

Tkáňové kultury

E-mail: jipa@sci.muni.cz
Tel: 532 146 223 / 116

Tkáňové kultury (= TK, Tissue culture - TC)

– růst živočišných buněk a tkání *in vitro*

1885 – ROUX, kuřecí embryonální buňky v solném roztoku

1940 – EARLE, první kontinuálně kultivovaná linie, buňky myši pojivové tkáně, jejím subklonem je dnešní linie L929

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

(Pro jednoduchost se dále budou uvažovat jen buňky, problematika tkání a orgánů bude stručně zmíněna na závěr.)

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

Různé druhy záření, tlak, různá pole,...

- dodržet podmínky na které jsou buňky zvyklé/přizpůsobené

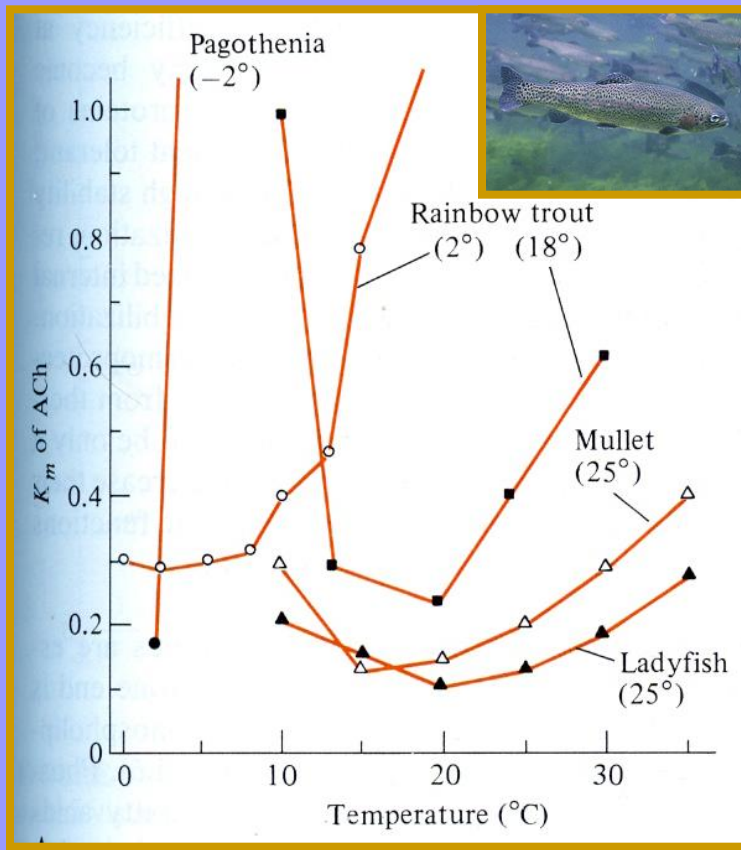
TEPLOTA

Buňky se kultivují při optimální teplotě pro organismus, z kterého byly izolovány. Pro buněčné linie odvozené od člověka a běžných laboratorních zvířat (myš, krysa, makak, pes,..) je to většinou 37°C. Pro buněčné linie odvozené od poikilothermních živočichů (ryby, hmyz, hád'átko - *Caenorhabditis*) od 10 do 25°C.



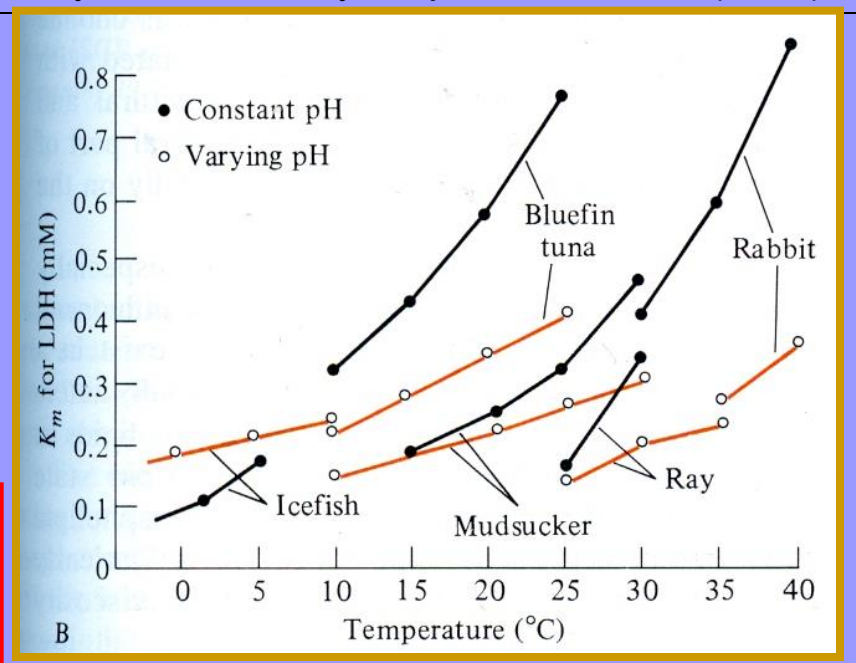
Teplota modifikuje biochemické děje

- s vyšší teplotou se urychlují chemické reakce
- v závislosti na teplotě se mění i afinita substrátu k enzymům – K_m (Michaelis-Menten koeficient)



Změna velikosti K_m pro acetylcholin k acetylcholinesterázu (AChE)
 P – hlaváč, Rt – pstruh duhový, M – cípal, L -Elops

Závislost K_m na teplotě pro pyruvát a LDH u různých obratlovců
 Bt – tuňák obecný, R – králík, Ray – rejnok, M – hlaváč (Gobii)



Některé organismy mají tak více enzymových isoformů pro stejnou reakci pro snadnější regulaci homeostáze za různých teplot!

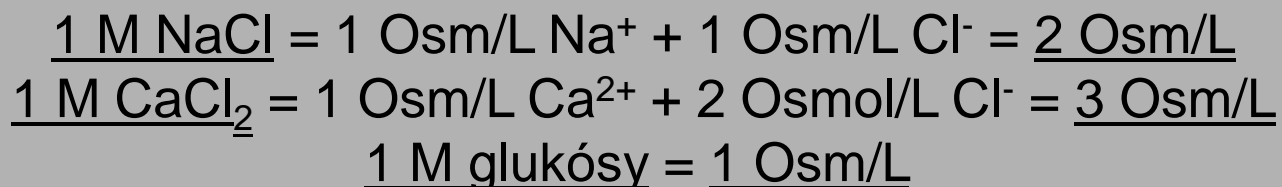
Na **CHEMICKÉ** faktory lze nahlížet jako na média (jejich komponenty) v kterých buňky rostou a plyny, které tato média obklopují případně jsou v nich rozpuštěny.

Složení médií

Veškeré komponenty použité pro přípravu médií musí být vysoké kvality, s minimem nežádoucích příměsí (minimální chemická čistota p.a. – pro analýzu)

Základem je **voda** a v ní rozpuštěné **anorganické soli**. Soli jsou zdrojem nezbytných iontů, a hrají významnou úlohu v zajištění vhodného **pH** (optimum většinou **7.2-7.4**) a **osmotického tlaku / Osmomolarita** (optimum většinou **280-320 mOsmol/L**). Nejzákladnější ionty obsažené v médiích jsou: **Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻, HCO₃⁻**.

Osmotický tlak je roven koncentracím rozpuštěných iontů/molekul



Esenciální látky pro růst buněk

Média musí také obsahovat **sacharidy** (většinou glukózu, jako zdroj energie), **aminokyseliny** (esenciální i neesenciální), **vitaminy** a **stopové prvky**.

Většina zejména savčích buněk vyžaduje

Insulin (příjem glukózy) **Transferin** (příjem železa) **Selen** (nezbytný pro funkci oxidačně-redukčních enzymů) – také tzv. minimální přídavek do médií

Další doplňky

Lipidy (mastné kyseliny), steroidní látky, hormony, cytokiny, peptidy, proteiny extracelulární matrix, proteiny séra, nukleosidy,... Mnohé z těchto látek jsou suplovány přídavkem **séra** (5 - 10 - 20%), v některých případech i jinými zdroji málo charakterizovaných směsí proteinů a dalších látek. Významnými doplňky jsou ochranné látky jako **2- β -merkaptoetanol** (snižuje oxidativní stres a může sloužit i jako zdroj síry) a **antibiotika** (ochrana proti mikroorganismům případně selekční agens)

Základní média v tkáňových kulturách

Základem jsou tzv. **Earliho soli**: chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, síran horečnatý, dihydrogenfosfát sodný

BME with EBSS – základní (basal) médium s Earliho solemi

Alfa MEM – alfa modifikované Eaglovo médium

DMEM – Dulbekovo MEM, běžné pro adherentní buněčné linie

RPMI 1640 – zejména buňky hematopoetického původu

IMDM – Iscovovo modifikované Dulbeccovo médium,
vhodné pro rychle rostoucí buňky (v základu neobsahuje Fe ionty)

Hamovo F12 – médium bohaté živinami, často v kombinaci 1:1 s DMEM
jako základ pro kultury bez séra

DMEM – high glucose



COMPONENTS	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75	30	0.4
Glycyl-L-Glutamine	221	806	3.65
L-Arginine hydrochloride	211	84	0.398
L-Cysteine 2HCl	313	63	0.201
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	210	42	0.2
L-Isoleucine	131	105	0.802
L-Leucine	131	105	0.802
L-Lysine hydrochloride	183	146	0.798
L-Methionine	149	30	0.201
L-Phenylalanine	165	66	0.4
L-Serine	105	42	0.4
L-Threonine	119	95	0.798
L-Tryptophan	204	16	0.0784
L-Tyrosine	181	72	0.398
L-Valine	117	94	0.803
Vitamins			
Choline chloride	140	4	0.0286
D-Calcium pantothenate	477	4	0.00839
Folic Acid	441	4	0.00907
Niacinamide	122	4	0.0328
Pyridoxine hydrochloride	204	4	0.0196
Riboflavin	376	0.4	0.00106
Thiamine hydrochloride	337	4	0.0119
Inositol	180	7.2	0.04
Inorganic Salts			
Calcium Chloride (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	147	264	1.8
Ferrous Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404	0.1	0.000248
Magnesium Sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	246	200	0.813
Potassium Chloride (KCl)	76	400	5.33
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84	3700	44.05
Sodium Chloride (NaCl)	58	6400	110.34
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	164	141	0.816
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180	4500	25
Phenol Red	376.4	15	0.0399

Sérum

- nejčastěji **bovinní fetální***, ale i jiné zdroje

- lidské, koňské, kozí, myší,...

- embryonální (fetální), novorozenecká, dospělá

**fetální => nízká hladina nízkoafinitních imunoglobulinů (protilátek)*

- **různé stupně kvality**

- testy na přítomnost endotoxinů

- testy na snášenlivost konkrétním typem buněk

- testy na přítomnost virů

-

- **různé země původu** (USA, Austrálie,...)

- **různé šarže** (lot number)

normální x inaktivní sérum

- inaktivace séra = 30 (45) minut při 56 °C
=> inaktivace komplementu atd...



pH

Při přípravě médií je pH nastaveno/doladěno HCl (1M) a NaOH (1M).

pH v kultuře se mění v důsledku metabolismu buněk, zejména produkcí laktátu a CO_2

V průběhu kultivace je udržováno:

- 1) Přítomnými ionty, zejména fosfátovými (z fosforečnanů)
- 2) Proteiny s pufracími schopnostmi
- 3) **Systémem $\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{CO}_2$**
- 4) Alternativně silně pufrujícími látkami jako je HEPES, BES, TES

K orientační detekci pH média v kultuře slouží fenolová červeň přidávaná do médií.



pH

Pufrační systém $\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{CO}_2$ (NaHCO_3)



<http://www2.biomed.cas.cz/d331/vade/ph.html>

Kultivace : **otevřená** – s výměnou plynů (zejména přísun CO_2 z vnějšku)

uzavřená – bez výměny plynů (používá se ~ ½ množství NaHCO_3)

- Při otevřeném systému kultivace se nejčastěji udržuje atmosféra s navýšeným obsahem **CO_2** , standardně 5% CO_2 (regulovaný přísun ze zásobní bomby) a **95% vody** (regulovaný přísun, nebo častěji spontánním odparem ze zásobníku).

V některých speciálních případech je vhodné použít polotekutá až pevná média

Takové médium se připraví přidavkem:

- **Agaru** (je třeba dávat pozor na přehřátí složek média během přípravy, teplota by neměla být vyšší jak 40°C)
- **Metylcelulósy**
- **Fibrinogenu** (po aktivaci -> fibrin / fibrinová síť)
- je možné použít i čistě syntetické polymery, např. **metakryláty (hydrogely)**

Trvanlivost a uchování médií a jejich doplňků

!doporučení výrobce – dodavatele!

- **Solné roztoky** jsou stabilní i při R.T. (room temperature ~ 20°C)
- **Většina složek média (aminokyseliny, vitaminy, sacharidy,..)** je stabilní po dobu jednoho roku při 4°C a tmě
- **Glutamin** v roztoku se nejpozději po 3 měsících začne rozkládat = je třeba ho přidávat samostatně ze zamražené zásoby. Jeden rok při 4°C se ale ještě považuje za akceptovatelný, možno nahradit médií s Glutamax a pod.
- **Sérum** při 4°C až 2 měsíce, při -20°C až 3 roky
- **Obecně při teplotách pod -70°C je vše stabilní minimálně 1 rok**
- **Stabilita** je závislá na tekutosti / zmrzlosti roztoku, což je ovlivněno složením a koncentrací rozpuštěných komponent. Např. soli a glycerol posouvá bod tuhnutí k nižším teplotám (při -20°C není 10% roztok glycerolu úplně zmrzlý) a DMSO k vyšším teplotám (tuhne už při ~ +6°C)

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

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

1. PREVENCE + MONITORING!

2. LÉČENÍ

PREVENCE

PROVOZ

- Laboratoř TC (LTC) je pokud možno oddělená od ostatních prostor, nevětrá se přímo okny, ale pokud možno přes ventilační systém s filtrací
- Pravidelně se provádí úklid a desinfekce povrchů (prostředky na bázi chloru – SAVO, Jodu – Ajatin, 70% EtOH,.....)
- LTC je periodicky vysvěcována germicidní (širokospektré UV) lampou
- Pracovníci LTC používají pracovní oblečení určené jen pro LTC a před vlastní prací si desinfikují ruce příslušnými prostředky (minimálně použití 70% EtOH)
- S kulturami se pracuje pokud možnou pouze ve Flow-boxu

MATERIÁL

Čisté materiály se podle své odolnosti / vlastností sterilizují-desinfikují:
(čistý z čistých surovin nebo po důkladném omytí speciálními detergenty)

autoklávováním (120°C, 20-30 minut)

– solné roztoky, některé pufry, agar, želatina/kolagen, některý plastik,..

suchým teplem (180°C, 3 až 4h)

– sklo, vzácně některý plastik (do 120°C)

zářením gama (vzácně i UV – jen povrchy)

– plastik, sklo

filtrváním

- vzduch (HEPA filtry s póry 0,3 μm), roztoky hlavně média a séra běžně přes filtry s póry 0,2 μm)

omytím (2-5% aldehydy, 70% EtOH, 2-5% fenol, 5-10% peroxid vodíku,....)

– nástroje, pracovní plochy, některý plastik, sklo (celkově může být málo účinné a poškozující čištěný materiál)

plamenem

-kovy, sklo

parami alkylačních činidel

- někdy kombinace s autoklávováním (etylén oxid), speciální aplikace jako dekontaminace filtrů flow-boxů, dekontaminace místností (formaldehyd), vždy problém pro obsluhu!

Významným prevenčním agens v médiích jsou antibiotika.

Kritéria pro antibiotika:

- nesmí inhibovat růst a ani ovlivňovat metabolismus buněk
- musí ochraňovat kulturu po celou dobu experimentu
- netoxické a bezpečné pro uživatele
- kompatibilní s ostatními složkami média
- rozpustné v netoxických rozpouštědlech

a) Ochranné proti mikroorganismům

Nejčastěji penicilin/streptomycin nebo gentamycin, příležitostně tetracyklin

b) Selektivní (viz. Příprava transgenních linií)

Geneticin (G418), Hygromycin, Puromycin

c) Speciální

Mitomycin C

Antibiotikum	likviduje	mechanismus účinku	mechanismus rezistence
Penicilin (s amostatně se neužívá)	G+	ISBS	
Penicilin G	G+	ISBS	
Ampicilin	G+, G-		
Penicilin/streptomycin	G+, G-		
Penicilin/streptomycin/ neomycin	G+, G-		
Gentamycin	G+, G-, mykoplazmata	IP, aminoglykosidové	
Kanamycin	G+, G-, mykoplazmata	IP, aminoglykosidové	
Streptomycin	G+, G-	IP, aminoglykosidové	mutace v genu pro S12 ribozomální protein, inaktivace prostřednictvím aminoglykosidové transferázy (Podává se obvykle v kombinaci, kvůli vysokému riziku vzniku rezistence.)
Neomycin	G+, G-	IP, aminoglykosidové	
Paromomycin	G+, G-, ř. protozoa, omezeně helminti	IP, aminoglykosidové	
Spektinomycin	G-, G+ (gonokoky)	IP, bakteriostatický účinek s trukturálně podobné aminoglykosidům.	mutace v genu pro ribozomální protein S5.
Tylosin	G+, mykoplazmata	IP, makrolidové	
Tetracyklin	G+, G-	IP	ztráta permeability buněčné stěry
Mytomycin C	G+, G-	Isynt. DNA	
Polymyxin	G-	Polypeptid s hydrofóbním koncem, který funguje jako kationický detergent. Vazba na lipid A bakteriálních LPS, vytváří póry do cytoplazmatické membrány	
Amphotericin B (makrolidové)	kvasinky, plísně	vazba na steroly membrány hub, vytváří kanály do buněčné membrány	
Nystatin	kvasinky, plísně	vazba na steroly membrány hub, vytváří kanály do buněčné membrány	

Přehled nejčastěji používaných antibiotik

G+ ... gram pozitivní bakterie

G- ... gram negativní bakterie

IP ... inhibuje proteosyntézu

ISBS ... inhibuje syntézu bakteriální stěny

MONITORING

- **V kultuře nebo v zásobních roztocích něco roste co tam nemá být**
(plísně = chomáčky; kvasinky = pučící buňky, řetízky; bakterie = drobné útvary, kulovité až vláknité, někdy řetízky)
- **Dochází k rychlému vyčerpání média (rychle mění barvu z červené na žlutou = pokles pH)**
- **Buňky špatně rostou, nemají správný tvar, adherentní se pouští podkladu**
- **Mikroskopické barvení na celkovou DNA (zviditelnění mikroorganismů, zejména endoparaziti)**
- **Stanovení specifických antigenů (Imunocytochemie, western blot)**
- **Detekce specifických sekvencí pro jednotlivé organismy PCR metodou**
- **Kontrolní kultivací médií samotných nebo po přidavku specifických substrátů**
- **Výsledky experimentů nejsou reprodukovatelné / jsou chaotické**
- **Buňky jsou citlivější ke stresu**

