

# Tkáňové kultury

E-mail: [jipa@sci.muni.cz](mailto: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, vibrace,...

- dodržet podmínky na které jsou buňky zvyklé/přizpůsobené

## TEPLOTA

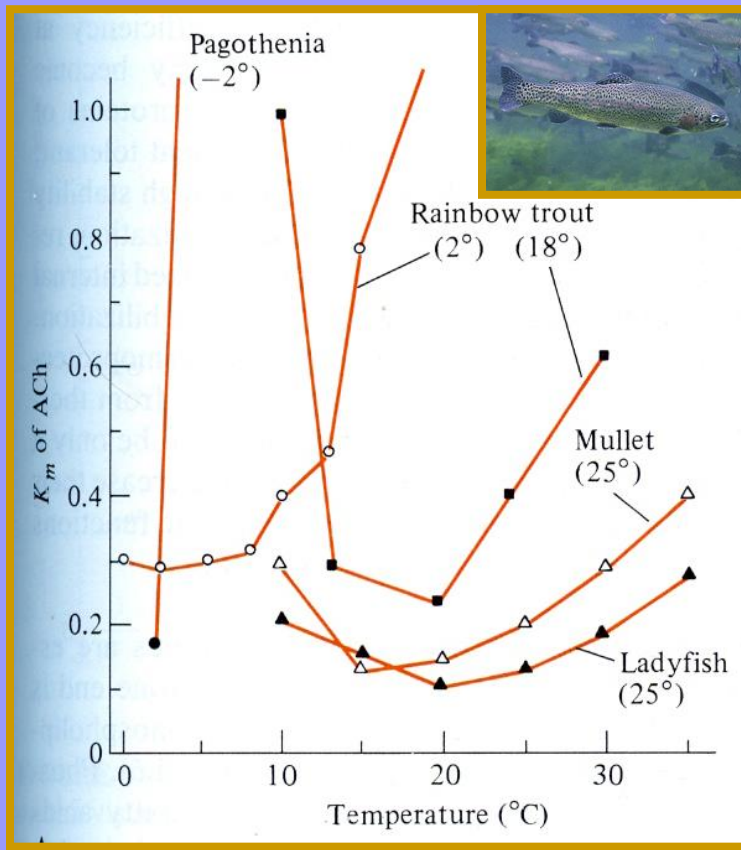
Buňky se kultivují při optimální teplotě pro organismus, z kterého byly izolovány. Pro buněčné linie odvozené od člověka a běžných laboratorních zvířat (myš, krysa, makak, pes,..) je to většinou 37°C. Pro buněčné linie odvozené od poikilotermních živočichů (ryby, hmyz, hád'átko - *Caenorhabditis*) od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



Elops

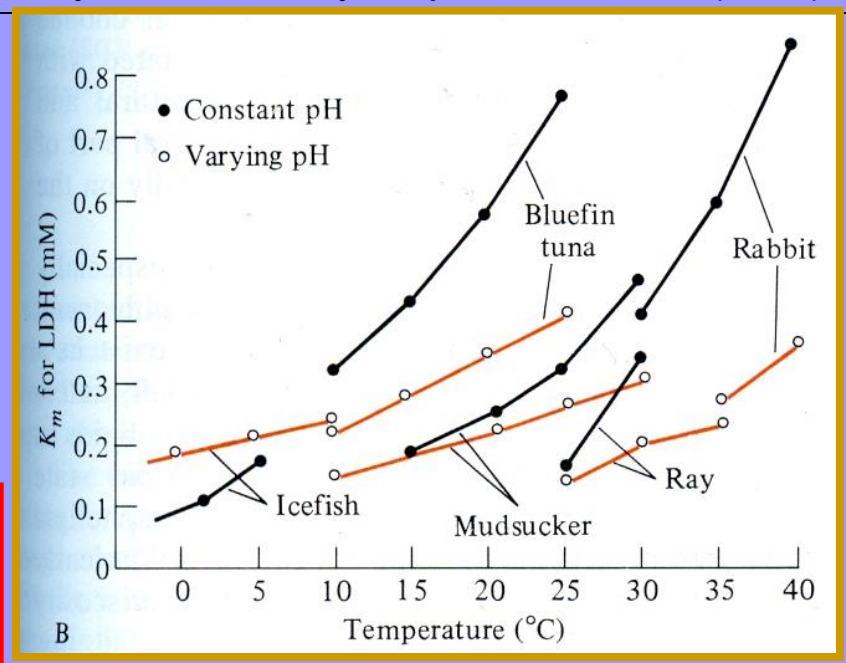
## Teplota modifikuje biochemické děje

- 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 isoform pro stejnou reakci pro Snadnější regulaci homeostáze za různých teplot!

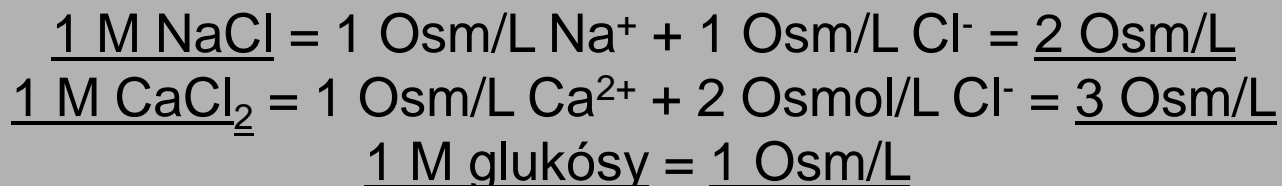
Na **CHEMICKÉ** faktory lze nahlížet jako na média (jejich komponenty) v kterých buňky rostou a plyny, které tato média obklopují případně jsou v nich rozpuštěny.

## 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>**.

**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- $\beta$ -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
<b>Amino Acids</b>			
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 <sub>2</sub> 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
<b>Vitamins</b>			
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
<b>Inorganic Salts</b>			
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	147	264	1.8
Ferrous Nitrate (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O)	404	0.1	0.000248
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	246	200	0.813
Potassium Chloride (KCl)	76	400	5.33
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84	3700	44.05
Sodium Chloride (NaCl)	58	6400	110.34
Sodium Phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	164	141	0.816
<b>Other Components</b>			
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  $\text{CO}_2$

V průběhu kultivace je udržováno:

