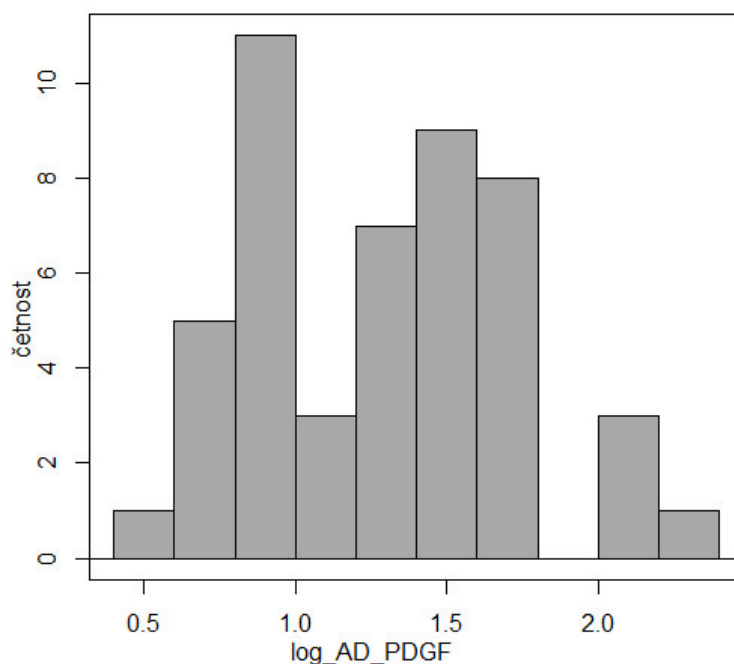
test:	6					7				
T:	1	2	3	4	7	1	2	3	4	7
0,01 ng/ml bFGF	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4
0,1 ng/ml bFGF	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4
0,5 ng/ml bFGF	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4
kontrola	6	6	6	6	6	4	4	4	4	4

11.5. Multi-way ANOVA pro inhibici PDGF-BB adiponectinem

Počet buněk byl vyjádřen poměrem v daném čase k prvnímu času. Data byla transformována logaritmicizací pro test multi-way ANOVA, který vyžaduje normální rozložení. Normalita rozložení dat byla testována testem Shapiro-Wilk. Použitá data zobrazuje tabulka 7, z těchto dat byly použity dva poslední časy a to čas T3/T1 a T4/T1. Adiponektin měl vliv na stimulaci buněk pomocí PDGF ($P < 0,001$).

Summary statistic

conc	test	T.T1	poměr	log_AD_PDGF
20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF:16	8 :24	T3/T1:24	Min. :1.792	Min. :0.5833
30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF:16	9 :24	T4/T1:24	1st Qu.:2.432	1st Qu.:0.8888
5 ng/ml PDGF-BB :16			Median :3.722	Median :1.3139
			Mean :3.996	Mean :1.2898
			3rd Qu.:4.930	3rd Qu.:1.5953
			Max. :9.977	Max. :2.3003



Obrázek 28 Histogram - inhibice PDGF adiponektinem, data byla logaritmována a byly použity pouze časy T4/T1 a T7/T1

Shapiro-Wilk normality test

data: log_AD_PDGF

W = 0.96654, p-value = 0.185

Anova Table (Type II tests)

Response: log_AD_PDGF

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
conc	1.2320	2	32.0856	1e-08 ***
T/T1	6.2628	1	326.2029	< 2.2e-16 ***
test	0.0383	1	1.9955	0.1663571
conc:T/T1	0.0339	2	0.8841	0.4218489
conc:test	0.3033	2	7.8985	0.0014321 **
T/T1:test	0.2750	1	14.3260	0.0005618 ***
conc:T/T1:test	0.0513	2	1.3358	0.2756792
Residuals	0.6912	36		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Průměr (means)

test:	8		9	
T/T1:	T3/T1	T4/T1	T3/T1	T4/T1
20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	0.8182947	1.676623	0.8732624	1.476488
30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	0.7024930	1.441961	0.9341941	1.501752
5 ng/ml PDGF-BB	1.1226388	2.146314	1.1206470	1.662962

směrodatná odchylka (std.deviation)

test:	8		9	
T/T1:	T3/T1	T4/T1	T3/T1	T4/T1
20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	0.1581510	0.04785867	0.1260294	0.09154265
30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	0.1152513	0.03961073	0.2212656	0.21115733
5 ng/ml PDGF-BB	0.1138658	0.11665221	0.1691633	0.12343966

počet (count)