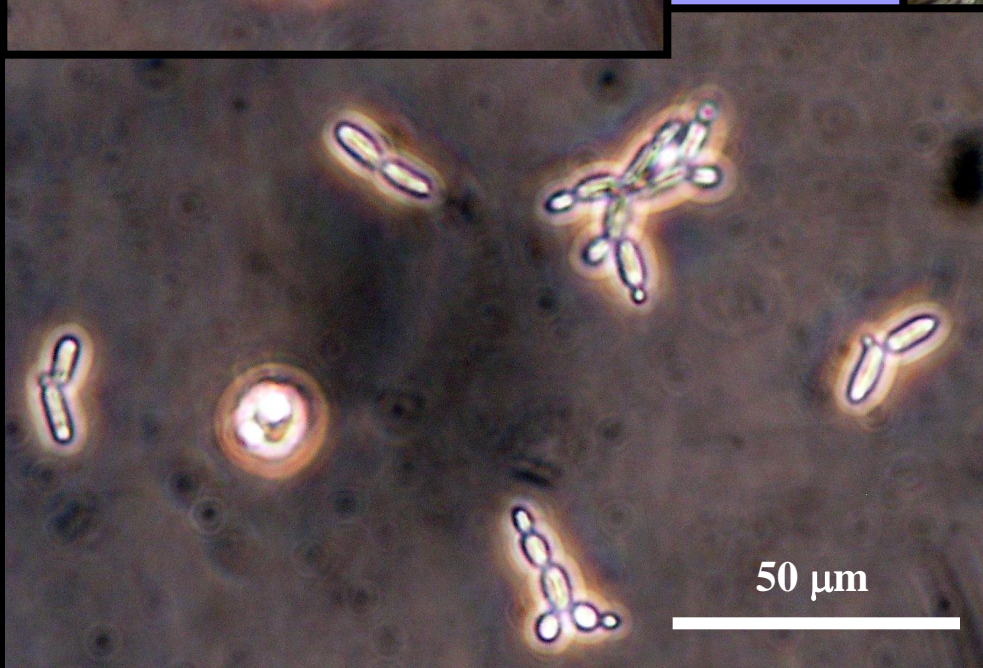
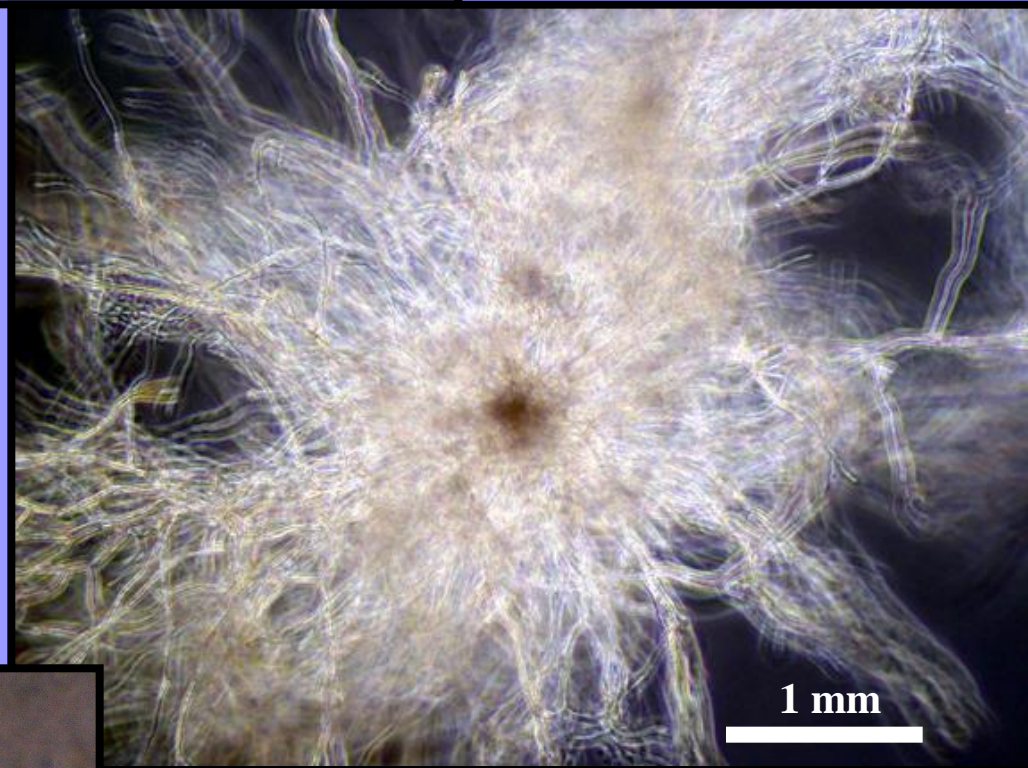
LÉČENÍ

- **Likvidace zasažené kultury**
- **Kombinací antibiotik**
- **Kultivací buněk v kompatibilním organismu**
(např. v břišní dutině = ascites)



?

Chomáček plísně v kultuře



Kvasinky
+
Buňky (HL-60)

Mycoplasmata

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

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

- **Vitální barvení na DNA (Hoechst)**
- **Detekce specifických DNA sekvencí pomocí PCR**
- **In situ hybridizace (RNA , DNA)**
- Měření enzymatické aktivity, systémy s transgenními buňkami (fy. Invivogene,...)
- (Inkorporace uracilu (mycoplasmata) X uridinu (eukaryontní buňky))

ZDROJE:

- **infikované buňky v TC!**
- práce se zvířaty v laboratoři TC
- pracovníci laboratoře TC

LÉČENÍ:

- **Kombinací antibiotik**
- Pasážováním buněk v kompatibilním organismu (ascites – volně v břišní dutině)

Viabilita některých druhů mycoplasmat za různých podmínek

Survival of MG on Various Substances

Cotton	4 days	Feathers	4 days
Rubber	2 days	Hair	3 days
Straw	2 days	Ear	4 hours
Shavings	8 hours	Nose	1 day
Wood	1 day	Skin	<4 hours
Feed	4 hours	Buffer	1 day

Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. N.H. Christensen, Christine A. Yavari, A.J. McBain, and Janet M. Bradbury, Avian Pathology (1994) 23:127-143.

Survival of MS on Various Substances

Cotton	2 days	Feathers	3 days
Rubber	8 hours	Hair	8 hours
Straw	12 hours	Ear	4 hours
Shavings	4 hours	Nose	12 hours
Wood	12 hours	Skin	0 hours
Feed	0 hours	Buffer	NT

Shimizu, T., Nagatomo, H., and Nagahama, K. Zentralblatt fur Bakteriologie (1990), Supplement 20, 950-952.

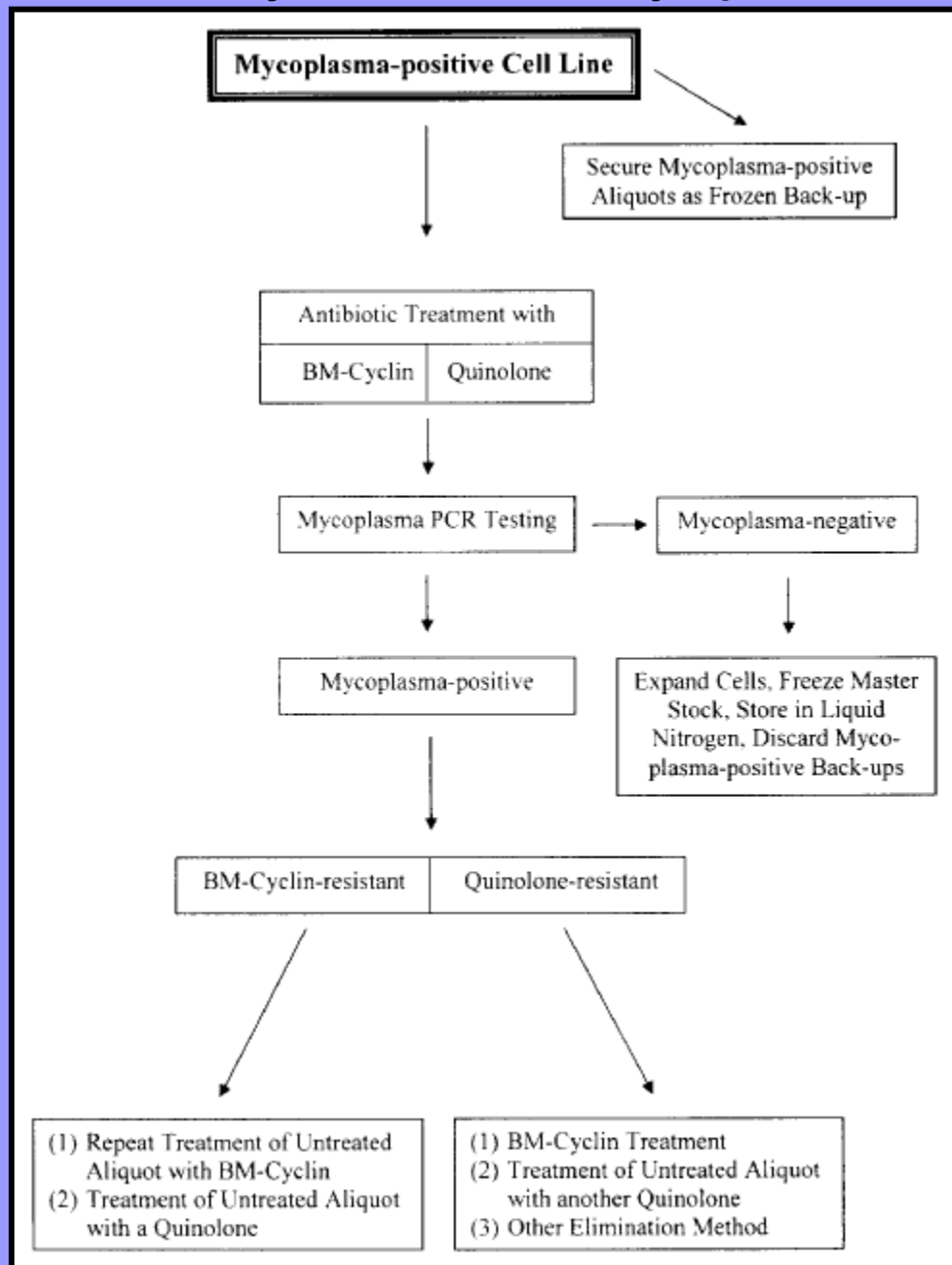
Survival of MG under Various Conditions

Sunlight	<15 to 120 min
UV light	30 - 90 min
Well water with 1% serum	7 days
Well water	4 - 5 days
50% soil extract	1 - 3 days
Dry at 4° C	61 days
Dry at 20° C	10 - 14 days

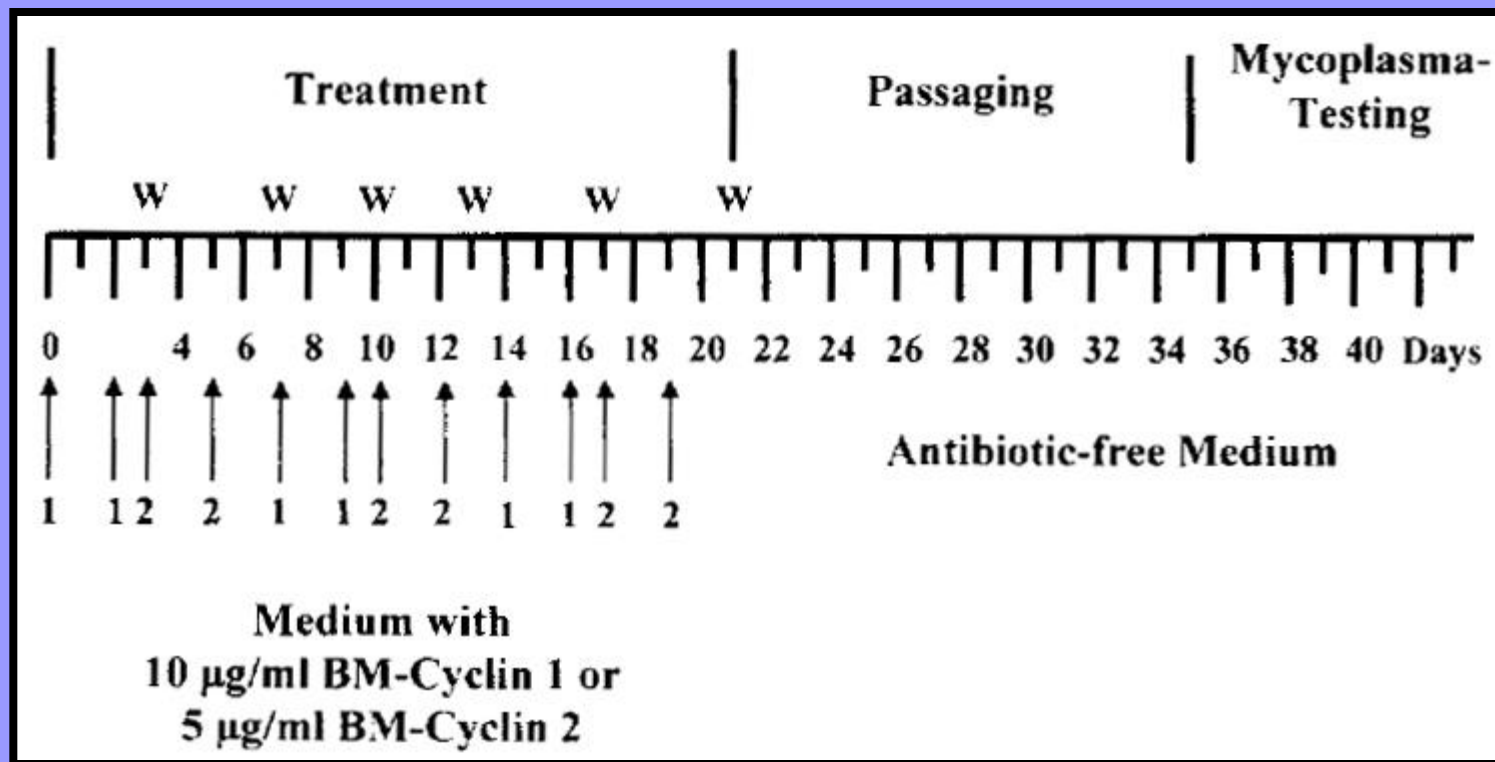
Survival of MS under Various Conditions

Sunlight	30 to 120 min
UV light	30 - 60 min
Well water with 1% serum	1 - 2 days
Well water	1 - 2 days
50% soil extract	1 - 2 days
Dry at 4° C	51 - 77 days
Dry at 20° C	10 - 21 days

Obecné schéma léčení buněčných linií v LTK na mycoplasmata

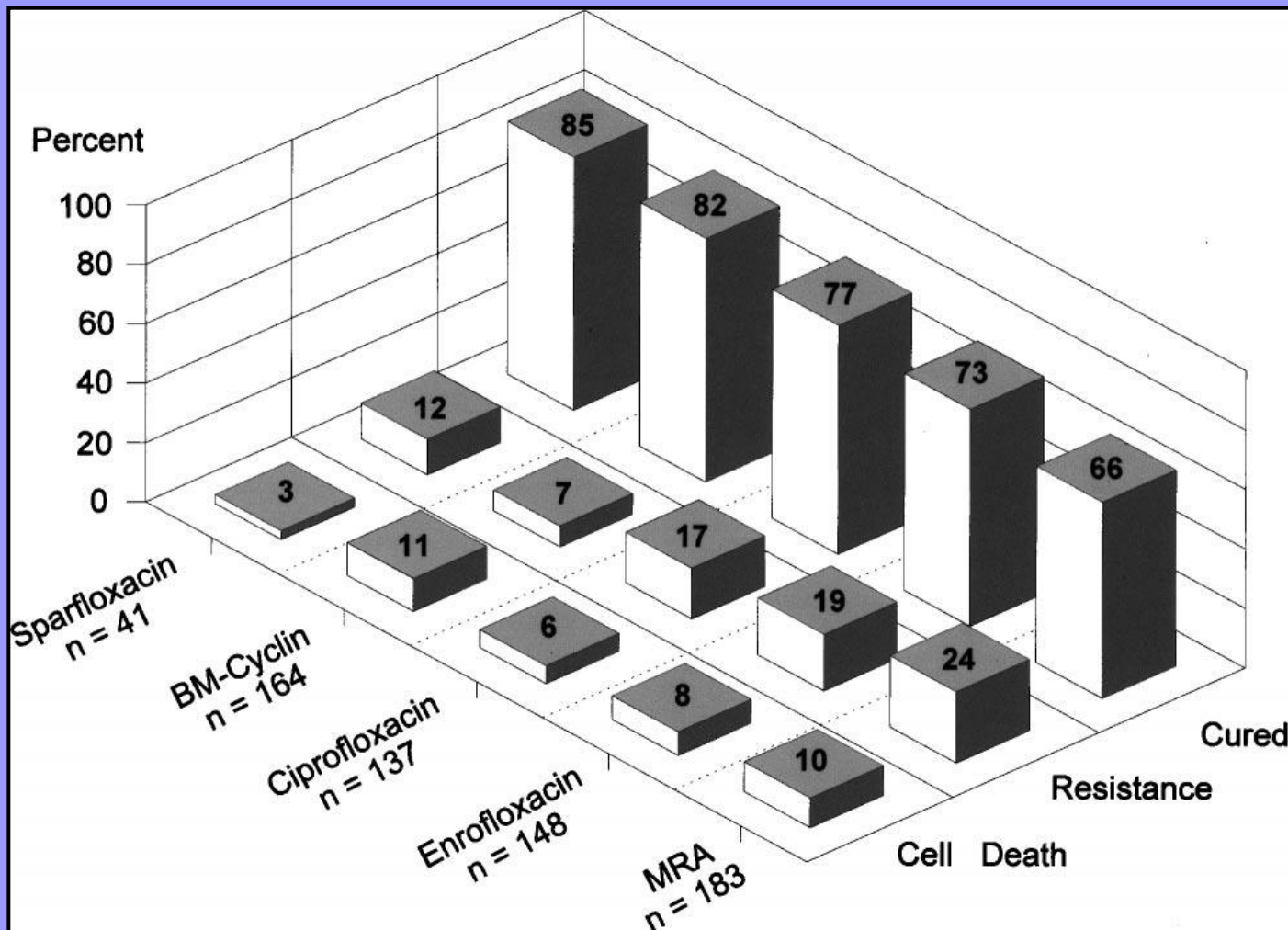


Příklad postupu léčení buněčné kultury na mycoplasmata
přípravkem BM-cyclin fy Roche