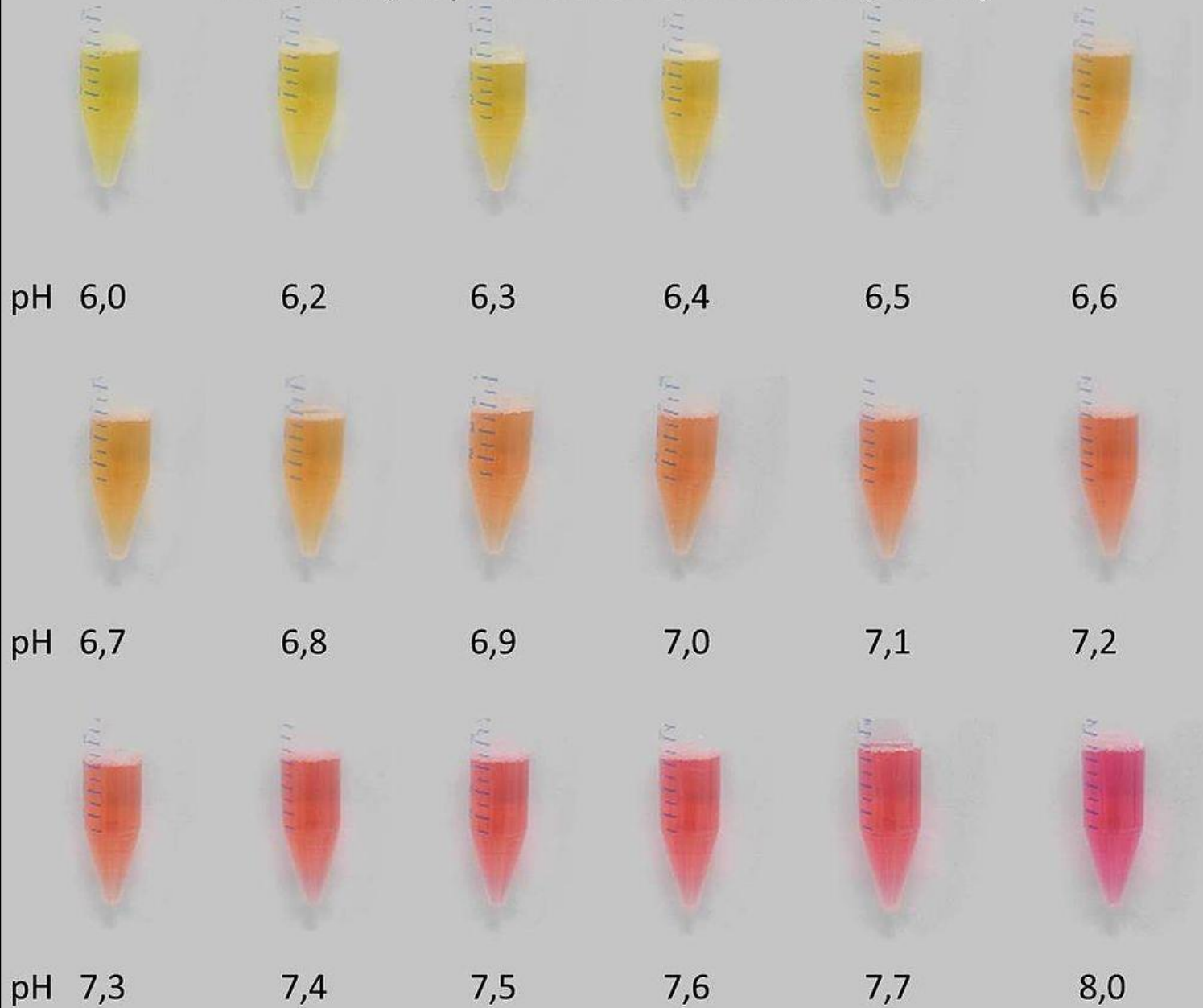
- 1) Přítomnými ionty, zejména fosfátovými (z fosforečnanů)
- 2) Proteiny s pufracími schopnostmi
- 3) **Systemem  $\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{CO}_2$**
- 4) Alternativně silně pufrujícími látkami jako je HEPES, BES, TES

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



pH

Phenol red, 40  $\mu$ M in cell culture medium (DMEM)



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



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

Kultivace : **otevřená** – s výměnou plynů (zejména přísun  $\text{CO}_2$  z vnějšku)

**uzavřená** – bez výměny plynů (používá se ~ ½ množství  $\text{NaHCO}_3$ )

- Při otevřeném systému kultivace se nejčastěji udržuje atmosféra s navýšeným obsahem  **$\text{CO}_2$** , standardně 5%  $\text{CO}_2$  (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**
- **Kolagenu** (transparentní, buňky lze barvit některými histologickými barvivy)
- **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 nebo isopropylalkohol,....)
- 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  $\mu\text{m}$ ), roztoky hlavně média a séra běžně přes filtry s póry 0,2  $\mu\text{m}$ )

**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 hydrofobním koncem, který funguje jako kationický detergent. Vazba na lipid A bakteriálních LPS, vytváří póry do cytoplazmatické membrány	
Amphotericin B (makrolidové)	kvasinky, plísňe	vazba na steroly membrány hub, vytváří kanály do buněčné membrány	
Nystatin	kvasinky, plísňe	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

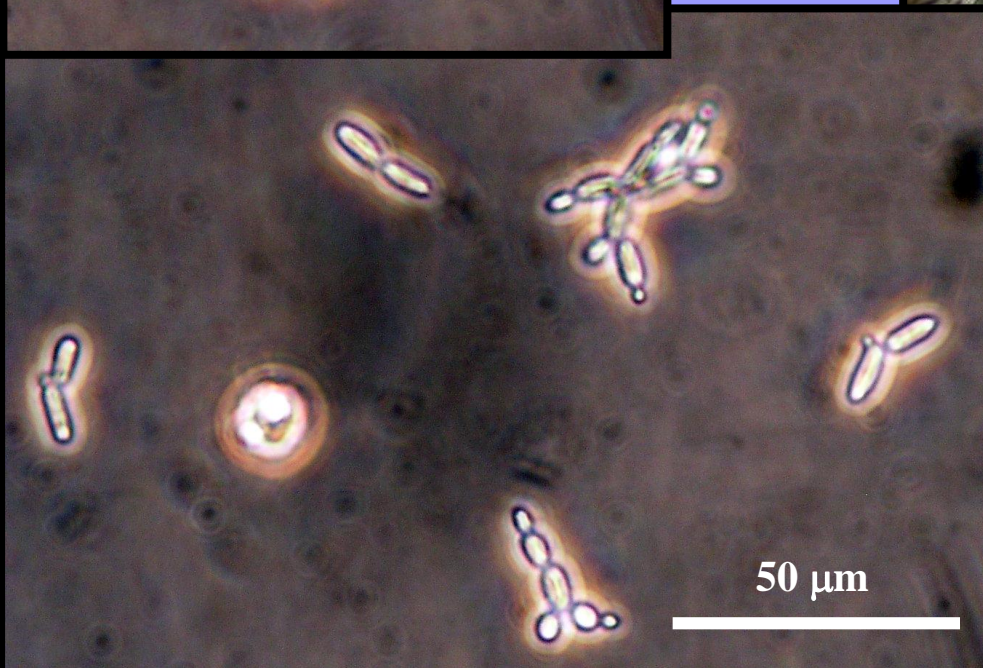
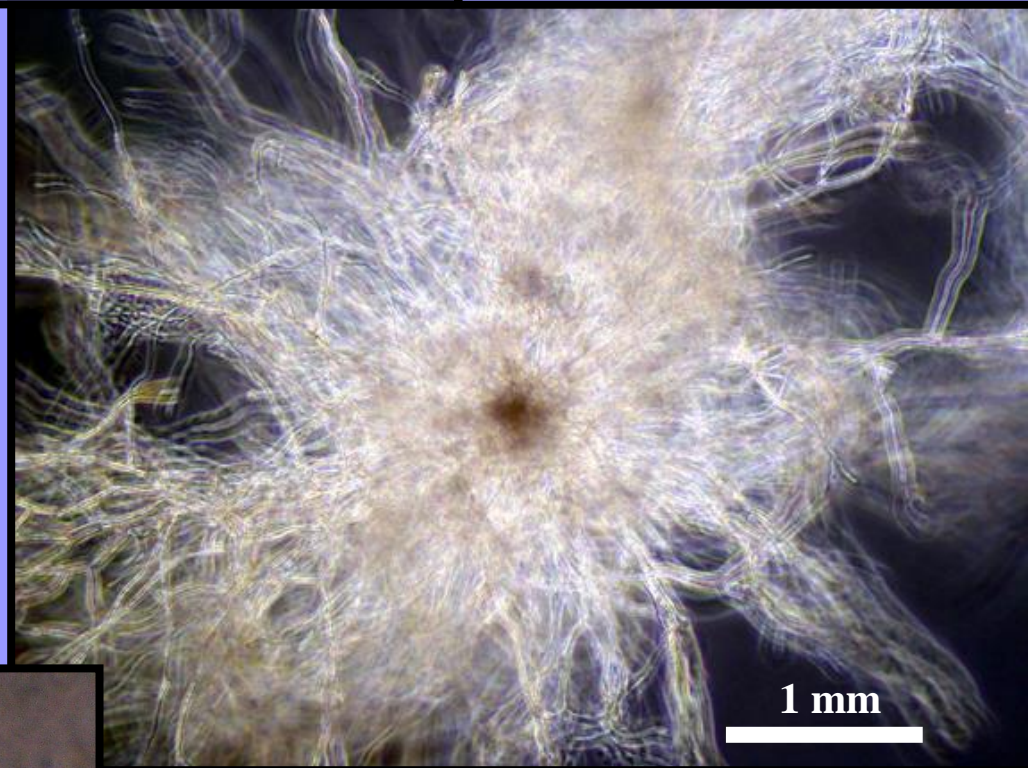
- **Likvidace zasažené kultury**
- **Kombinací antibiotik**
- **Kultivací buněk v kompatibilním organismu**  
(např. v břišní dutině = ascites)