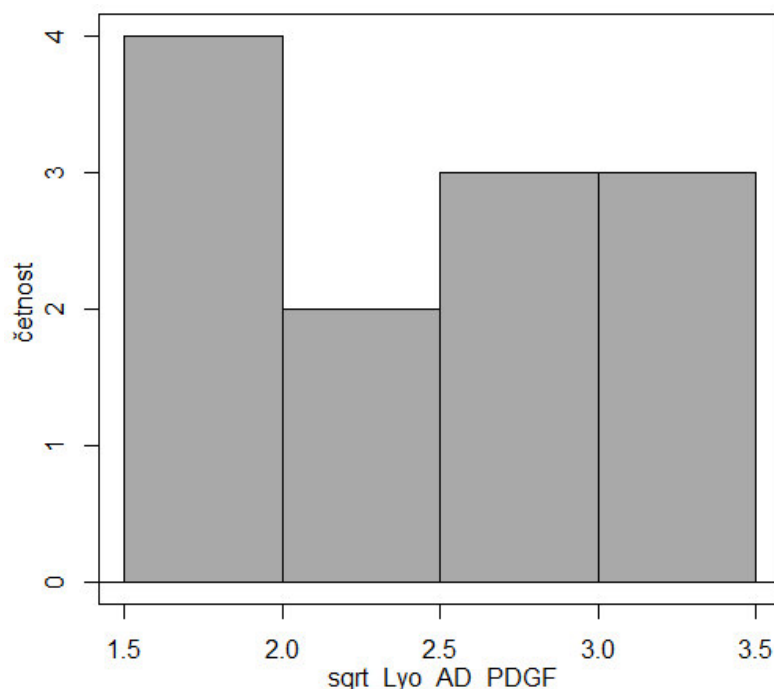
test:	8		9	
T/T1	T3/T1	T4/T1	T3/T1	T4/T1
20µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	4	4	4	4
30µg/ml ADIPO+ 5ng/ml PDGF	4	4	4	4
5 ng/ml PDGF-BB	4	4	4	4

11.6. Multi-way ANOVA pro inhibici PDGF-BB lyofilizovaným adiponektinem

Počet buněk byl vyjádřen poměrem v daném čase k prvnímu času. Data byla transformována odmocněním pro test multi-way ANOVA, který vyžaduje normální rozložení. Normalita rozložení dat byla testována testem Shapiro-Wilk. Použitá data zobrazuje tabulka 9, z těchto dat byly použity dva poslední časy a to čas T4/T1 a T7/T1. Adiponektin měl vliv na stimulaci buněk pomocí PDGF ($P < 0,001$). Lyofilizace tedy neměla vliv na biologickou aktivitu adiponektinu.

Summary statistic

	conc	T	count	sqrt_Lyo_AD_PDGF
30µg/ml AD + PDGF-BB:	6	T4/T1:6	Min. : 2.557	Min. :1.599
5 ng/ml PDGF-BB:	6	T7/T1:6	1st Qu.: 3.097	1st Qu.:1.759
			Median : 5.501	Median :2.335
			Mean : 5.691	Mean :2.319
			3rd Qu.: 7.290	3rd Qu.:2.694
			Max. :10.257	Max. :3.203



Obrázek 29 Histogram - inhibice PDGF lyofilizovaným adiponektinem, data byla odmocněna a byly použity pouze časy T4/T1 a T7/T1

Shapiro-Wilk normality test

data: sqrt_Lyo_AD_PDGF
 $W = 0.90592$, $p\text{-value} = 0.1891$

Anova Table (Type II tests)

Response: sqrt_Lyo_AD_PDGF

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
conc	0.56043	1	47.6403	0.0001243 ***
T	3.09254	1	262.8885	2.105e-07 ***
conc:T	0.01497	1	1.2726	0.2919688
Residuals	0.09411	8		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Průměr (means)