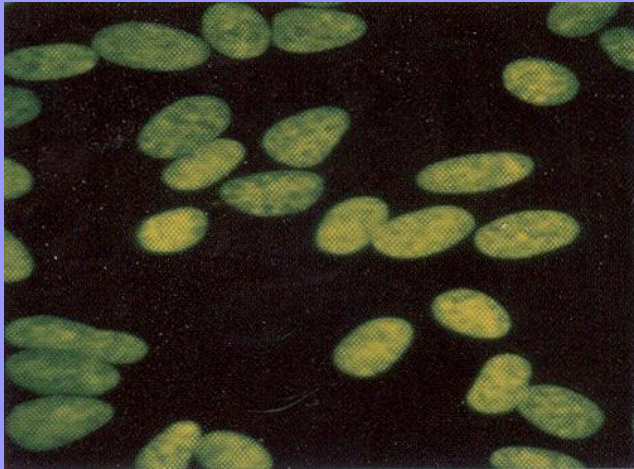
Účinnost komerčně dostupných antibiotik v léčení kultur napadených mycolpasmaty

Uphoff & Drexler 2001

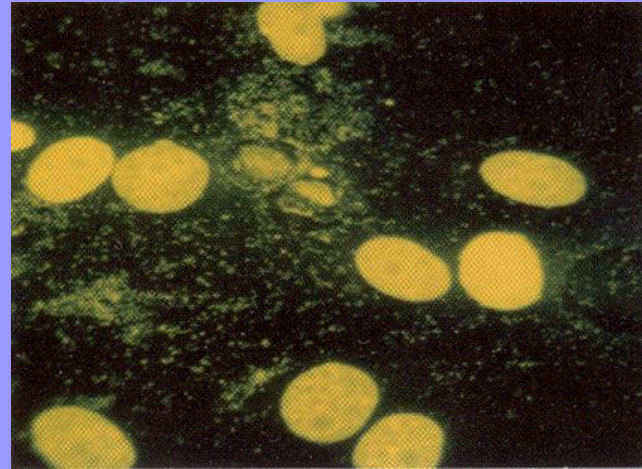


n – počet testovaných buněčných linií

Zdravá buněčná kultura



Buněčná kultura infikovaná mycoplasmaty



(vitální barvení pomocí Hoechst 33258)

MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit



MycoZap™ Mycoplasma Elimination Reagent



Základní vybavení laboratoře tkáňových kultur

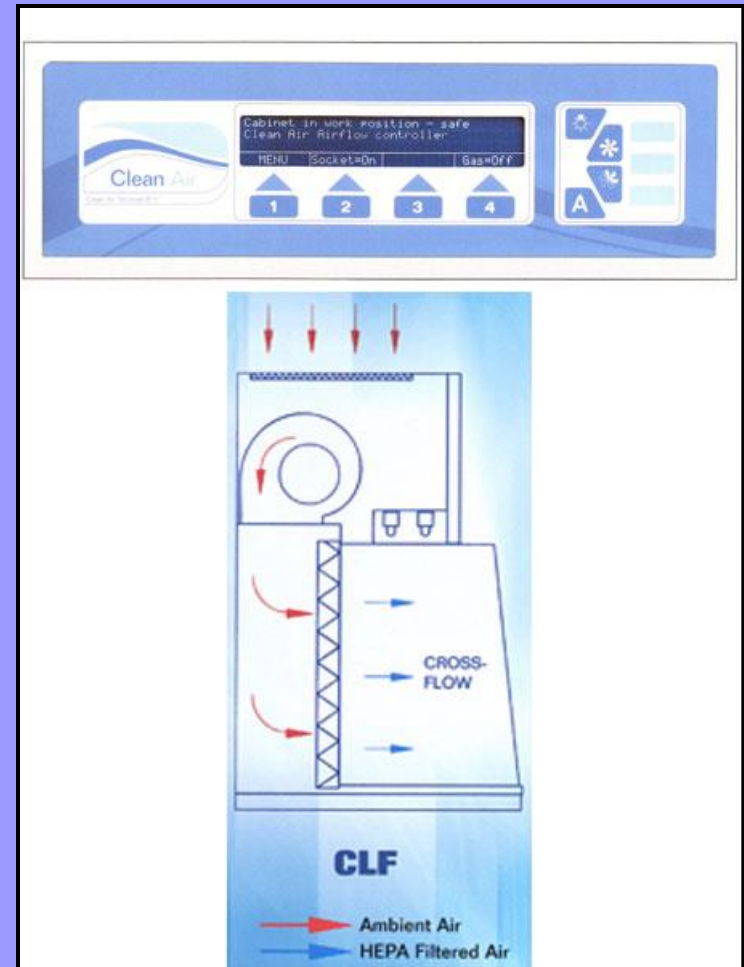


CO₂ inkubátor

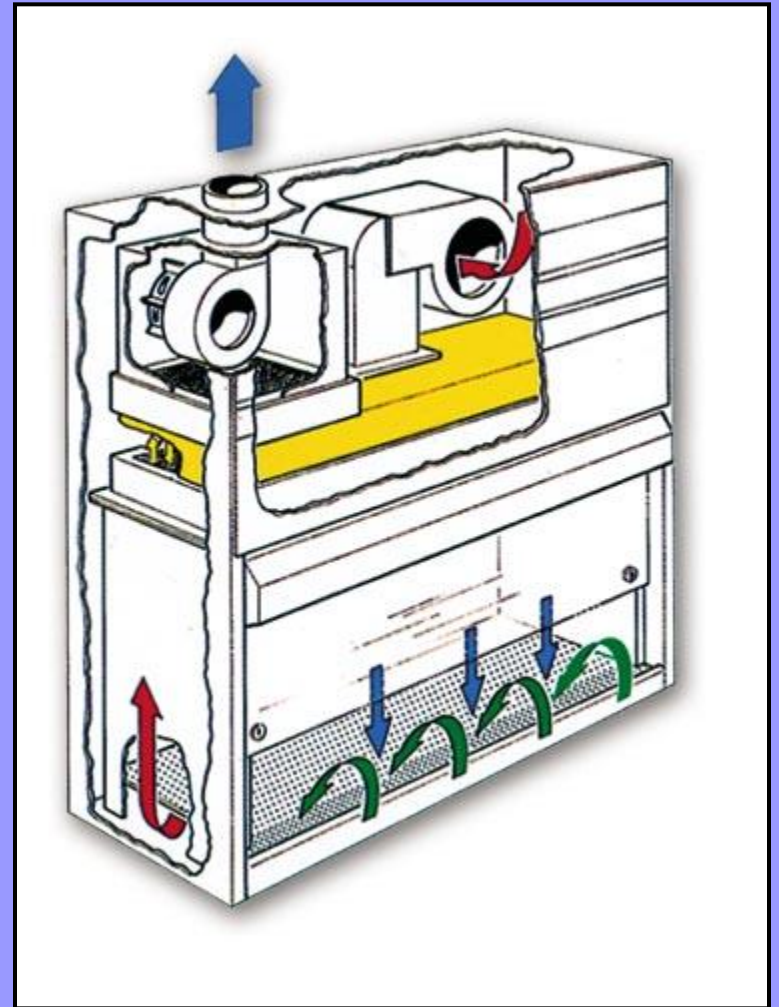
Inverzní mikroskop



Flow-box / laminární box - základní

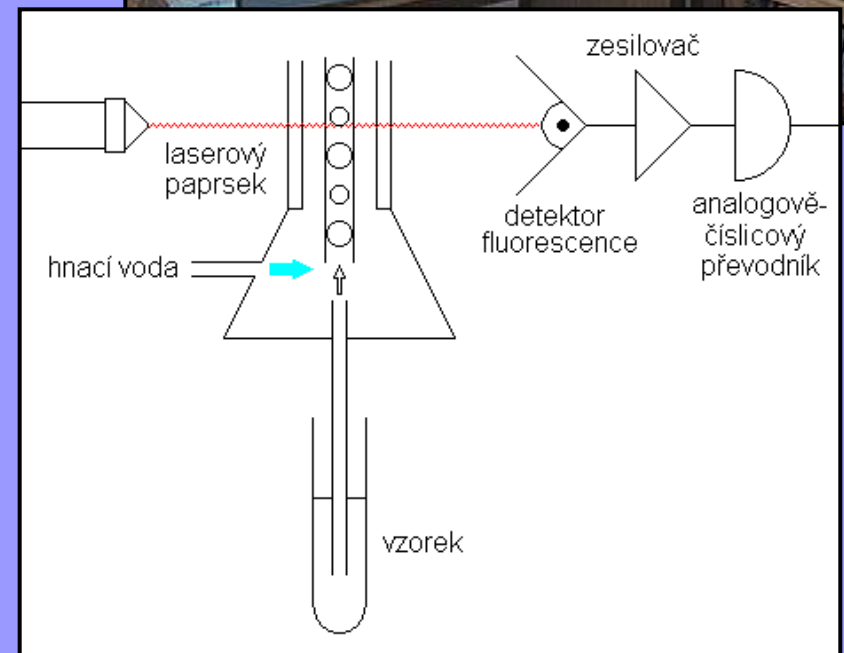


Flow-box / laminární box – biohazard,



Průtokový cytometr / Flow-cytometer (FACS)

Počítač částic







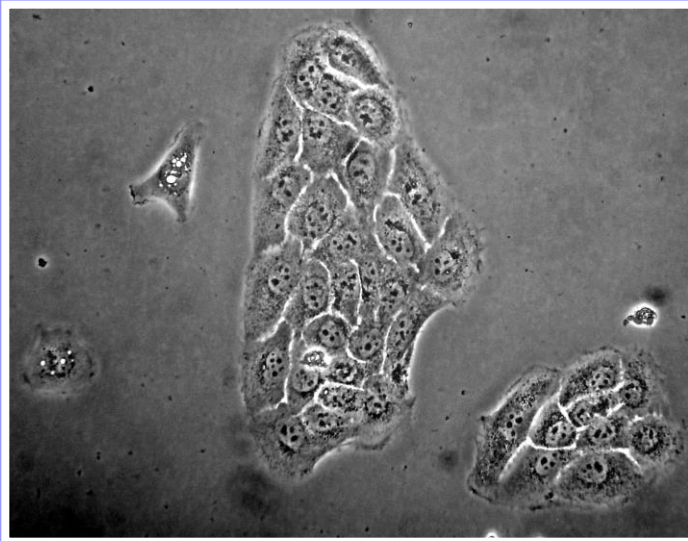
- Inkubátor / termostat s regulací teploty a složení atmosféry
- Flow-box = laminární box
- Inverzní mikroskop, nejlépe s fázovým kontrastem (Nomarského – vnitřní struktura buněk; Hoffmanův (reliéfní) – plastické znázornění povrchů)
- Počítač částic (hemocytometr, Bürkrova komůrka, Coulter Counter, FACS,...)
- Lednice a mrazáky
- Kontejner s tekutým N₂ (-196°C), nebo extrémně hluboko-mrazicí box (-150°C a méně)
- Autokláv (parní sterilizátor), horkovzdušný sterilizátor
- Centrifuga
- Pipetor / Pipetus (manuální nebo elektronický)
- Automatické pipety
- Technické zázemí – umývárna, sklad, šatna,...

BUŇKY V TC

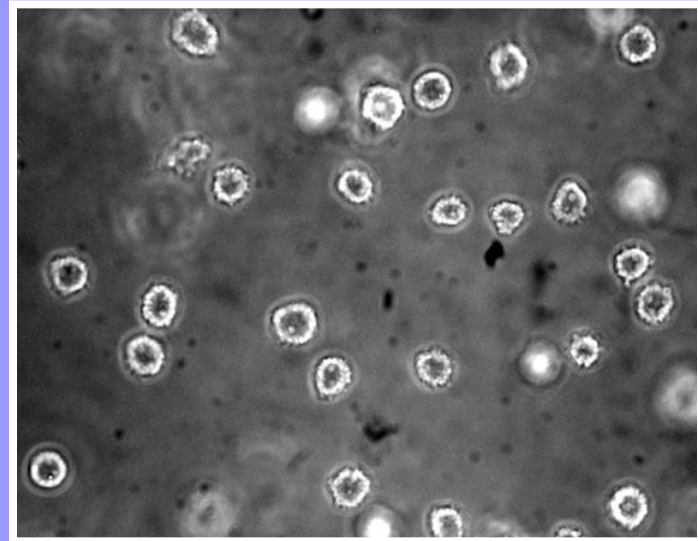
Podle způsobu kultivace

- **Adherentní** (většina, rostou přichyceny k podkladu)
- **Suspenzní** (zejména buňky krve a jejich deriváty, volně se vznášejí v médiu)

Adherentní – (linie HaCaT)



Suspenzní – (linie HL60)

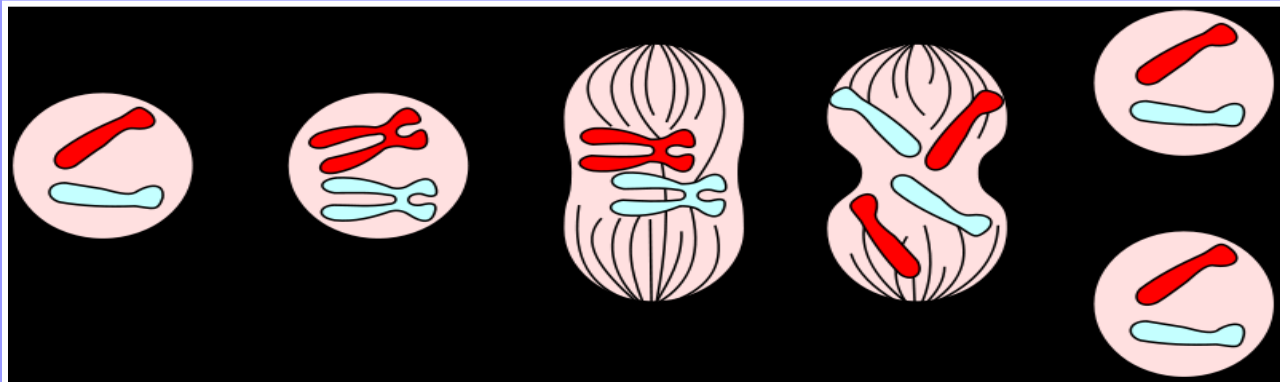
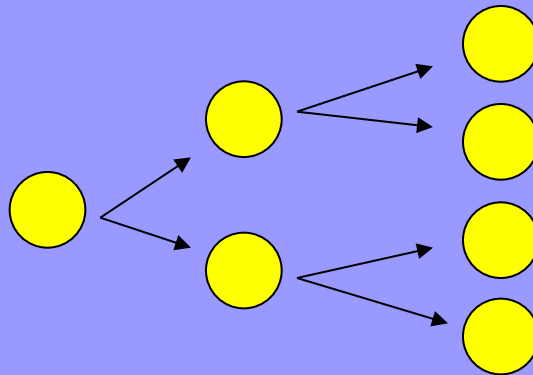


100 μm

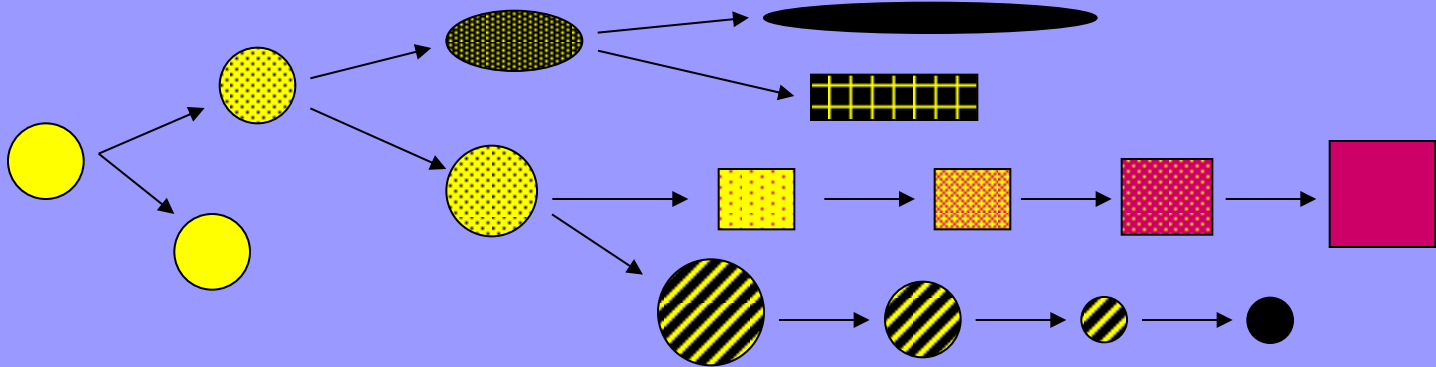
Buňky a jejich vlastnosti (v TC).