?



# 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

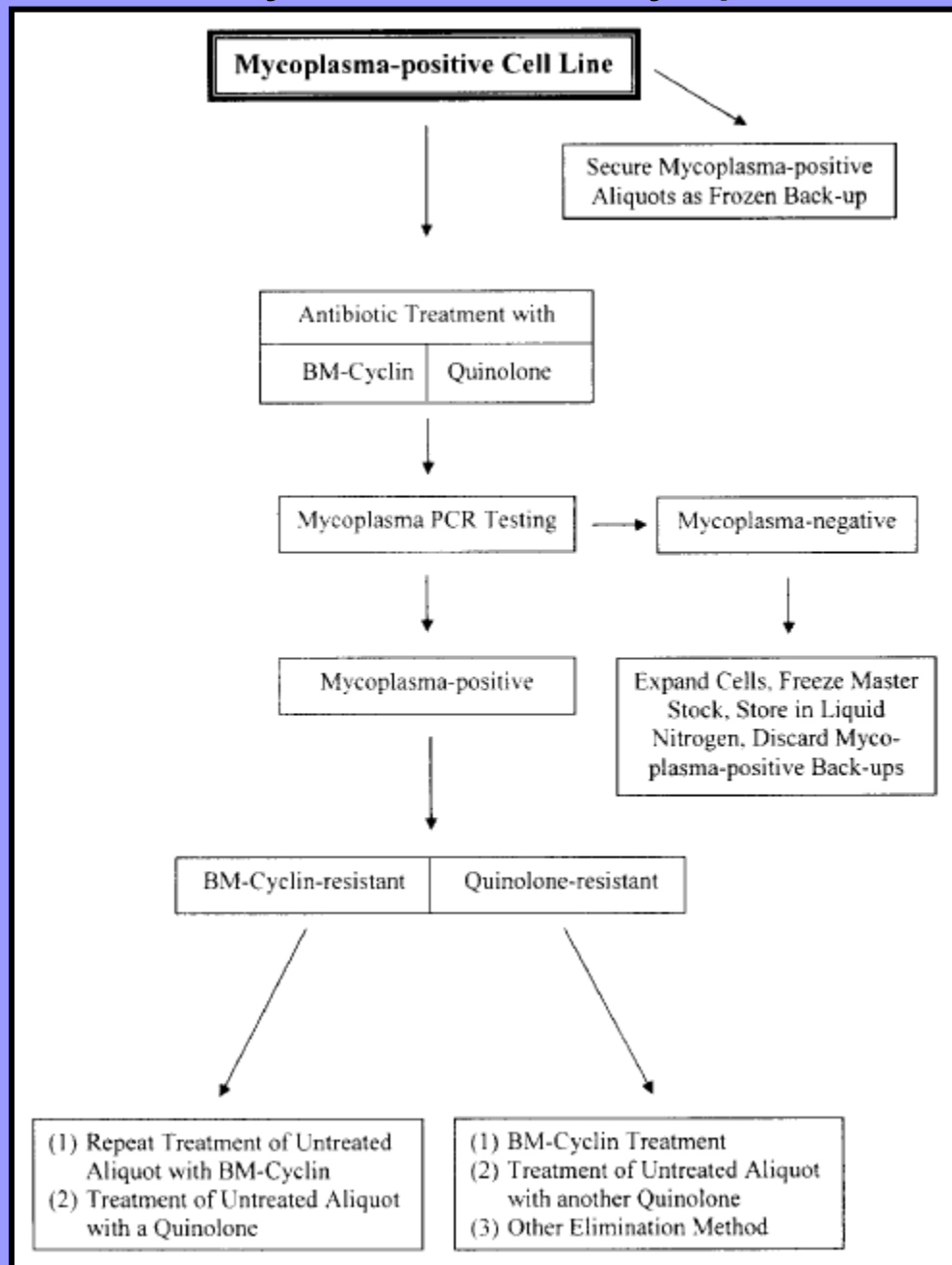
Sunlight	<15 to 120 min
UV light	30 - 90 min
Well water with 1% serum	7 days
Well water	4 - 5 days
50% soil extract	1 - 3 days
Dry at 4° C	61 days
Dry at 20° C	10 - 14 days