	T4/T1	T7/T1
30µg/ml AD +PDGF-BB	1.630506	2.575170
5 ng/ml PDGF-BB	1.992078	3.078025

Směrodatná odchylka (std. deviations)

	T4/T1	T7/T1
30µg/ml AD +PDGF-BB	0.0476626	0.01754069
5 ng/ml PDGF-BB	0.1811671	0.10795284

Počet dat (counts)

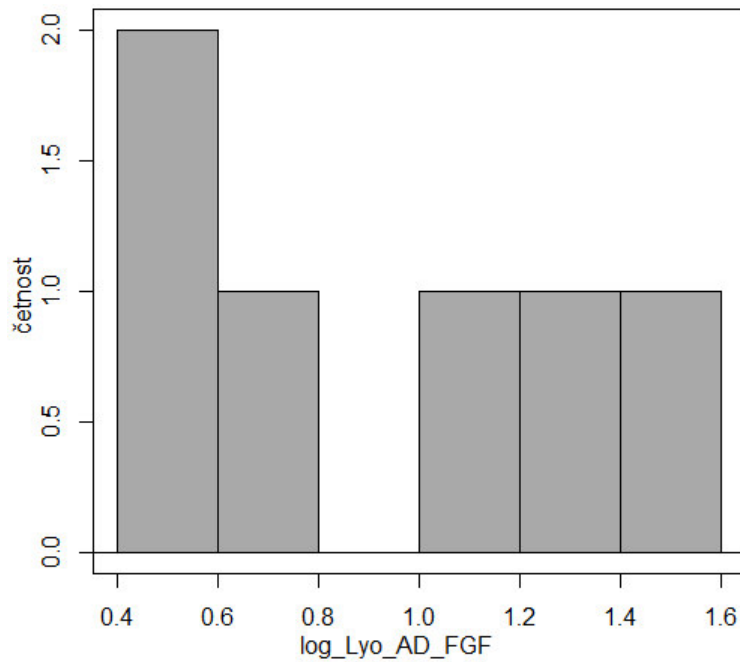
	T4/T1	T7/T1
30µg/ml AD +PDGF-BB	3	3
5 ng/ml PDGF-BB	3	3

11.7. Multi-way ANOVA pro inhibici bFGF lyofilizovaným adiponektinem

Počet buněk byl vyjádřen poměrem v daném čase k prvnímu času. Data byla transformována logaritmizací pro test multi-way ANOVA, který vyžaduje normální rozložení. Normalita rozložení dat byla testována testem Shapiro-Wilk. Použitá data zobrazuje tabulka 9, z těchto dat byl použit poslední čas (T7/T1). Adiponektin měl malý vliv na stimulaci buněk pomocí FGF ($P < 0,05$). Lyofilizace neměla vliv na aktivitu adiponektinu

Summary statistic

	conc	T	poměr	log_Lyo_AD_FGF
0,1 ng/ml bFGF :	3	T7/T1:6	Min. : 1.708	Min. :0.5353
30µg/ml AD+bFGF: 3			1st Qu.: 1.850	1st Qu.:0.6108
			Median : 2.449	Median :0.8890
			Mean : 2.723	Mean :0.9358
			3rd Qu.: 3.217	3rd Qu.:1.1644
			Max. : 4.606	Max. :1.5273



Obrázek 30 Histogram - inhibice FGF lyofilizovaným adiponektinem, data byla logaritmována a byl použit pouze poslední čas (T7/T1)

Shapiro-Wilk normality test

data: log_Lyo_AD_FGF

W = 0.93113, p-value = 0.5889

Anova Table (Type II tests)

Response: log_Lyo_AD_FGF

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
conc	0.59268	1	13.787	0.0206 *
Residuals	0.17195	4		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Průměr (means)

0,1 ng/ml bFGF 1.250118

30µg/ml AD+bFGF 0.621534

Směrodatná odchylka (std. deviations)

0,1 ng/ml bFGF 0.2623264

30µg/ml AD+bFGF 0.1310044

Počet dat (counts)

0,1 ng/ml bFGF 3

30µg/ml AD+bFGF 3