**PROLIFERACE x DIFERENCIACE
x APOPTÓZA**

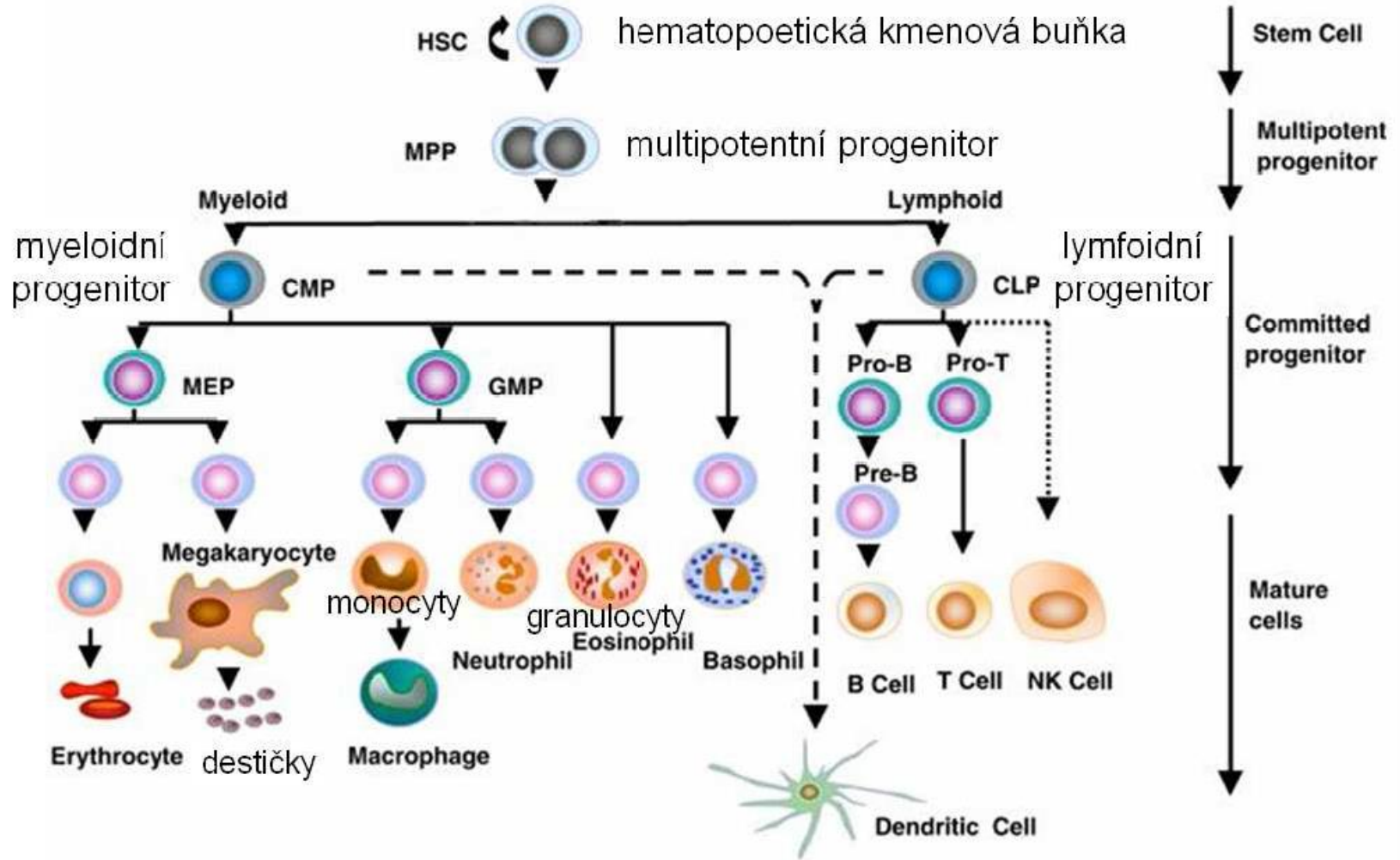
PROLIFERACE = dělení buněk



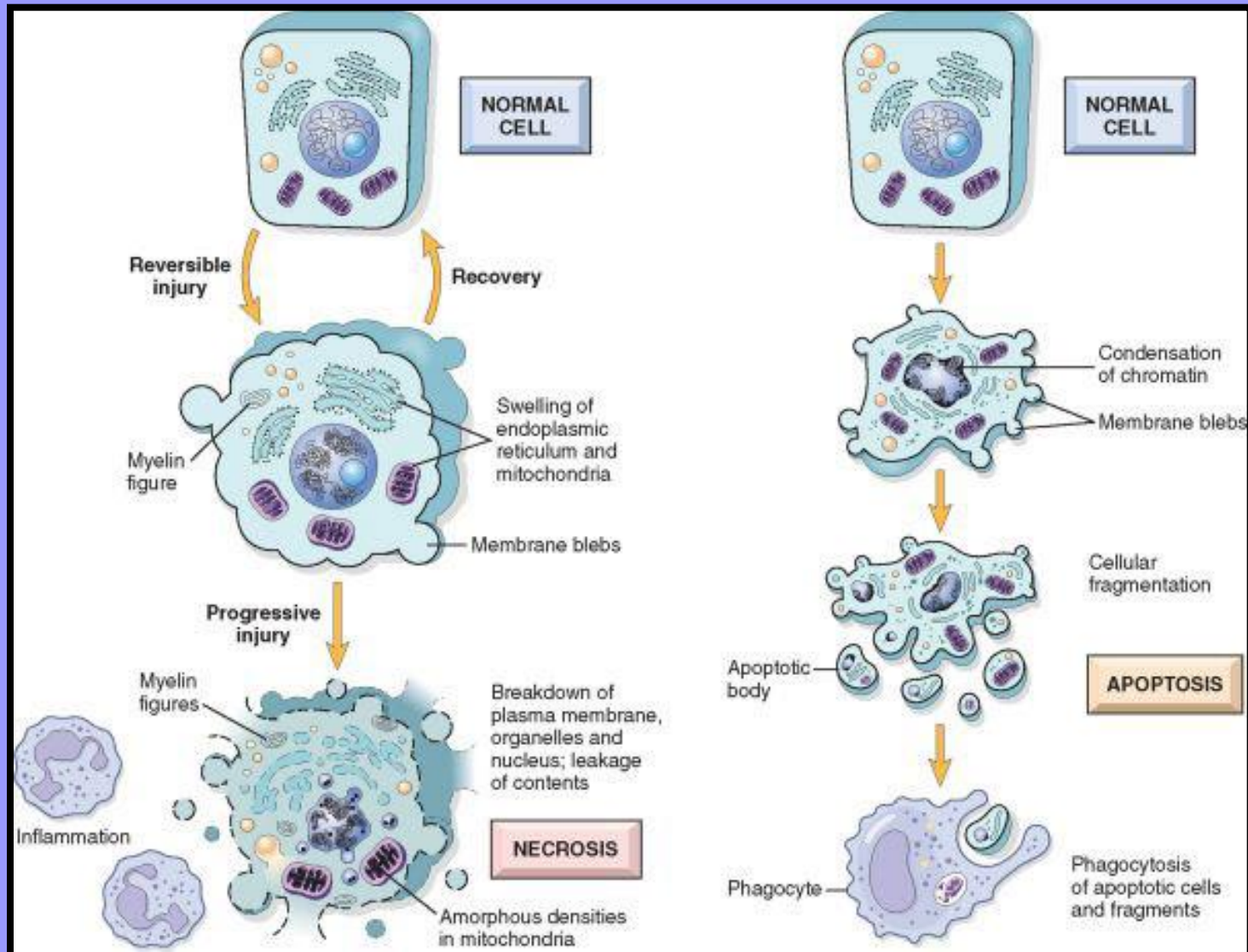
DIFERENCIACE = rozrůzňování buněk



Hierarchie hematopoézy



Apoptósa (+ nekrósa) - smrt buňky x viabilita buněk



Podle původu a vlastností

- Primokultury

Buňky izolované většinou ze zdravé tkáně

(obecně zdravý genom, ale většinou omezené možnosti kultivace/dělení buněk)

- Permanentní linie

Nejčastěji buňky izolované z nádorů, ale mohou být i ze zdravé tkáně, případně ze zdravé tkáně a immortalizované (většina chyby v genomu -> nestabilita, jsou ale nesmrtelné), adaptace na podmínky *in vitro*!!!

PRIMOKULTURY	PERMANENTNÍ LINIE
heterogení	klon
omezená životnost (H.I.)	nesmrtelné
Většinou náročnější na kultivaci	Obecně snadno kultivovatelné
variabilita izolací	genetická nestabilita

BUŇKY		
NORMÁLNÍ	IMORTALIZOVANÉ	NÁDOROVÉ
diploidní	diploidní / aneuploidní	diploidní / aneuploidní / polyploidní
senescence / Hayflick limit	nesmrtelnost	nesmrtelnost
Růst závislý na kontaktu s podložkou (anchorage-dependent)	Růst závislý na kontaktu s podložkou (anchorage-dependent)	Růst je nezávislý na kontaktu s podložkou (anchorage-independent)
+++/- specifické růstové faktory	+/- specifické růstové faktory	+/---- specifické růstové faktory
netvoří nádory	netvoří nádory	tvoří nádory

RŮST BUNĚK V TC

- A) Buňky se v kultuře nedělí – je třeba periodicky měnit kultivační médium (terminálně diferencované, postmitotické buňky, často u primokultur)
- B) Buňky se v kultuře dělí = **proliferují** – je třeba je pasážovat (ředit a měnit médium, většina buněk primokultur i permanentních linií)

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

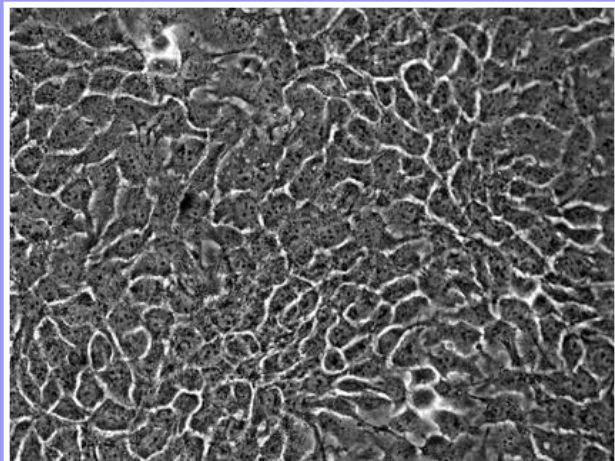
Adherentní linie* – mechanicky nebo **enzymatickým štěpením** vazeb buňky / substrát;
buňka / buňka
Enzymy - **trypsin**, collagenáza,..; inaktivace spec. inhibitory, vyředěním,
nadbytkem proteinů (např. sérem)
Podpůrné látky – EDTA (zejména vychytávání Ca^{2+})

Suspenzní linie – prostým ředěním

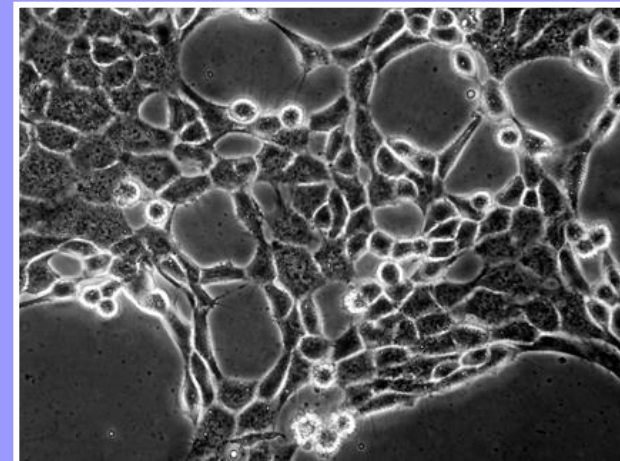
* Ve většině případů je u adherentních linií nutno počítat s jejich zvýšenými nároky na kvalitu podkladu, na kterém rostou. Běžně se používá ošetření 0.01 – 0.1 % roztokem želatiny (prasečí, hovězí) v dH_2O . Podle potřeby a typu buněk se používají ale i ostatní proteiny ECM.

Pasážování buněk pomocí tzv. trypsinizace (enzymatické rozvolnění)

konfluentní buňky (100%)



rozvolněné konfluentní buňky



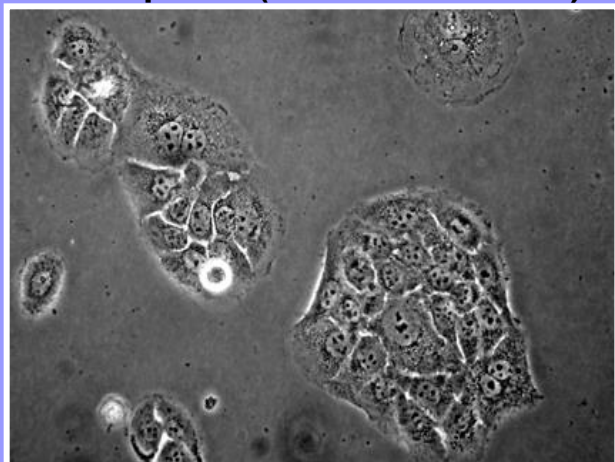
*rozvolnění buněk deplecí Ca^{2+} iontů
(chelatony např. EDTA)*



růst kultury



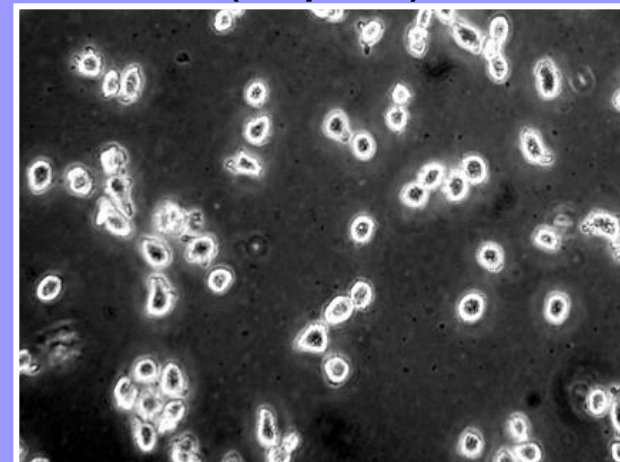
nová pasáž (konfluence ~20%)



*enzymatické štepení
např. trypsinem*



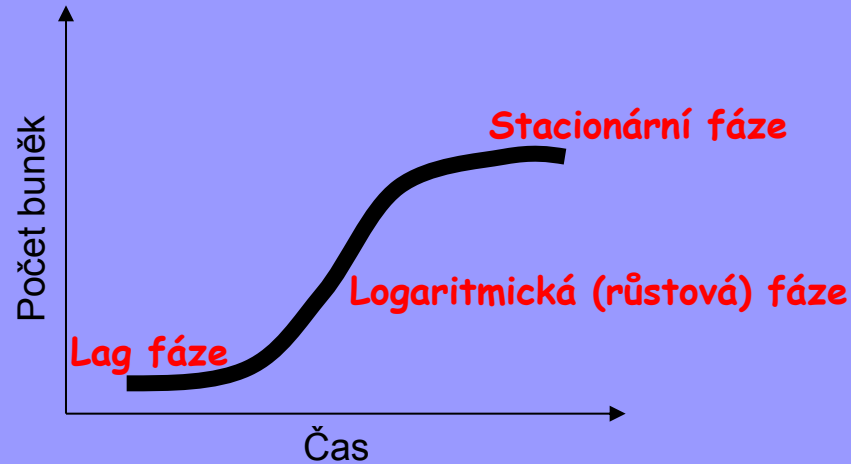
**enzymaticky rozvolněné buňky
(suspenze)**



*část buněk na novou misku,
do nového média*



Proliferaci buněk v kultuře charakterizuje **růstová křivka** s 3 fázemi



Dále je buněčná proliferace charakterizována:

Buněčná - denzita – počet buněk na ml nebo cm^2

- **konfluence** – počet buněk na plochu u adherentních linií (b. / cm^2 ,
častěji „%“ plochy)

Generační dobou - doba mezi dvěma mitózami / rozděleními buňky = délka
buněčného cyklu

Doubling time – čas potřebný ke zdvojnásobení buněk v populaci

Hayflickův limit – v případě většiny primokultur počet možných dělení, buněčně
specifické (senescence – stárnutí buněk, „quiescence –
klid/spánek buněk“)

Analýza buněčné proliferace

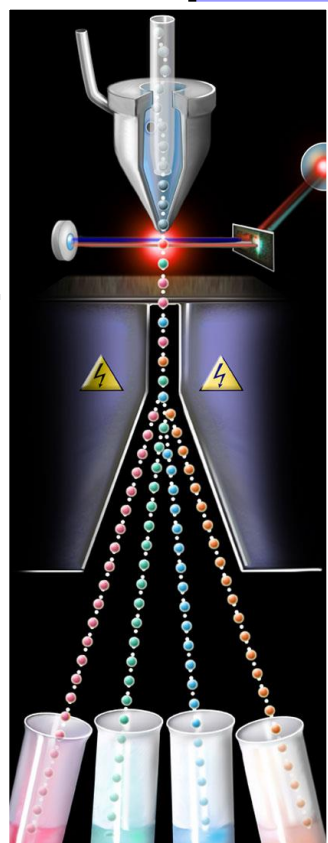
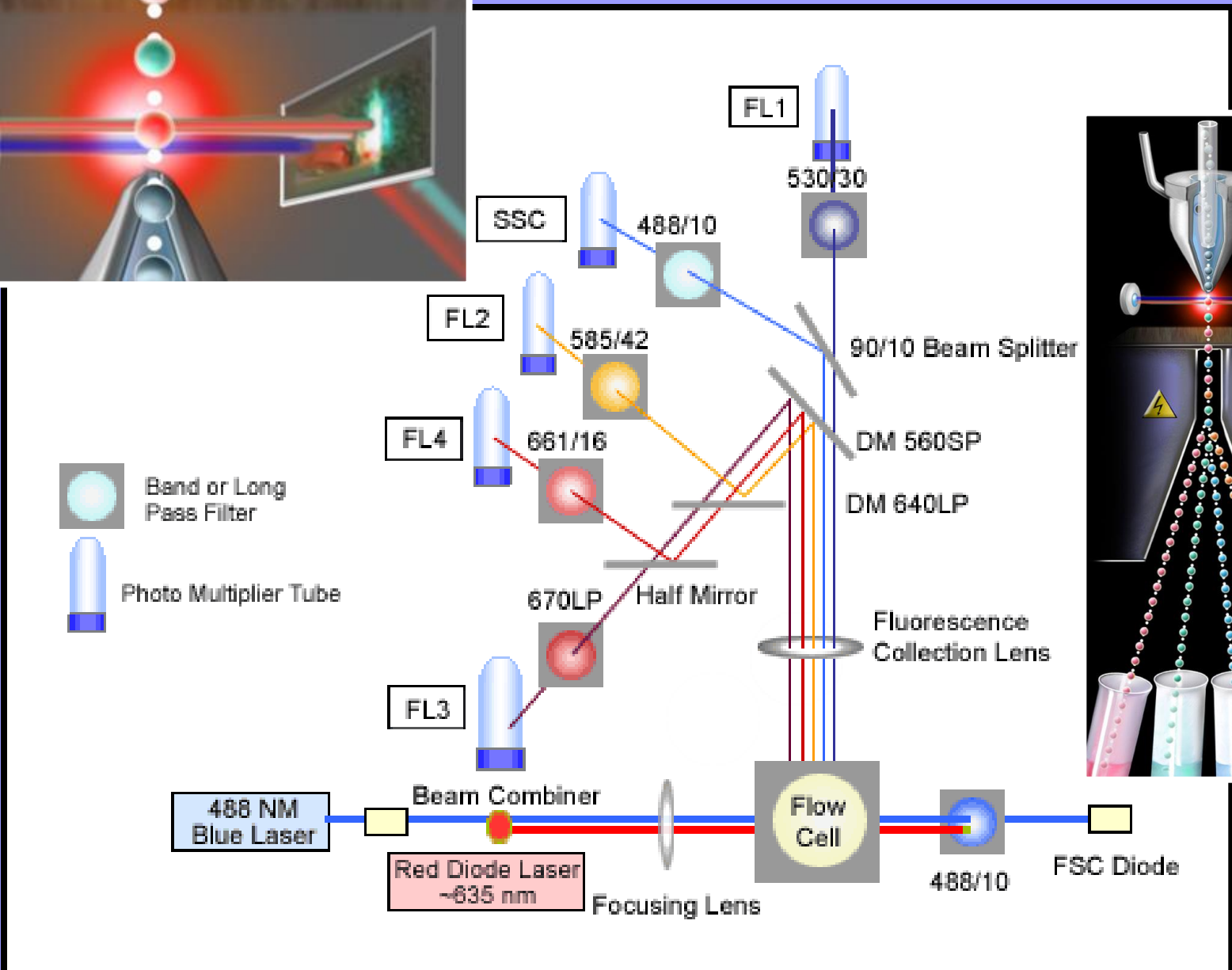
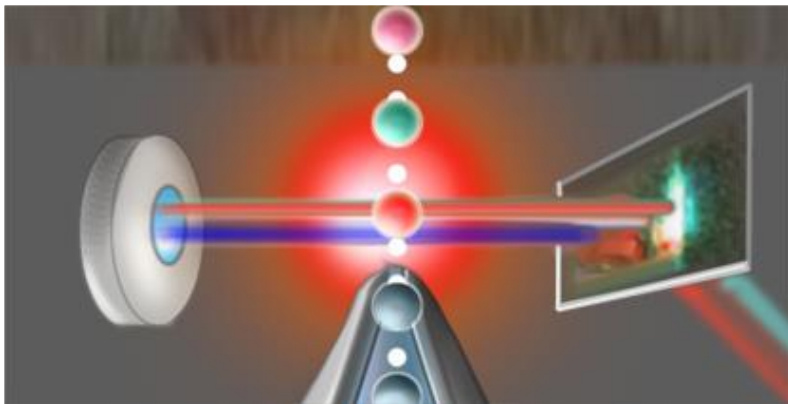
Počítáním buněk