### Survival of MS under Various Conditions

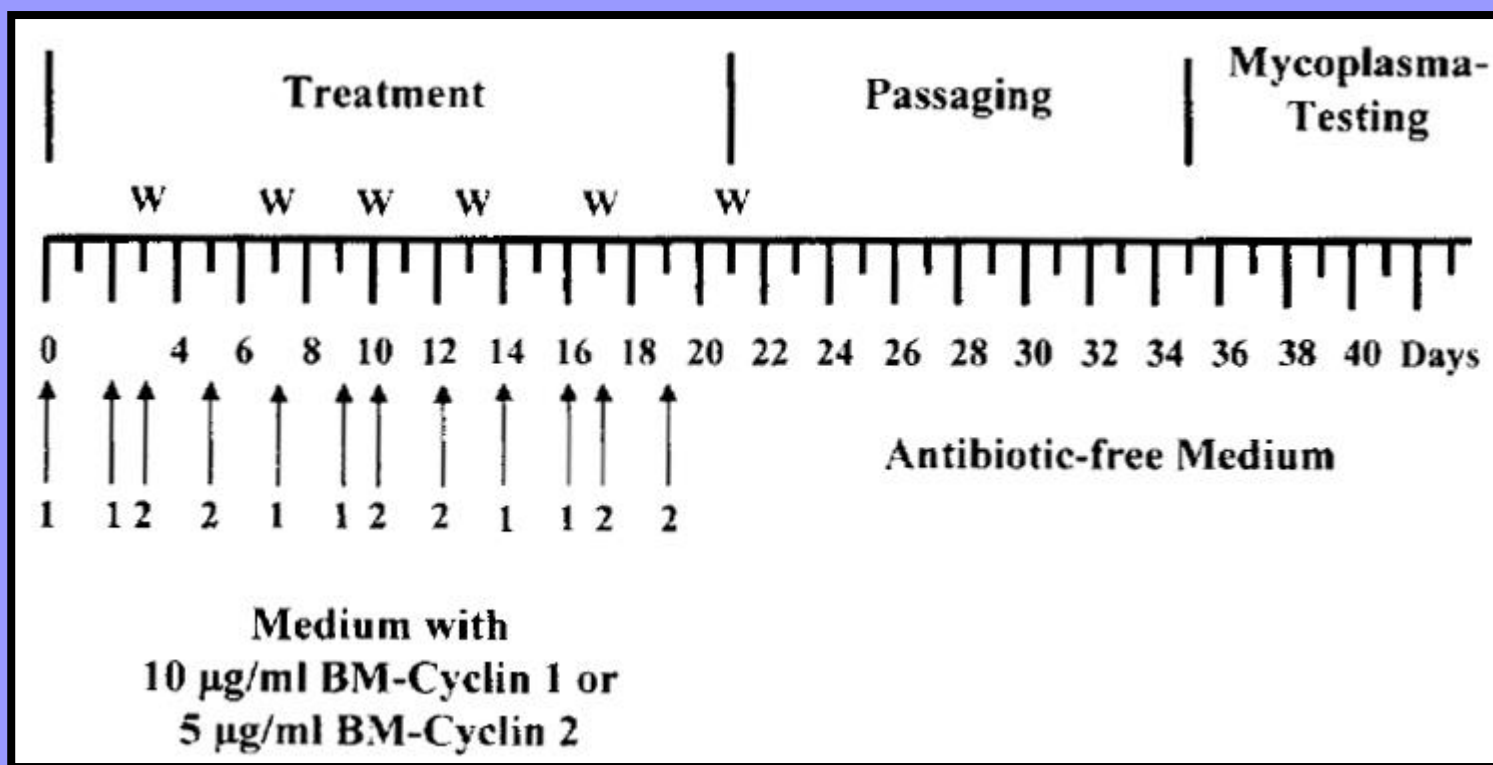
Sunlight	30 to 120 min
UV light	30 - 60 min
Well water with 1% serum	1 - 2 days
Well water	1 - 2 days
50% soil extract	1 - 2 days
Dry at 4° C	51 - 77 days
Dry at 20° C	10 - 21 days



# Obecné schéma léčení buněčných linií v LTK na mycoplasmata

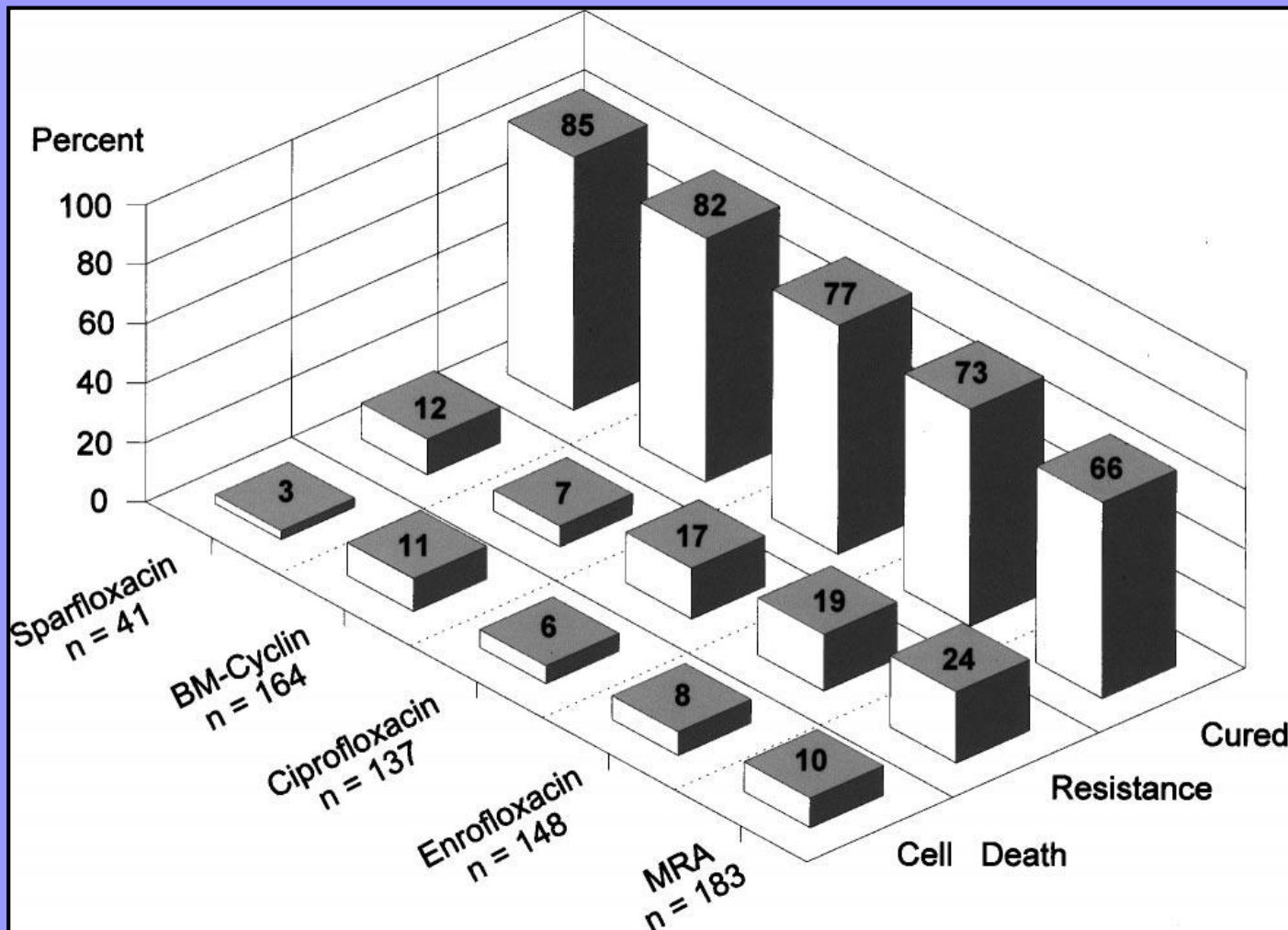


Příklad postupu léčení buněčné kultury na mycoplasmata  
přípravkem BM-cyclin fy Roche