- v mikroskopu (Bürkrova komůrka / hemocytometr)
- přístroji (Coulter counter – počítač částic, FACS – , průtokový cytometr, u většiny přístrojů potřeba vnitřního standardu)

Přírůstek v množství DNA (Ize použít i pro jednotlivou buňku)

- Inkorporace ^3H thymidinu (měří se přírůstek radioaktivity, celkový, nebo u jednotlivé buňky)
- Inkorporace BrdU (bromdeoxyuridinu, analog thymidinu), množství BrdU se stanoví pomocí protilátky (Ize na populaci i jednotlivé buňce)
- Celkové množství DNA v buňce -> stanovení fáze buněčného cyklu

Průtokový cytometr (Flow-cytometr / FACS)



Přírůstek celkových proteinů

- nepoužitelné u buněk produkujících velké množství extracelulární matrix (ECM)

Stanovení enzymatické aktivity (enzymy permanentních metabolických drah)

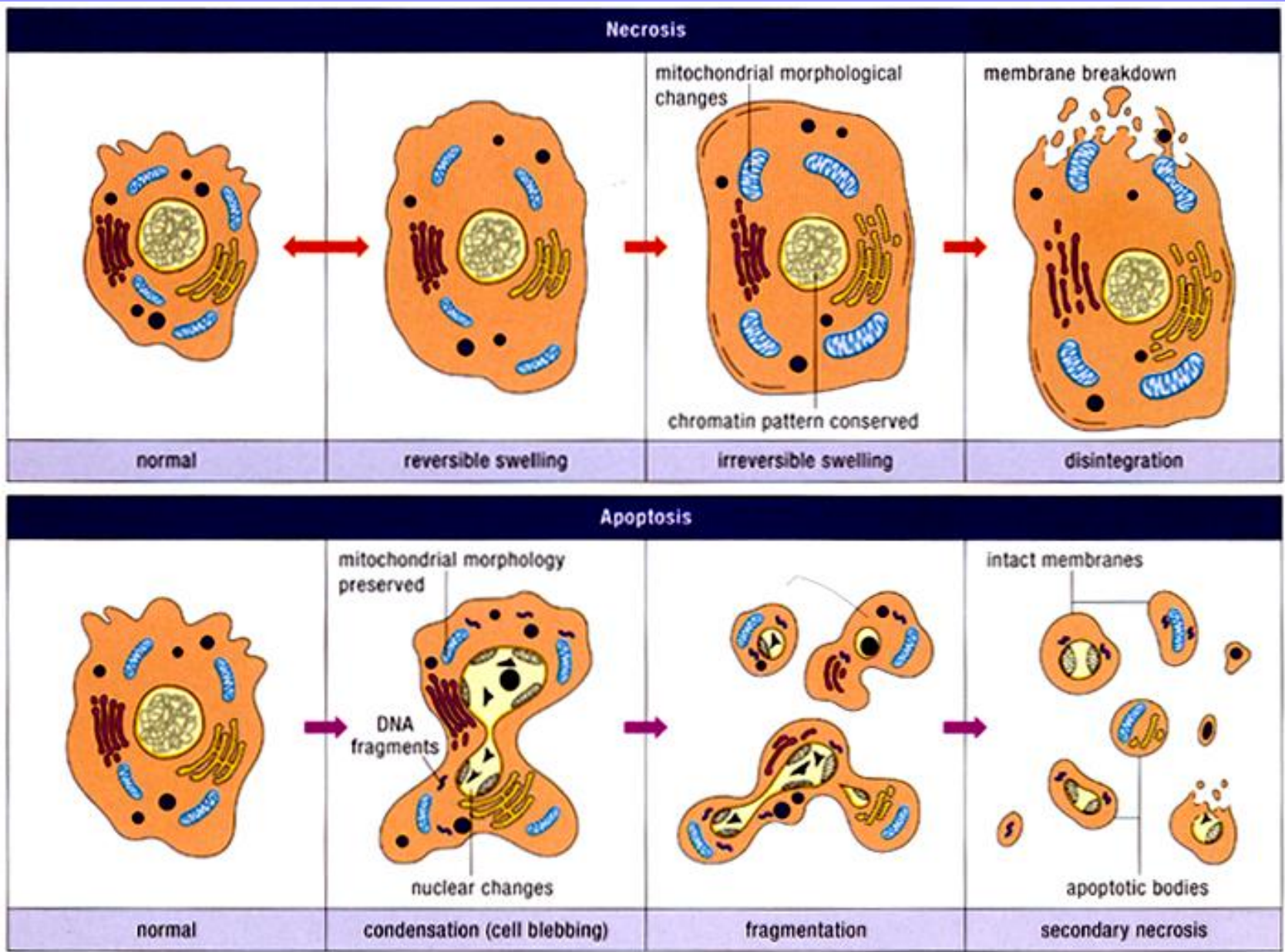
- testy využívající tetrazoliové soli (např. MTT, WST-1), které jsou redukovány na barevné formazany, které se dají stanovit spektrofotometricky (různé tetrazoliové soli jsou různě citlivé pro jednotlivé enzymatické (oxidačně redukční, NADP) systémy a i vhodné pro různé typy buněk)

Stanovení exprese specifických proteinů spřažených s proliferací

- imunohistochemicky (jednotlivé buňky)
 - western blotem (celkově v populaci)
- (PCNA, Ki-67, cykliny, inhibitory na cyklinech závislých kináz (cyklin-dependentní kinázy),..

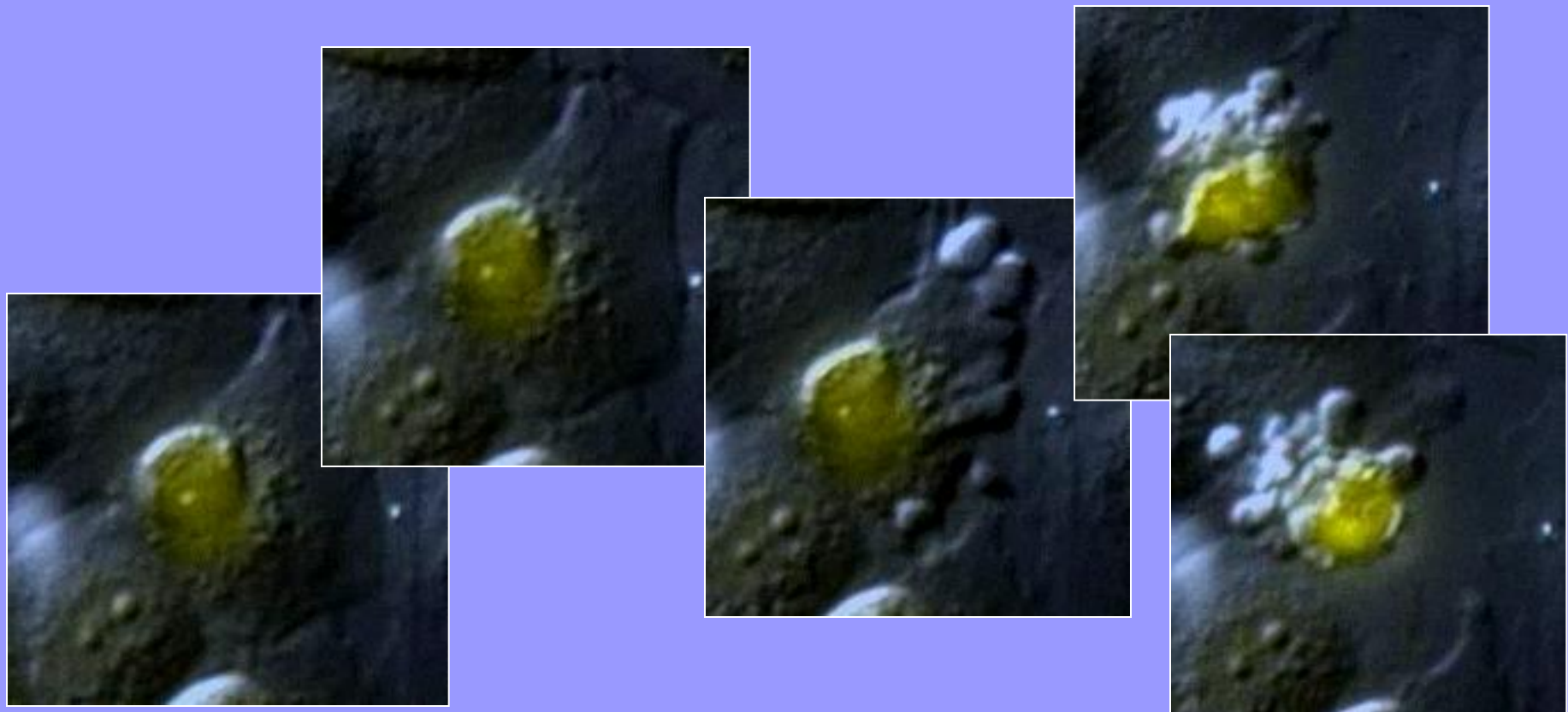
Nedílnou součástí sledování proliferační aktivity buněk je i detekce jejich životaschopnosti = **viability**, která je spojená s buněčnou smrtí = **apoptózou**, případně s **nekrózou**

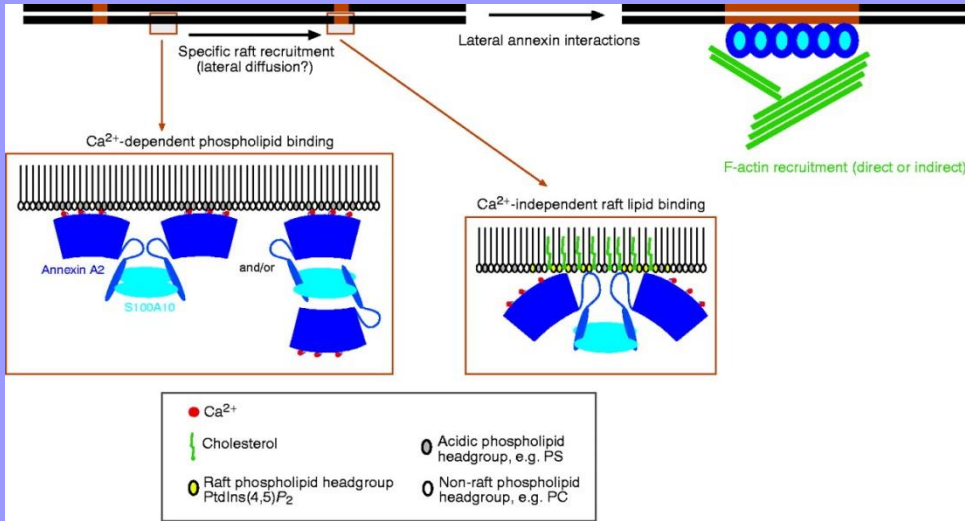
Analýza viability a apoptózy



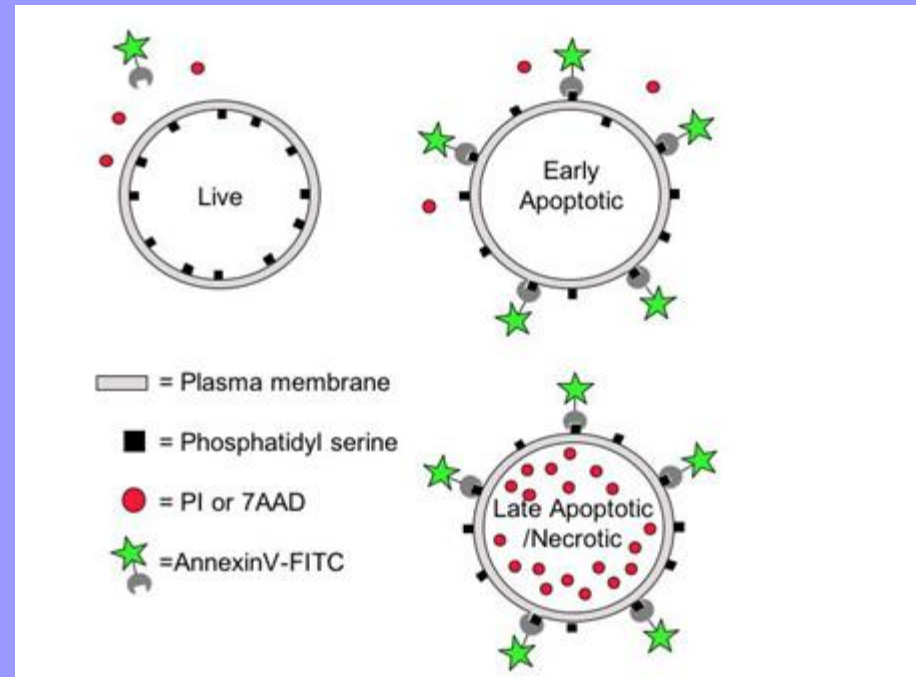
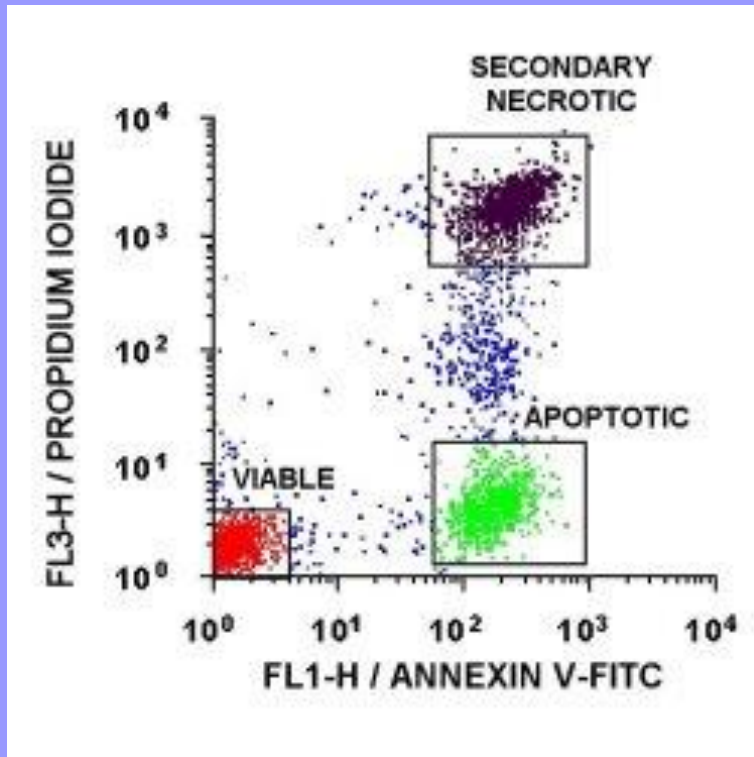
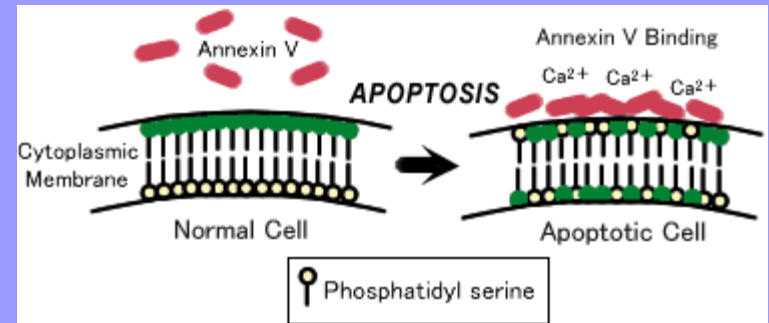
A) Testy založeny na kompaktnosti zdravé buňky a jejím „správném“ chování / funkci

- Morfologické změny (apoptická tělíška, výběžky, ...)
- Schopnost vylučovat barviva živými buňkami (eosin, bromfenolovou modř pro detekci ve VIS, propidium iodid pro fluorescenci: mikroskopicky, FACS)
- Enzymatická aktivita, nejčasteji esterázy (fluorescein diacetát pro fluorescenci: mikroskopicky, FACS, možno kombinovat s propidium iodidem)
- U adherentních buněk lze hodnotit počet adheřovaných a plovoucích (mrtvých / apoptických buněk)
- Změny ve struktuře cytoplasmatické membrány -> annexin / fosfatidylseriny