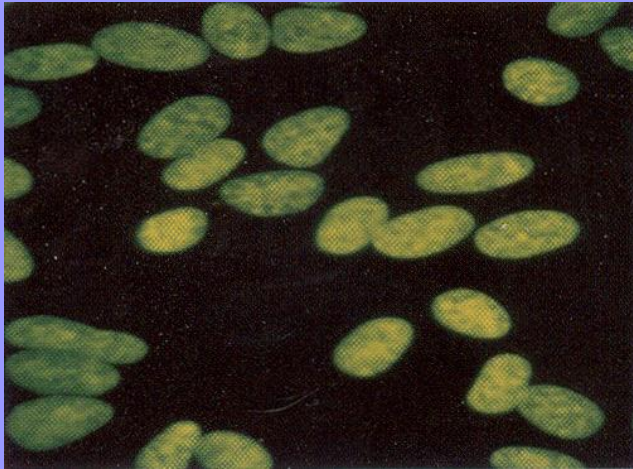
# Účinnost komerčně dostupných antibiotik v léčení kultur napadených mycolpasmaty

Uphoff & Drexler 2001

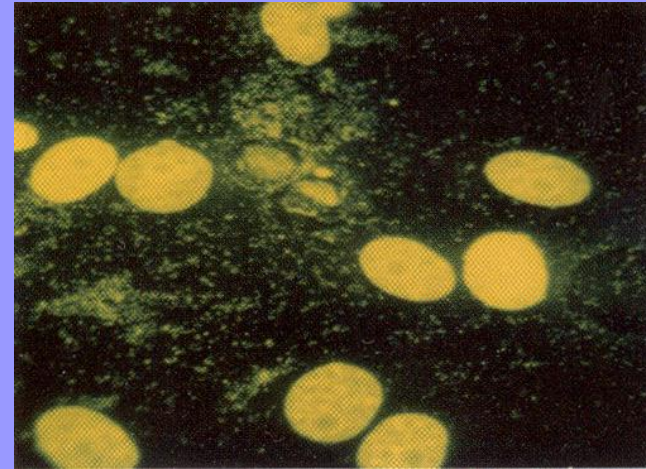


n – počet testovaných buněčných linií

## 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



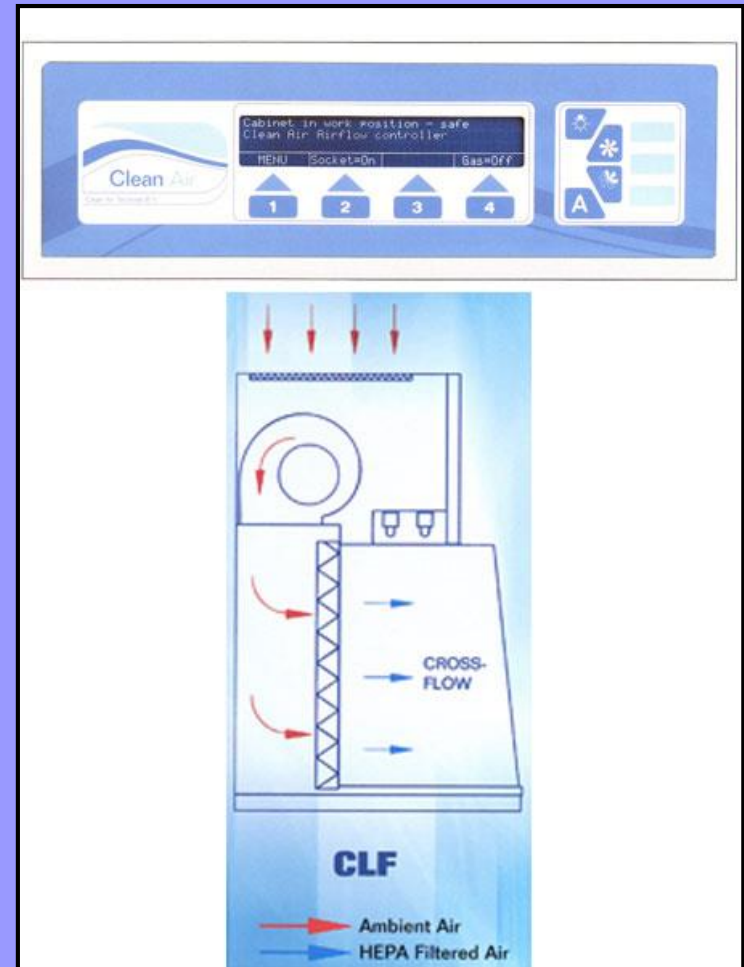
CO<sub>2</sub> inkubátor



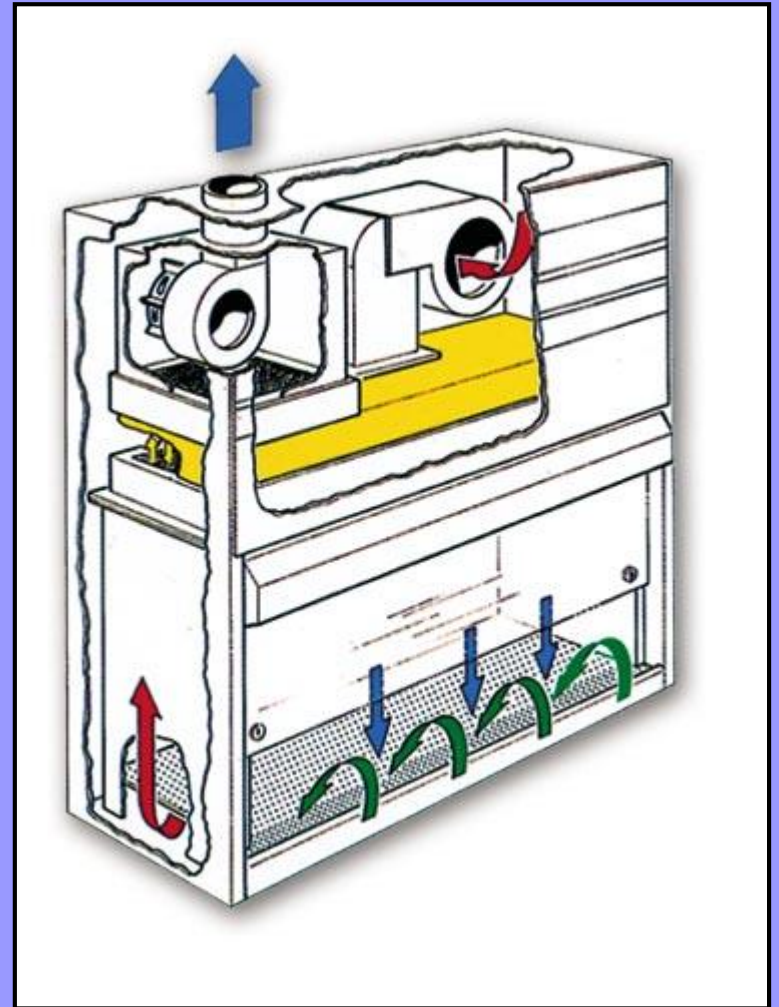
Inverzní mikroskop



# Flow-box / laminární box - základní

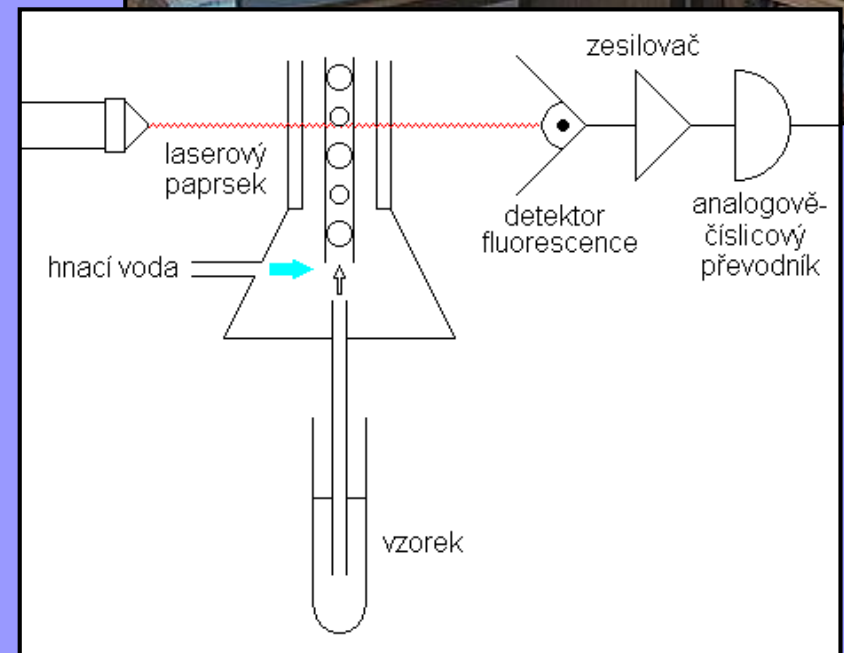


# Flow-box / laminární box – biohazard,

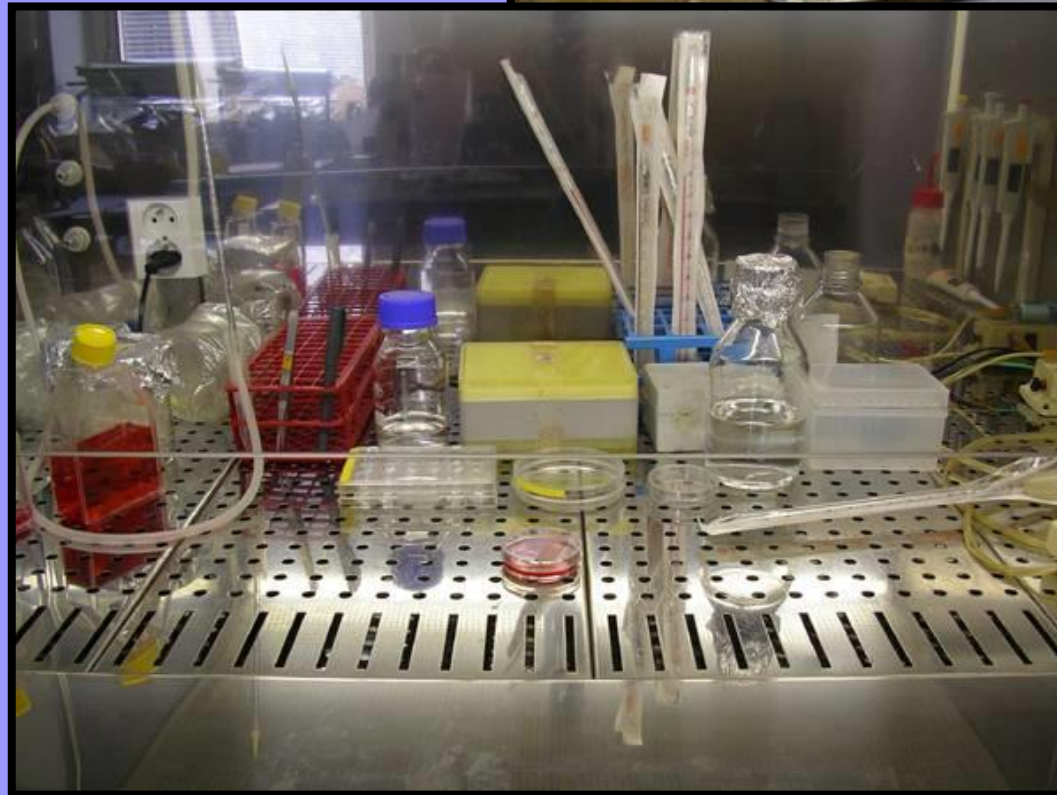