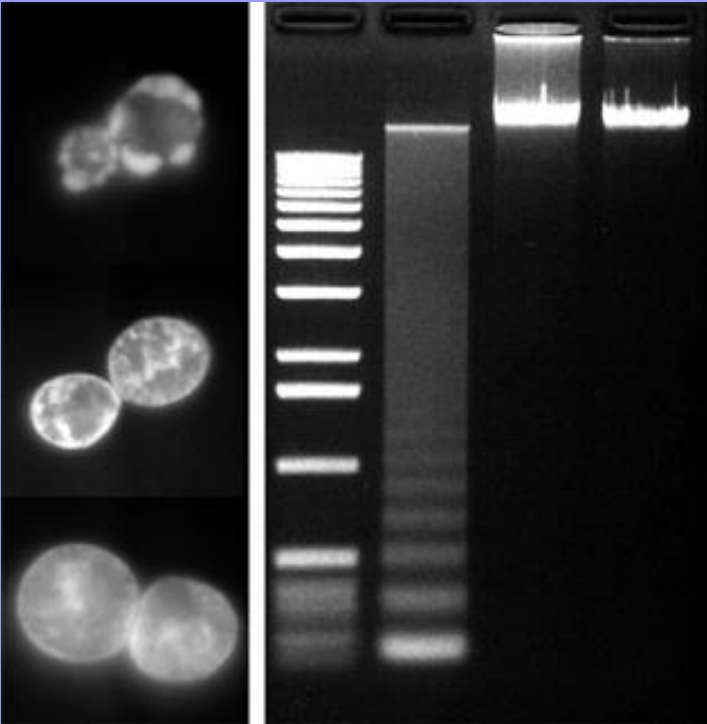


Annexin assay

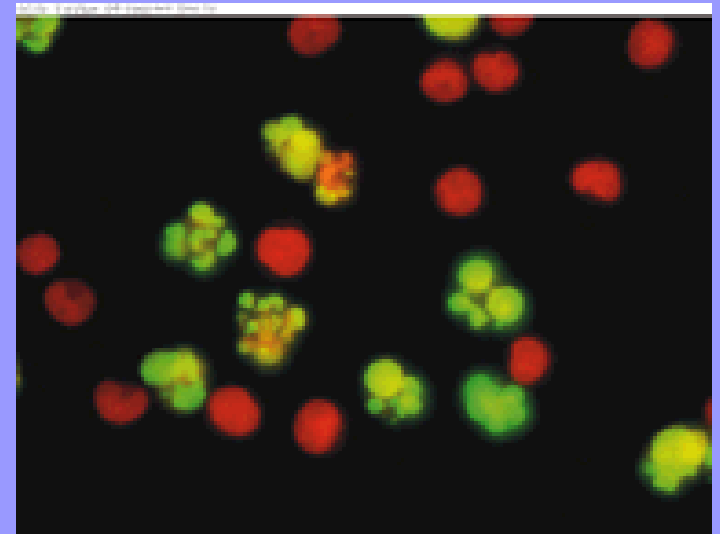


B) Testy založeny na stanovení biochemických a molekulárně biologických parametrů

- Fragmentace DNA (elektroforeticky = tzv. apop. žebříček DNA, in situ = TUNEL assay, Comet assay)
- Aktivita specifických proteáz = kaspázy, detekce fragmentace substrátů kaspás
- Hladiny pro- a anti-apoptických proteinů rodiny Bcl-2
- Kompaktnost mitochondrií (změny v polarizaci m. membrány, vylití cytochromu c)



TUNEL assay, red - nuclei, green apoptosis



Comet assay

Eosin (Trypan blue)
stain of viability

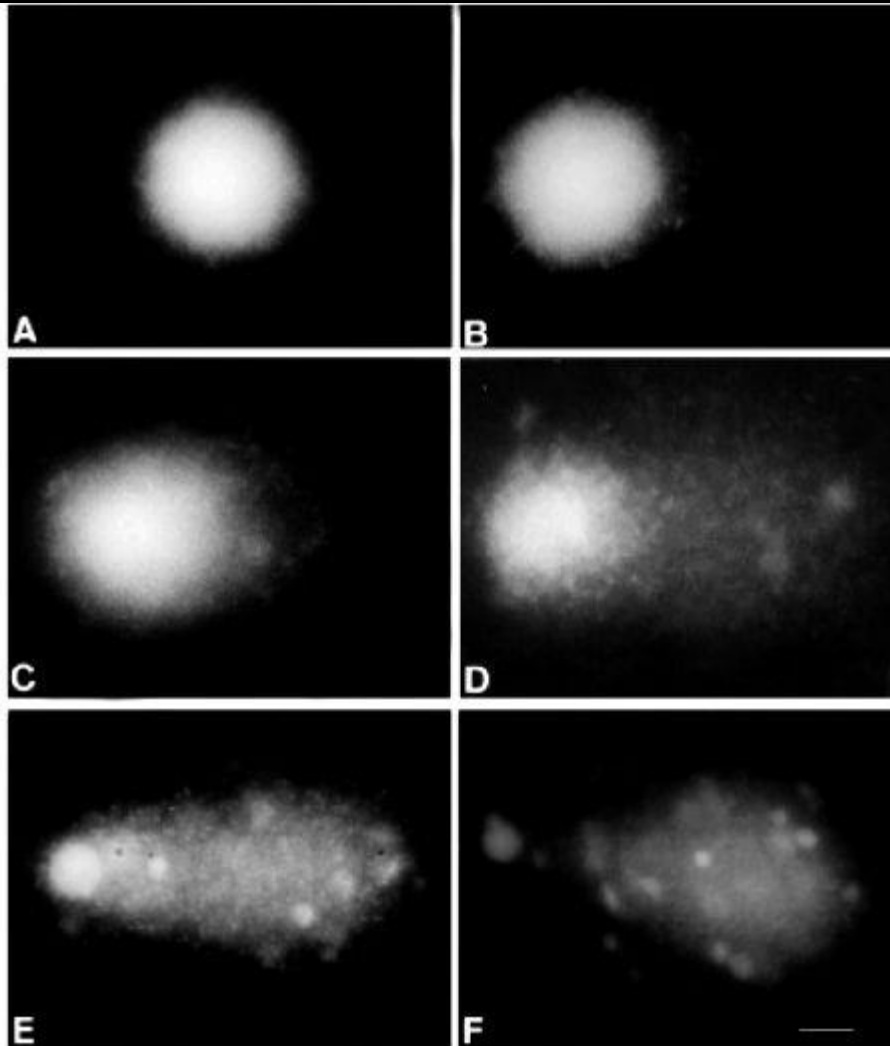


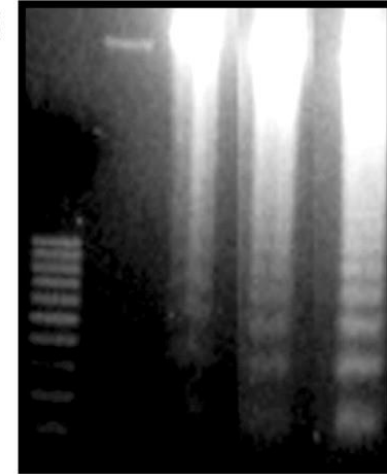
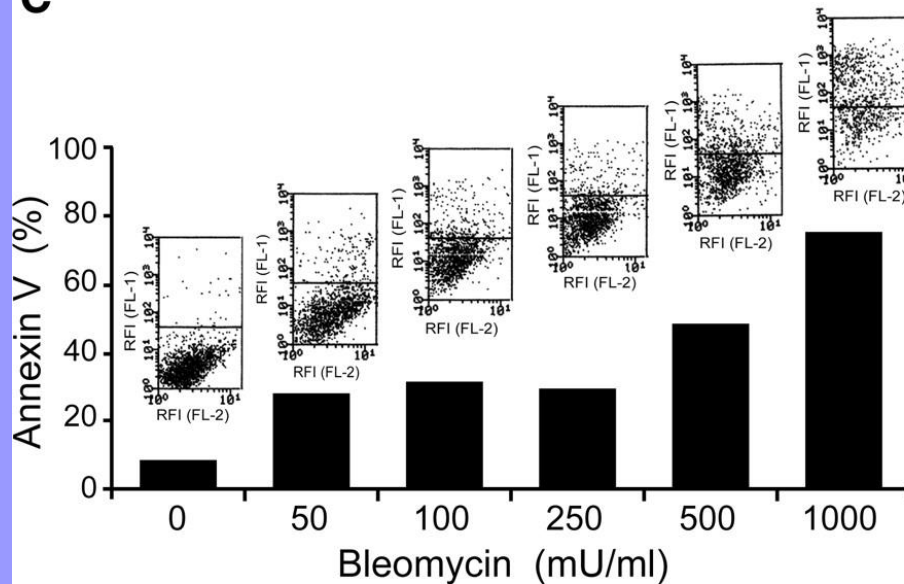
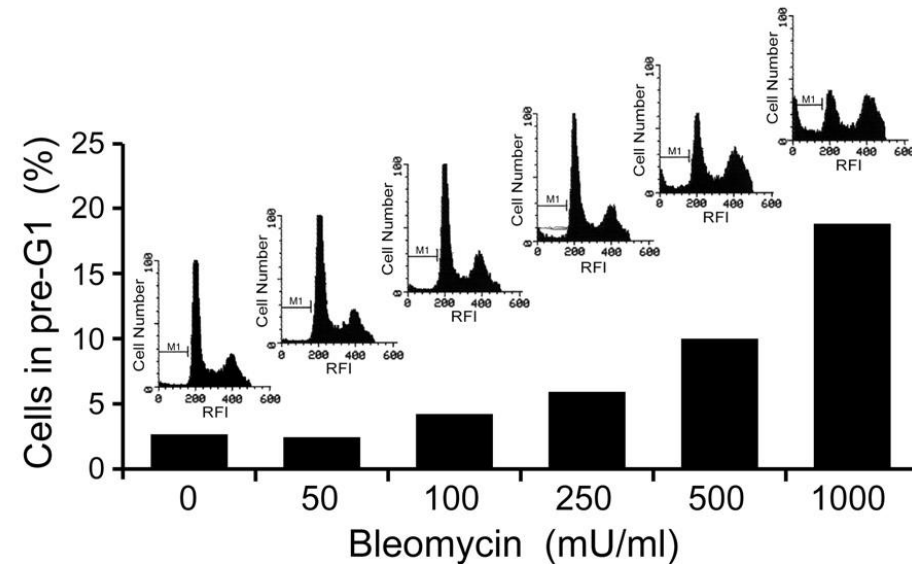
Figure 1 - Photomicrographs showing the classification of *Ctenomys torquatus* blood cells in the comet assay. A, Class 0, undamaged; B, class 1; C, class 2; D, class 3; E, class 4, maximum damage; F, apoptotic cell. Bar = 10 μ m.



A

BLEO mU/ml	0	5	50	100	200	500	1000
% viability ¹	86 ±36	76 ±5	73 ±4.8	63 ±2.5	51 ±9	43 ±3	27 ±3.5
[³ H] thymidine ²	3868 ±479	2675 ±215	6998 ±682	12711 ±820	42624 ±2010	63226 ±11300	74276 ±10900

1 - % viable cells out of total cells

2 - [³H] thymidine release assay (DPM)**B**M 0 50 250 500
BLEO (mU/ml)**C****D**

Diferenciace buněk

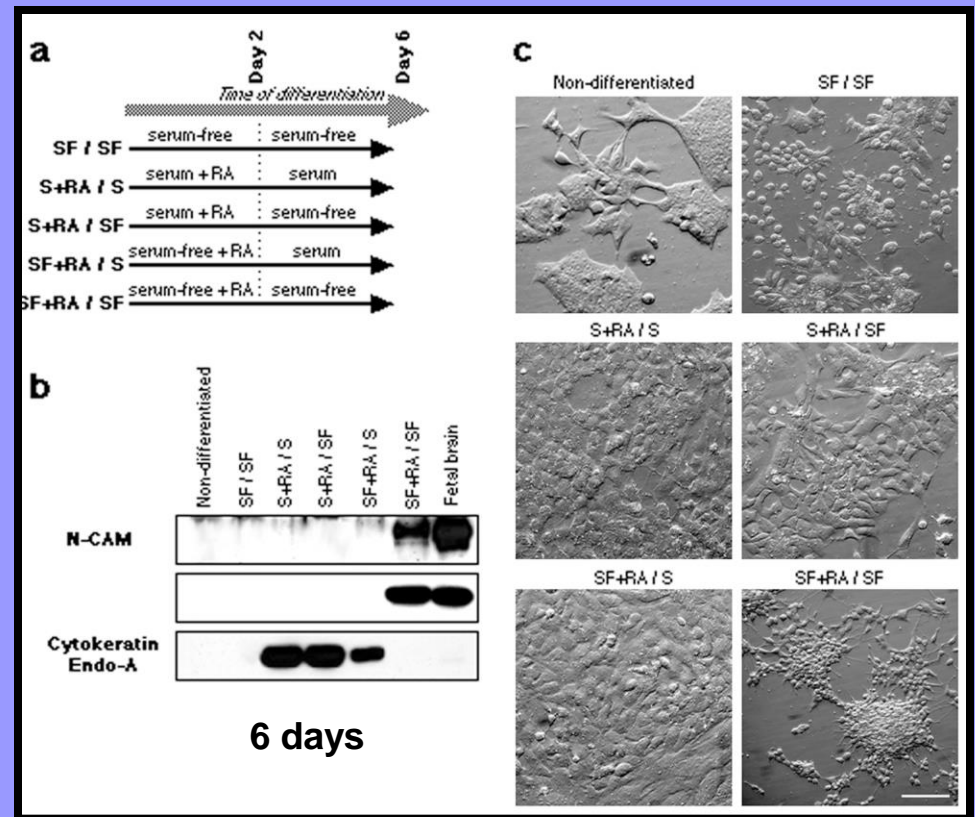
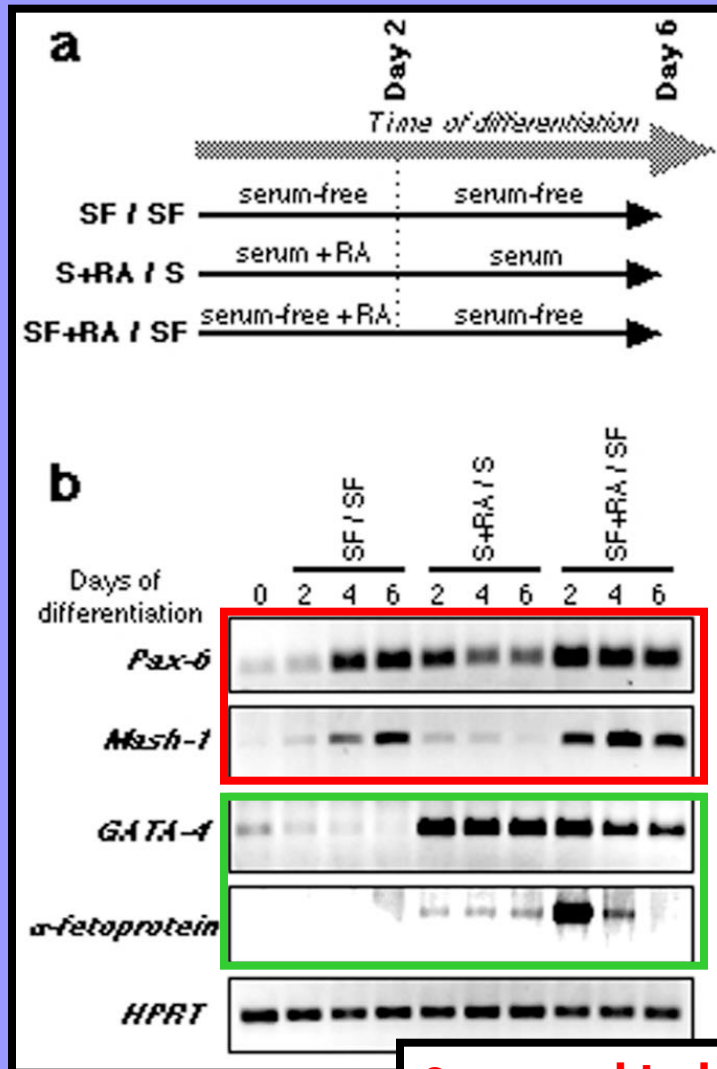
V průběhu kultivace (pasážování) buněk se volbou vhodných podmínek snažíme, aby si buňky dlouhodobě zachovaly stabilní genotyp i fenotyp. Přitom u nádorových linií je udržení stabilního genotypu už z principu problematické. Změny kultivačních podmínek mohou vést k nestabilitě již tak obecně nestabilního genotypu u nádorových linií, ale vedou zejména ke změně fenotypu => diferenciaci, a to jak cílené tak náhodné.

DIFERENCIACE JE PRAKTICKY VŽDY SPOJENA I SE ZMĚNOU PROLIFERAČNÍCH PARAMETRŮ, PŘÍPADNĚ I S APOPTÓZOU.