# Průtokový cytometr / Flow-cytometer (FACS)

## Počítač částic









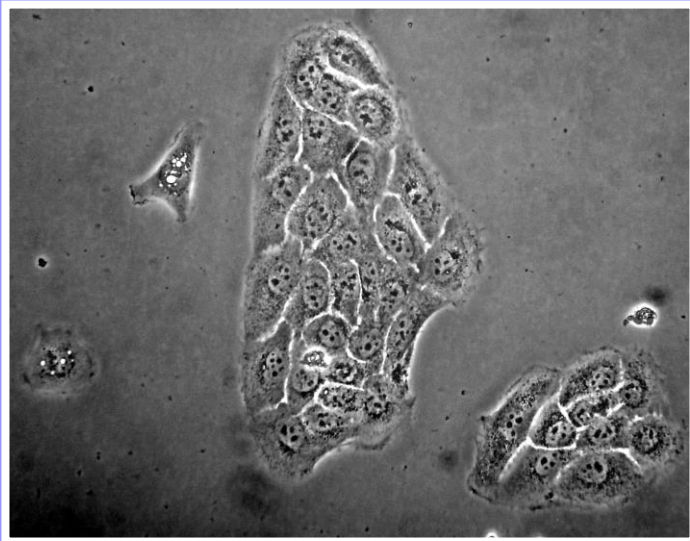
- Inkubátor / termostat s regulací teploty a složení atmosféry
- Flow-box = laminární box
- Inverzní mikroskop, nejlépe s fázovým kontrastem (Nomarského – vnitřní struktura buněk; Hoffmanův (reliéfní) – plastické znázornění povrchů)
- Počítač částic (hemocytometr, Bürkrova komůrka, Coulter Counter, FACS,...)
- Lednice a mrazáky
- Kontejner s tekutým N<sub>2</sub> (-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

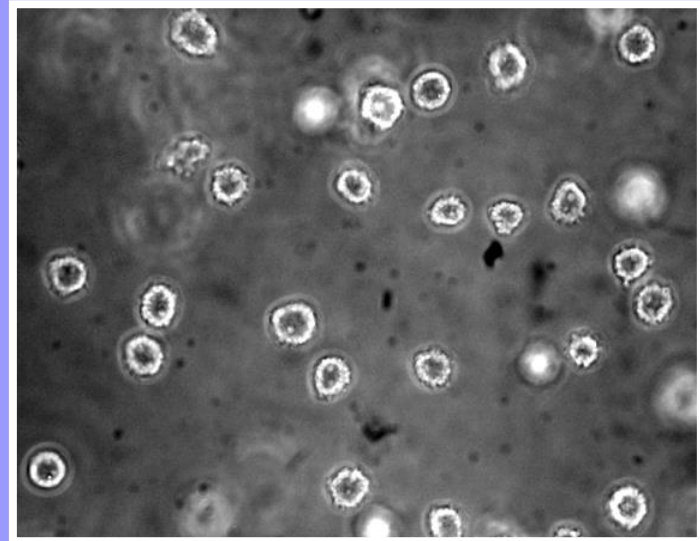
Podle způsobu kultivace

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

**Adherentní – (linie HaCaT)**



**Suspenzní – (linie HL60)**



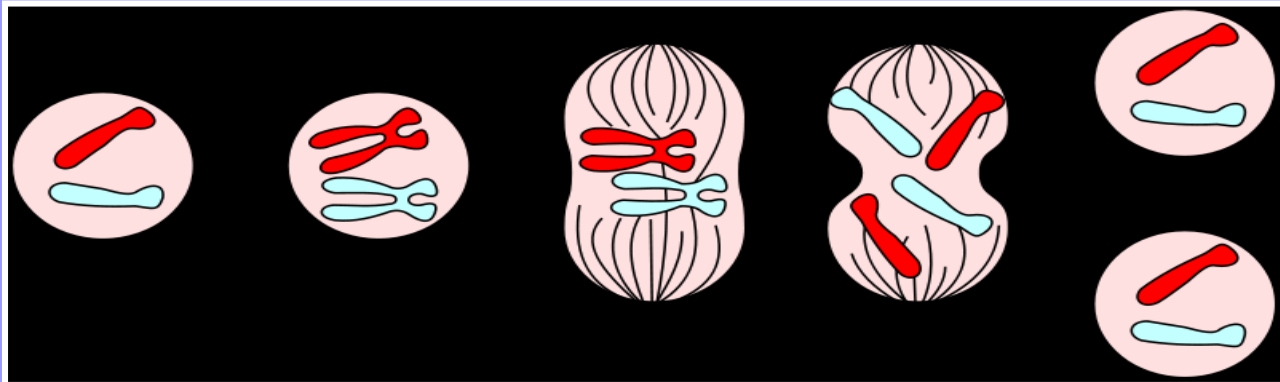
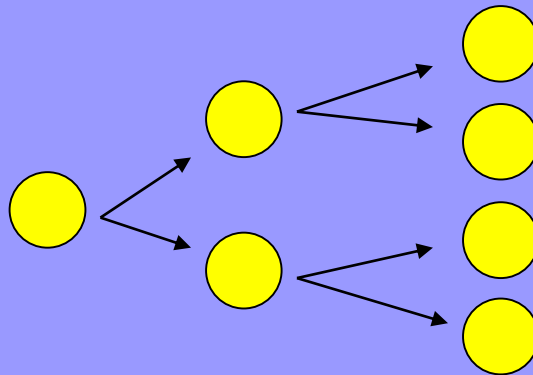
100  $\mu\text{m}$

Buňky a jejich vlastnosti (v TC).

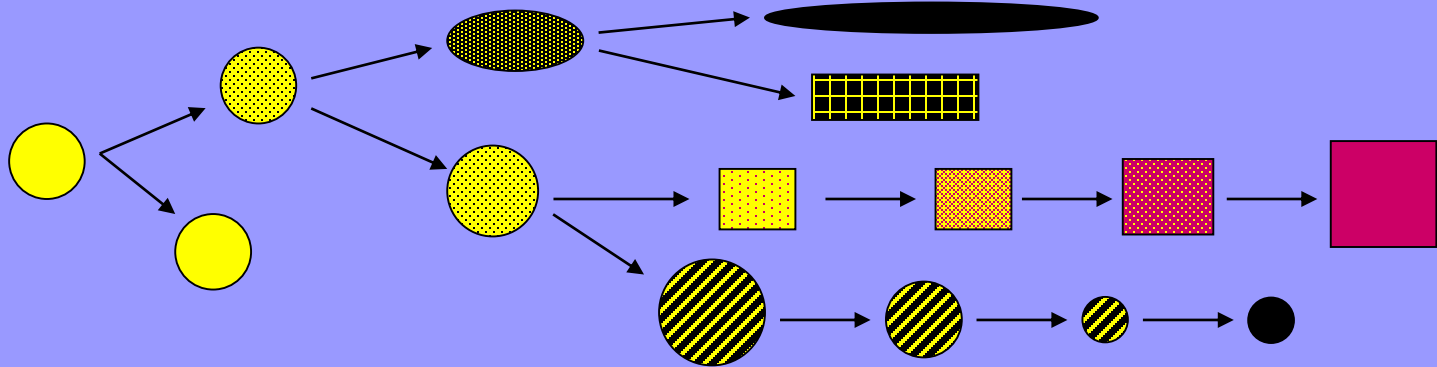
**PROLIFERACE x DIFERENCIACE  
x APOPTÓZA**