Parametry analýzy diferenciace:

- změny v morfologii buněk
- změny v expresi genů: detekce specifických mRNA a specifických proteinů
(v časných stádiích zejména transkripční faktory, později zejména strukturní proteiny a enzymy)
- funkční testy (fagocyty – fagocytóza; nervy – přenos signálu, depolarizace membrány, produkce mediátorů; svaly – odpověď na stimulus, kontrakce; epitely - produkce mucinů;.....; **transplantace** a sledování jak se transplantované buňky zapojí do funkce dané tkáně)

Účinek séra na RA indukovanou neurální diferenciací EC buněk

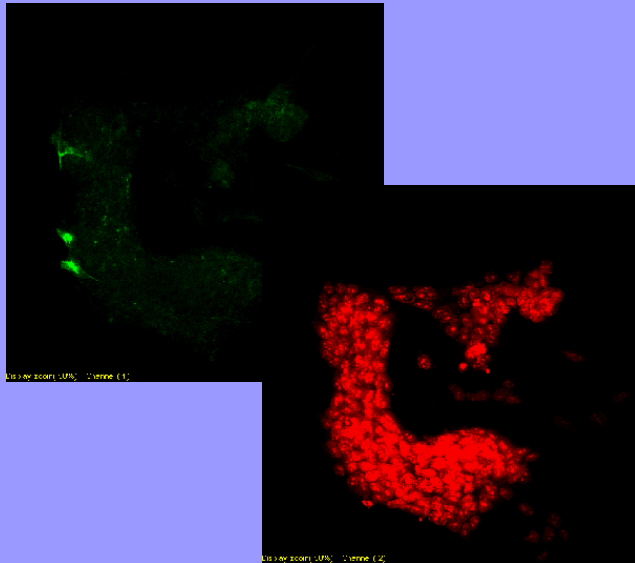


RT-PCR analýza exprese liniově specifických genů

- neuroektoderm
- entoderm

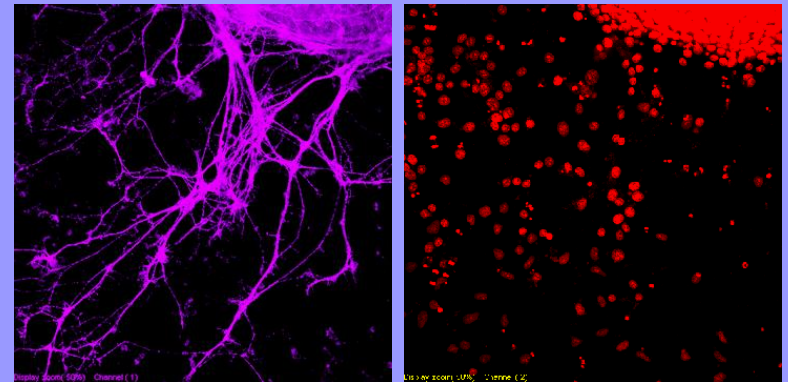
Účinek séra na RA indukovanou neurální diferenciaci EC buněk

Nediferencované buňky EC

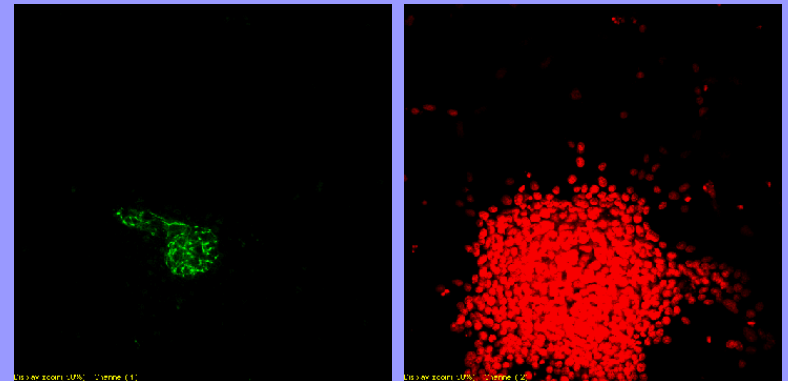
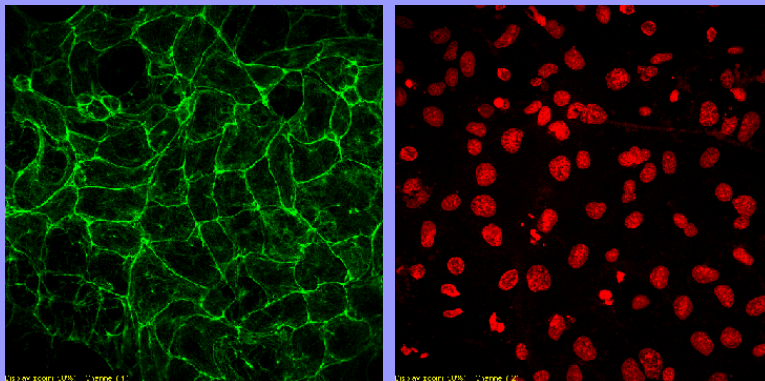


- ◆ **buněčná jádra**
- ◆ **cytokeratin EndoA pozitivní buňky – entoderm**
- ◆ **N-CAM pozitivní buňky - neurony**

Diferencované buňky EC monovrstva + RA - sérum



Diferencované buňky EC monovrstva + RA + sérum



Zdroje buněk v TC

A) Tkáňová banka nebo darem

např. American Tissue Culture Colection (www.atcc.com)

B) Příprava kmenů (populace) nebo klonů (z jednotlivé buňky) z nádorů

Izolace nádoru, jeho enzymatická disociace na buněčnou suspenzi, kultivace buněk ve vhodných podmínkách, selekce zajímavých kmenů, klonů a jejich charakterizace v průběhu kultivace -> linie musí vykazovat dostatečnou stabilitu v průběhu kultivace, aby byla zachována reprodukovatelnost výsledků.

Popis nově získané linie by měl obsahovat co nejvíce její charakteristik.

Původ (typ nádoru, věk a pohlaví dárce, způsob získání, počet pasáží od jejího ustanovení, charakterizace fenotypu i genotypu,..)

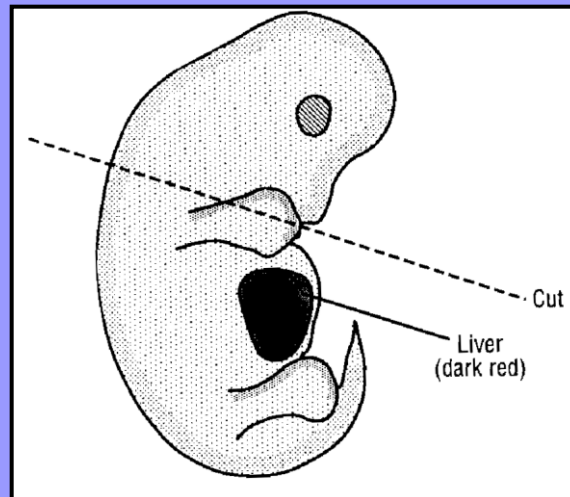
C) Příprava primokultur z živočišných tkání

Příprava myších embryonálních fibroblastů

MEF – mouse embryonic fibroblast

PEF – primordial embryonic fibroblast

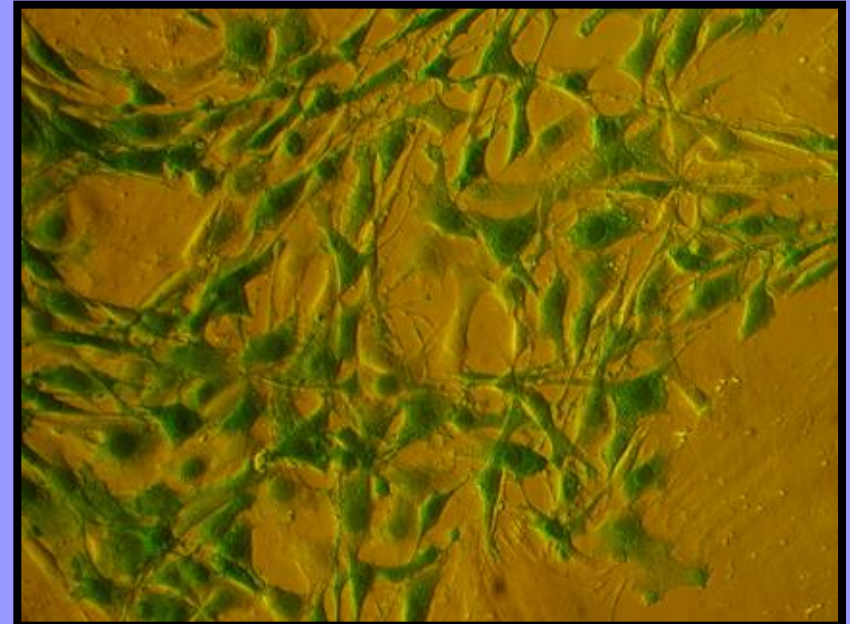
- Připravují se nejčastěji z 13.5 denních embryí (11-13.5 dpc.)
- Gravidní samice se usmrtí a vypreparuje se děloha s embryi
- Z embryí se odstraní hlava a vnitřní orgány
- Zbytek embrya se enzymaticky a mechanicky rozruší a po odstranění kompaktních zbytků, se suspenze vyseje na kultivační misku
- Rozrostlé buňky se zamrazí (pasáž 0) a nebo se dále kultivují (~6-15 pasáží ~ 24-60 dnů, Hayflick limit)



Příprava stromálních buněk kostní dřeně BMSC – bone marrow stromal cells

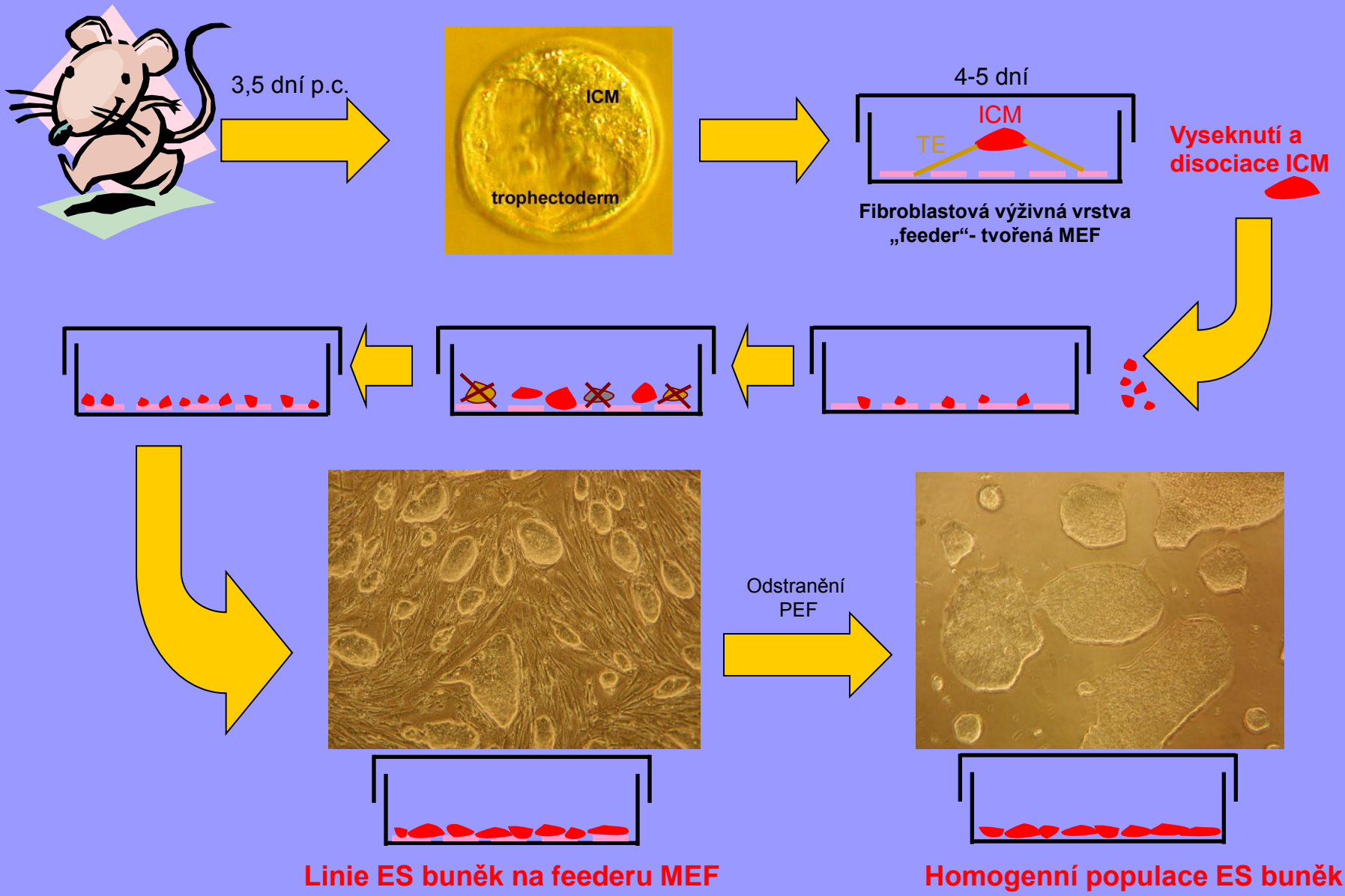
- Vypreparujeme stehenní kost, odstříhneme hlavice a propláchneme (např. injekční stříkačkou) vhodným kultivačním médiem do kutivační misky (lze i kost navrtat a odsát (např. injekční stříkačkou) = možné autotransplantace).
- Po 24 hodinách kultivace odstraníme médium se zbylými krevními elementy opláchneme a přidáme nové médium.
- Stromální buňky postupně vytváří nepravidelné kolonie fibroblastům podobných buněk
- Standardně je lze kultivovat minimálně 2-3 týdny

Pozn. potkaní a lidské rostou lépe jak myší



Příprava myších ES buněk

ES – embryonic stem, embryonální kmenové



Linie ES buněk na feederu MEF

Homogenní populace ES buněk

Dlouhodobé uchování buněčných linií v TC

Permanentní kultivace

- selekce buněk s odlišnými vlastnostmi než měly ty původní
- časově a finančně náročné

- Empiricky je za stabilní považováno 10 – 30 pasáží v závislosti na buněčné linii a i na kultivačních podmínkách.
- Nádorové linie jsou obecně méně stabilní (poškozený genotyp) než primokultury (zde ale nevýhoda Hayflickova limitu).
- Výjimkou se v současné době zdají být myší ES buňky, u kterých jsou známy kultivační podmínky, kdy dlouhodobě (> 100 pasáží) v zásadě nemění své vlastnosti.

Zamražování buněk

Obecně v kultivačním médiu

- a) se zvýšeným obsahem séra (20-100%)
- b) se sérem (10-20-50%) s přidavkem DMSO (5-10%)
- c) vzácně se sérem (10-20-50%) a přidavkem glycerolu (10%)

Buňky je třeba zchlazovat postupně na $\sim -80^{\circ}\text{C}$, poté se přenesou do ultra-hlubokomrazícího boxu ($\sim -185^{\circ}\text{C}$) nebo do tekutého N_2 (-196°C) k trvalému uchování. Je vhodné pro zamražení používat vysoké koncentrace buněk $\sim >10^7$ buněk na ml média.

Postupné zchlazování

- V lázni s isopropylalkoholem (R.T.), přenos přímo do hlubokomrazícího boxu ($\sim -80^{\circ}\text{C}$), teplota klesá rychlostí $\sim 1^{\circ}\text{C}$ za 1 minutu
- Zanořováním do par N_2
- V termoizolačním materiálu (např. pěnový polystyren) přímo do hlubokomrazícího boxu, po 3 hodinách k trvalému uchování
- V termoizolačním materiálu na $\sim 2-4\text{h}$ do mrazícího boxu (-20°C), pak na 3 hodiny do hlubokomrazícího boxu, následně k trvalému uchování

Rozmražování buněk

Buňky je třeba rychle převést z hlubokého zamražení (~ 190°C) na kultivační teplotu, opláchnout zamrazovací médium (centrifugací) a vyset k další kultivaci. Druhý den po vysetí je vhodné vyměnit kultivační médium za nové a odstranit tak zbytky buněk, které zamražení/rozmražení nepřežily.

Kryo-zkumavky



Dewarovy nádoby

Přeprava buněk

- V zamraženém stavu v tekutém N₂ (v termosce, dálková, lokální přeprava)
- V zamraženém stavu v isolačním boxu se suchým ledem (CO₂) (na krátké i velké vzdálenosti, zásilkové společnosti mívají i službu s doplňováním suchého ledu)
- Živé v kultuře, v kultivační nádobce s nadbytkem média (v závislosti na buněčném typu 1 – 3 dny), každopádně i zde je se třeba vyhnout teplotním výkyvům buňky nesmí zmrznou ani se přehřát => 0-40°C
- Tkáně (s výjimkou krve) se přepravují podchlazené (ne zmrzlé) ve výživných médiích, často s kryo-protektivy

Synchronizace buněk v buněčném cyklu

Fyzikální metody

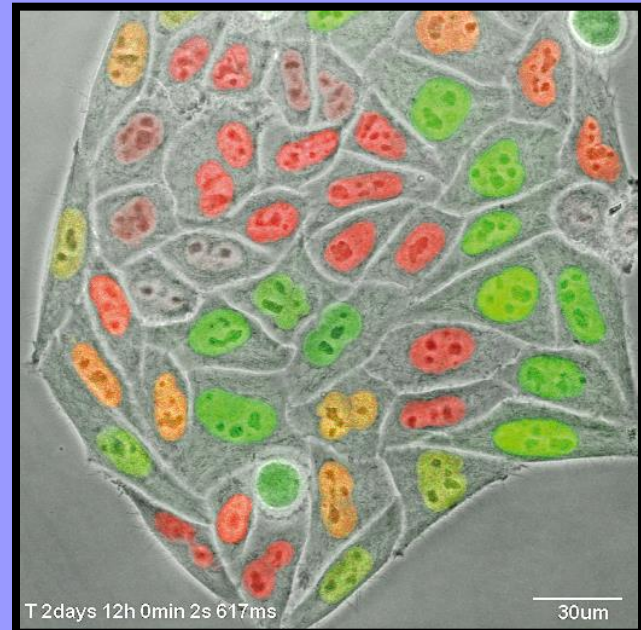
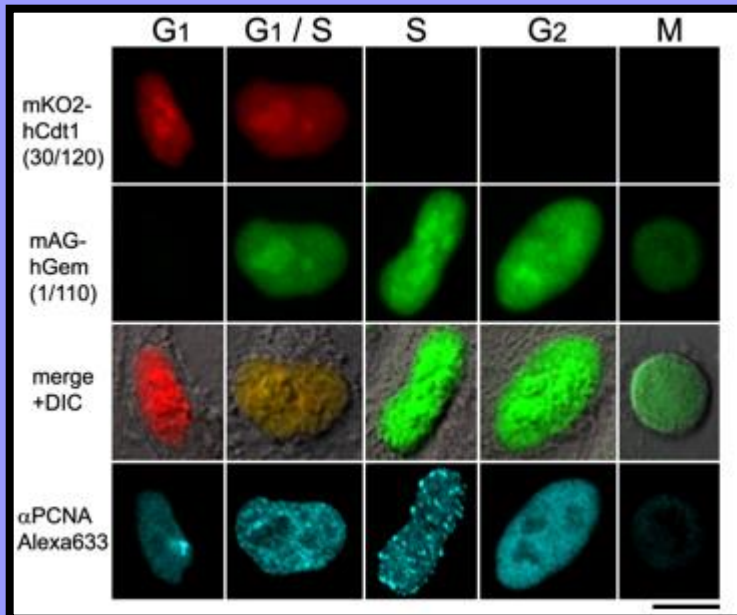
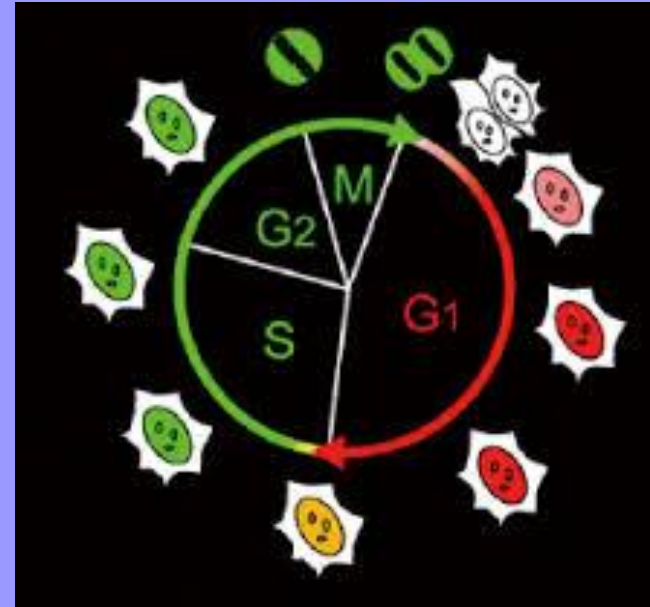
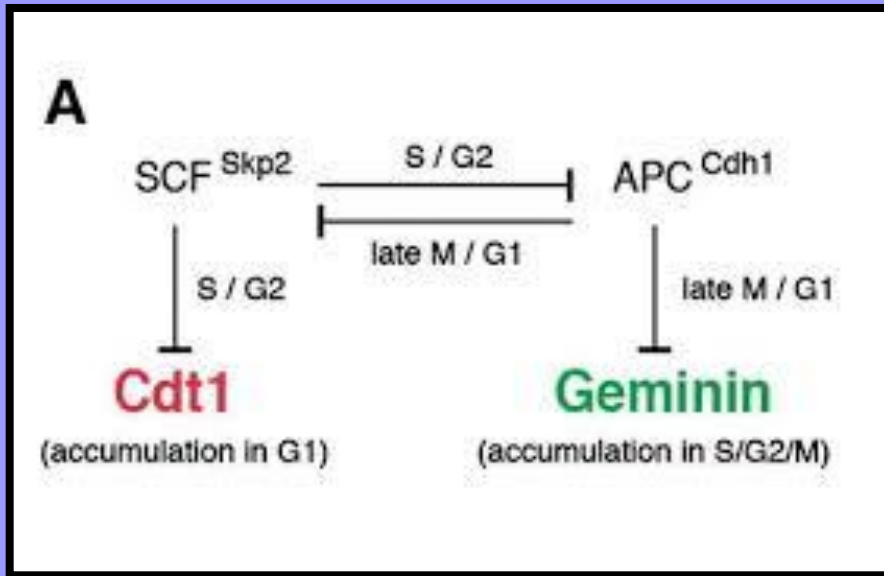
- Setřásání mitotických buněk u adherentních kultur
- Centrifugace (G0/G1 buňky jsou nejlehčí)
 - a) v gradientu
 - b) elutrace (centrifugace s protiproudem média)
- FACS, sortování pomocí flow-cytometru
- Membránové vymývání (zdokonalená metoda setřásání)
- Kontaktní inhibice

Chemické metody

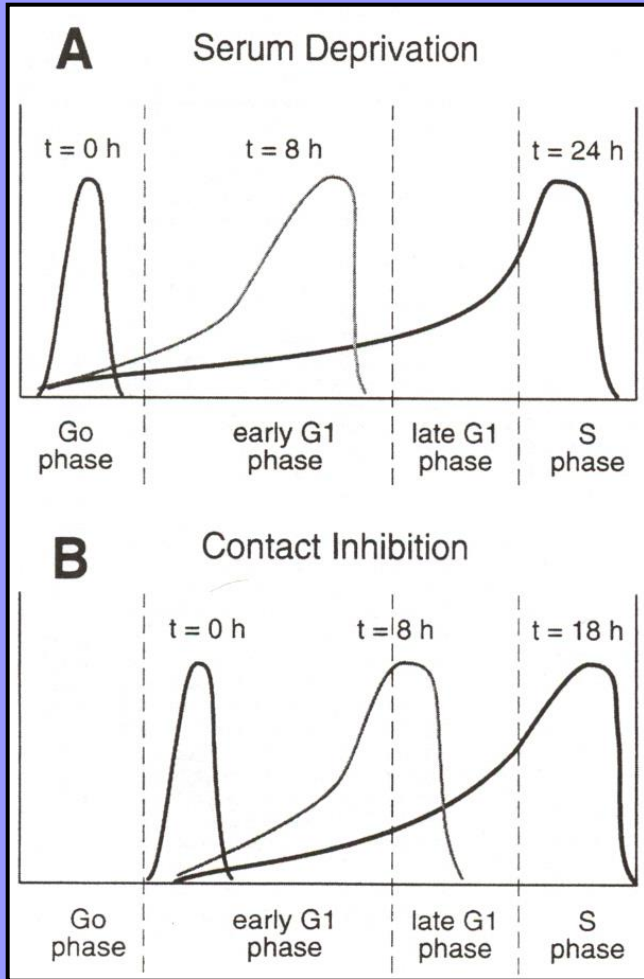
- Deprivace odstraněním růstových faktorů (sérem)
- Deprivace odstraněním iso-leucinu z média
- Deprivace odstraněním Ca^{2+}
- Příklad hydroxyurei, inhibice RNA syntézy -> blok DNA syntézy
- Dvojitý thymidinový blok
- Mitotické jedy, inhibují reorganizaci mikrotubulů / dělicího vřeténka (kolchicin, kolcemid, nocodazol, ...) – zejména zviditelnění chromozomů, karyotypyzace

Fucci system

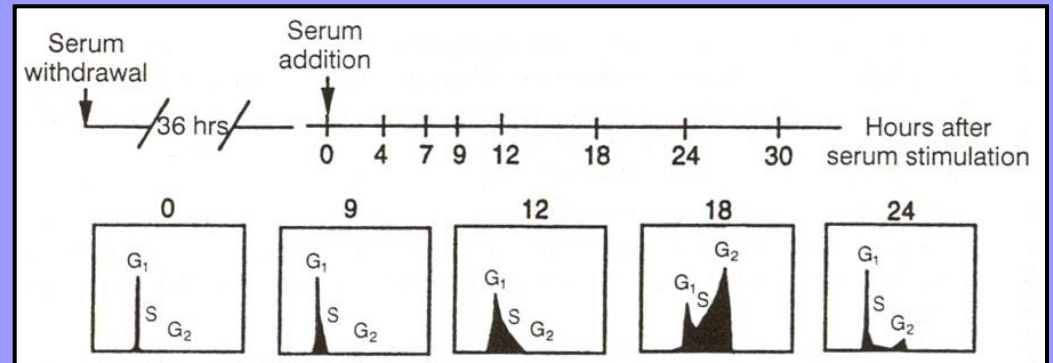
(fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator; Sakue-Sawano et al., 2008)



Srovnání synchronizace v buněčném cyklu deprivací sérem (A) a kontaktní inhibicí (B)

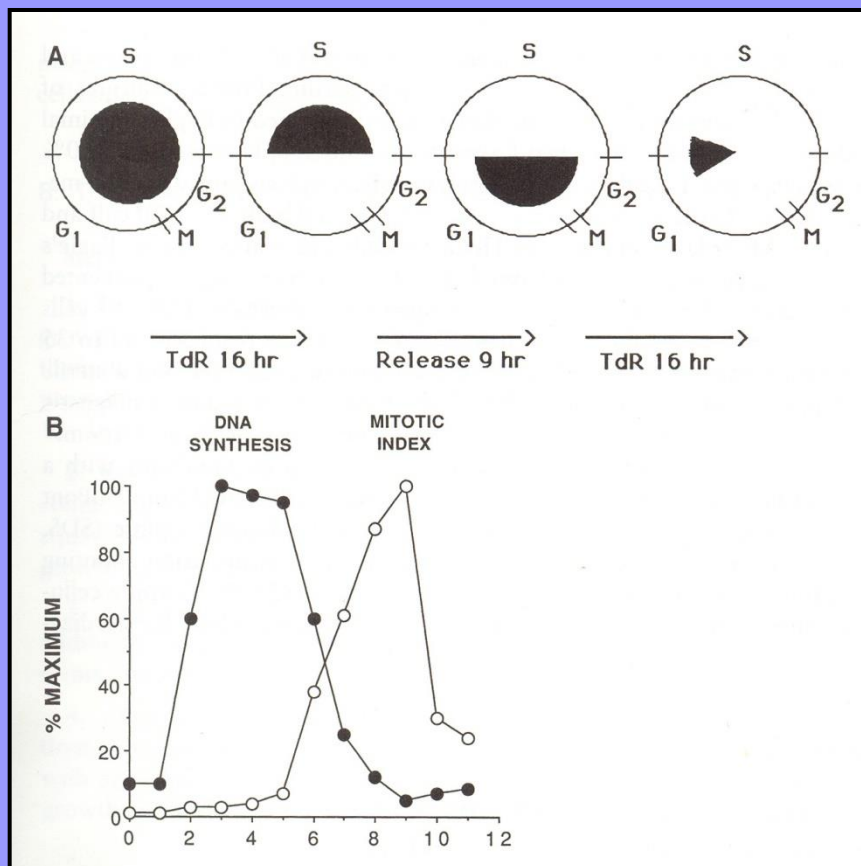


Příklad rozjezdu buněk synchronizovaných deprivací sérem myšičí fibroblasty linie NIH/3T3



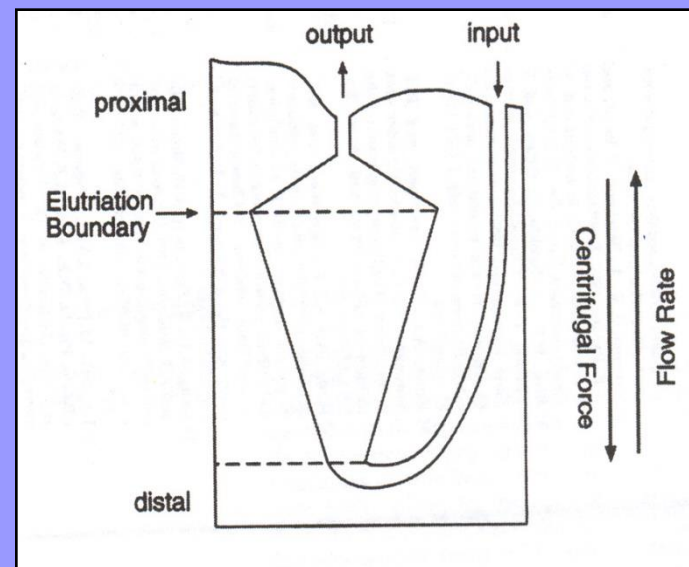
Princip dvojitého bloku přidavkem nadbytku thymidinu

- nadbytek thymidinu blokuje průchod S-fází buněčného cyklu, blokuje DNA syntézu



Elutrační kyveta / hylzna

- separace buněk pomocí protiproudého gradientu na speciální centrifuze - elutrátoru



Současná kultivace více buněčných typů

- Produkce růstových faktorů s parakrinním účinkem
- Vhodné mechanické vlastnosti podkladu atd.

V případě přímého kontaktu odlišení buněk na základě jejich vlastností

- Exprese specifických proteinových markerů na povrchu buněk
- Selektce díky expresi nějakého proteinu (enzymu, fluoreskujících proteinů,..)
- Inhibice mitotické aktivity jednoho typu buněk (gama zářením, Mytomycinem C,..)

Pokud je třeba maximálně minimalizovat riziko vzájemné kontaminace

- Buňky v kultuře jsou odděleny polopropustnými membránami

Imortalizace buněk

Proč?

- převedení primokultur v permanentní linie
- zjednodušení kultivačních podmínek

a) Spontánně – pomalé, často málo účinné

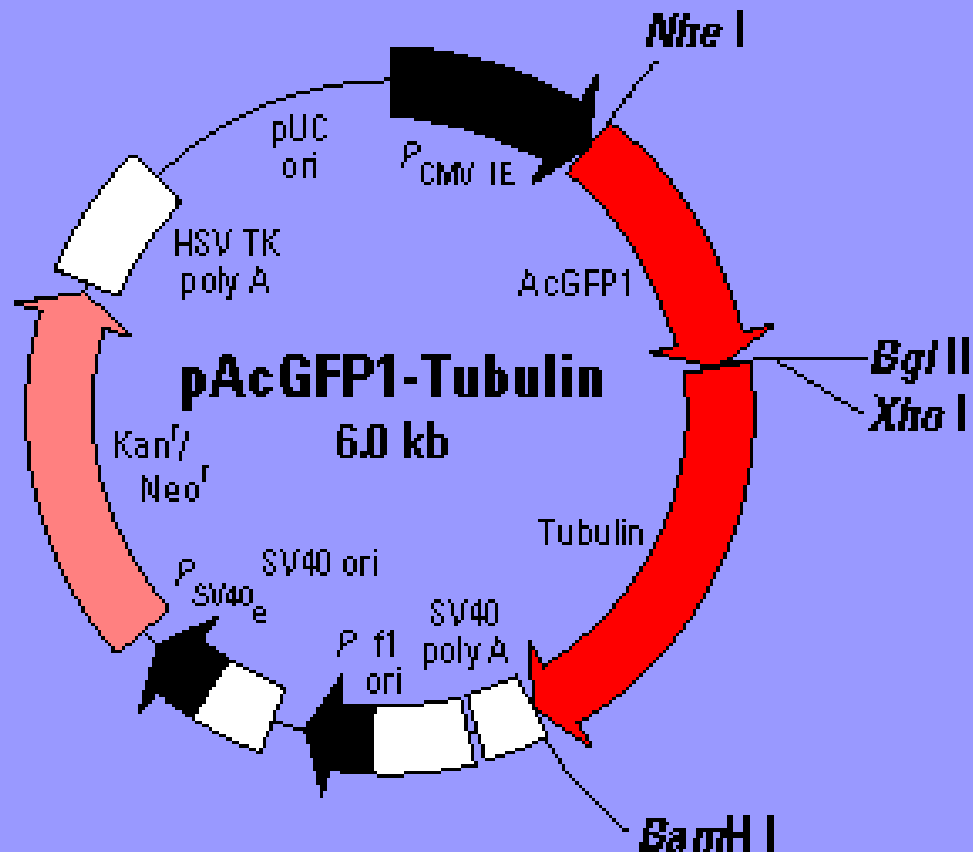
b) Cíleně

- fyzikálními faktory: Gama záření, Rentgenové záření (záření X), teplota
- chemickými faktory: NiCl, NiSO₄, Dimethylsulphate, N-methyl-N-nitrosouera (MNU), benzo[a]pyrene diol epoxide, 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)
- biologickými faktory: **viry** - virus Epstein Barrové, virus myší leukémie, virus Rousova sarkomu, SV40
vektory (plasmidy / viry) exprimujícími transformující protein, např. antigen SV40 large T nebo adenovirus E1A,..

Cílené genetické manipulace

Změny genetické informace, vložením, poškozením nebo vypnutím genu / genů

- Vektory plasmidové a virové
- Chemicky nebo fyzikálně – viz. imortalizace



Vnesení vektoru do buněk

- a) Infekcí – viry
- b) Chemicky
 - lipofekce: obalení vektoru s lipidy a fúze komplexu s cytoplasmatickou membránou
 - Ca^{2+} precipitace: vysrážení vektoru na povrchu buněk v komplexu s Ca^{2+} a jeho pohlcení buňkou endocytózou
 - transfekce pomocí dextranu: komplex vektor / dextran spojený diethylaminoethylem je endocytován do buňky
 - transferofekce: vektor je navázán na transferin a přes transferinový receptor endocytován do buňky
- c) Mikroinjikace
- d) Elektroporace - narušení buněčné membrány elektrickým výbojem a difúze vektoru do buňky
- e) Nucleofekce - elektroporace v kombinaci s chemií, přenos vektoru do jádra
- f) Biolisticky – vektor navázaný na partikuli (zlato, wolfram) je vstřelen do tkáně, buněk

Selekce buněčných klonů

Adherentní buňky pod selekčním antibiotikem, při dostatečné nízké účinnosti transfekce nebo jejich konfluenci tvoří samostatné kolonie, které lze mechanicky, případně za pomoci proteáz (trypsin, kolagenáza) oddělit

Suspensní buňky pod selekčním antibiotikem je třeba rozklonovat mezním ředěním (někdy potřeba i u adherentních), nebo růst v polotekutém / viskózním médiu (agar apod.)

Nejběžnější selekční antibiotika pro savčí buňky

G418 / Neomycin, Hygromycin B, Puromycin

Dodatek – TKÁNĚ a ORGÁNY

Tkáně umíme kultivovat / připravovat jen velice omezeně, většinou jde pouze o uchování po určitou dobu, podobně jako orgány.

U orgánů je již aktuální otázka přívodu živin, kyslíku a odvodu metabolitů a CO₂. Orgány je tedy třeba mít metabolicky utlumeny (podchlazením) a nebo napojeny na oběh s živinami simulující krevní zásobení.

V současné době je zvládnutá problematika krve (lze zamrazit), částečně pak epidermis / kůže a jaterní tkáně. Intenzivně se studují možnosti využití buněk pankretu (Langerhansových ostrůvků) z prasat. Velkým příslibem pro transplantace jsou také buňky a tkáně připravené z kmenových buněk.

Epidermis – primokultury prasečích / lidských keratinocytů pěstované na syntetických nosičích se používají k regeneraci poškození epidermis po popáleninách apod.

Částečné úspěchy jsou při přípravě umělých jater, kdy separované hepatocyty jsou vysety do reaktoru na rozvodné potrubí z polopropustných membrán. Celý takový bioreaktor pak připomíná skutečná játra s krevním oběhem a odvodem žluči. Hepatocyty se však zatím nedaří dostatečně efektivně zamrazovat k dlouhodobému uskladnění a tak využití podle potřeby.

Doporučená literatura:

Lesko, J. a kol.: Práce s tkanivovými kulturami, Bratislava, Vydavateľstvo slovenskej akadémie ved 1975, s. 212.

Alberts, B. a kol.: Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem, Espero Publishing 1998, 630 s.

Alberts, B. a kol.: Molecular biology of the cell. New York & London, Garland Publishing, Inc. 1994, 1294 s.

Spector, D. L. a kol.: Cells. A laboratory manual. Volumes 1, 2, 3. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998, 3 197 s.

Cellis, J. E. a kol.: Cell Biology. A laboratory handbook. San Diego, London, Academic Press Inc. 1994, 1714 s.

Sambrook, J. a kol.: Molecular Cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, 1832 s.

Ausubel, F. a kol.: Short Protocols in Molecular Biology. USA, Published by John Wiley & Sons Inc. 1995, 728 s.