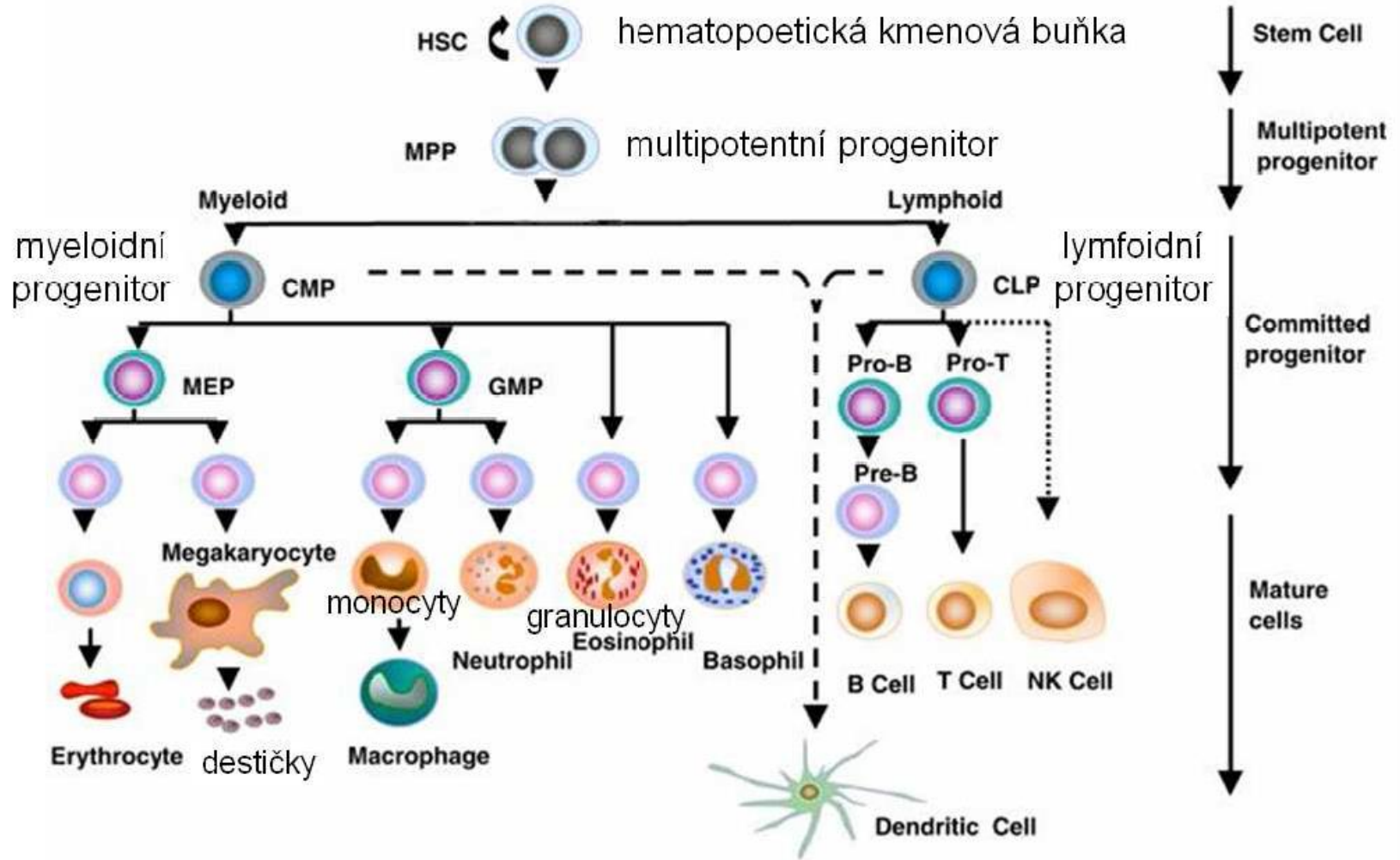
**PROLIFERACE = dělení buněk**



# DIFERENCIACE = rozrůžňování buněk

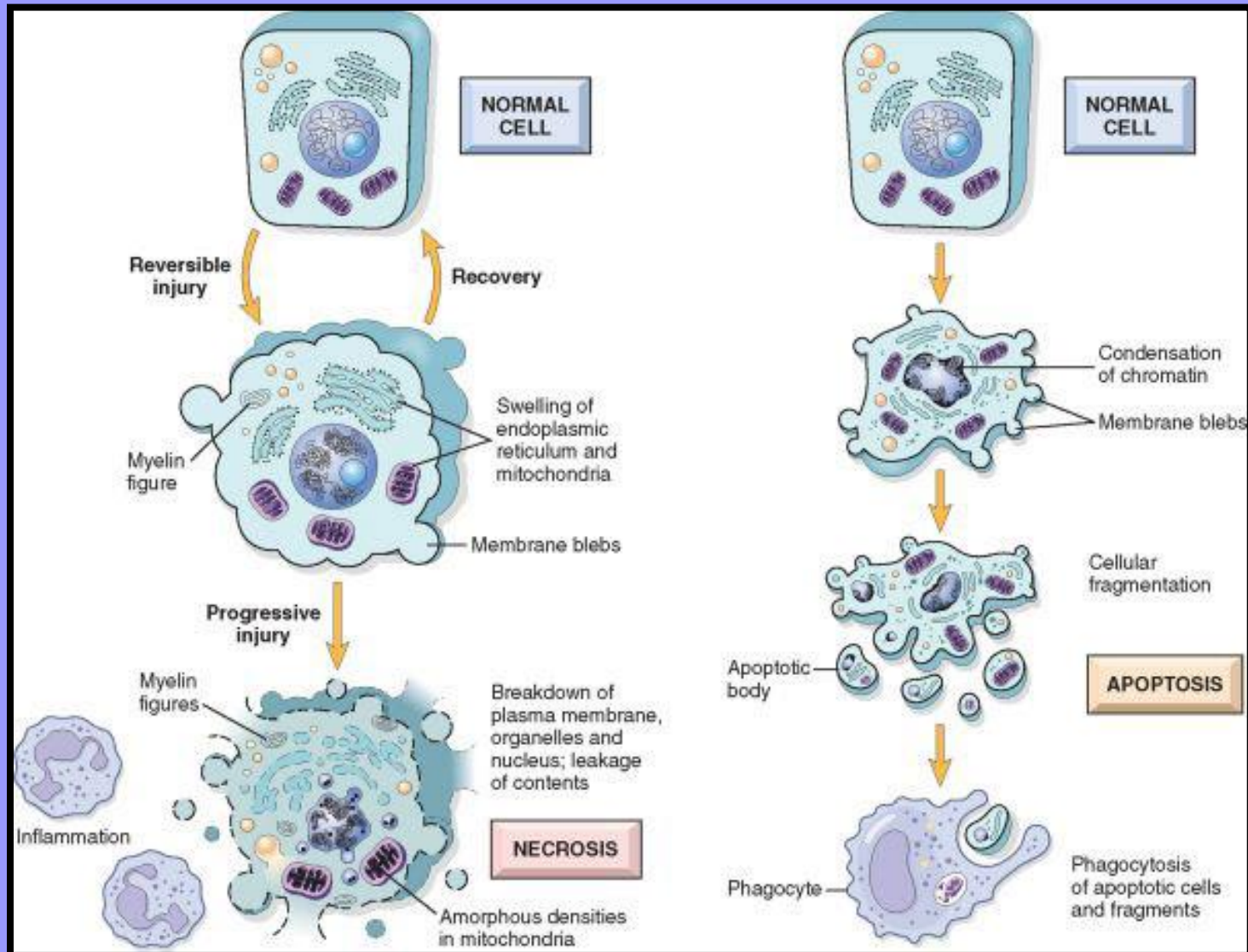


# Hierarchie hematopoézy





# 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*!!!

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

<b>BUŇKY</b>		
<b>NORMÁLNÍ</b>	<b>IMORTALIZOVANÉ</b>	<b>NÁDOROVÉ</b>
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 a permanentních linií)

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

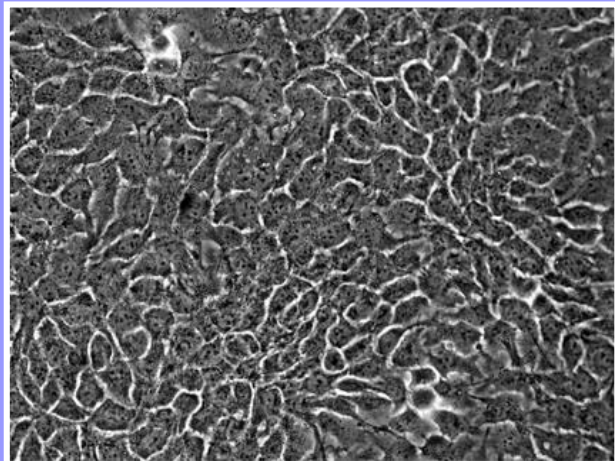
**Adherentní linie\*** – mechanicky nebo **enzymatickým štěpením** vazeb buňky / substrát;  
buňka / buňka  
Enzymy - **trypsin**, collagenáza,..; inaktivace spec. inhibitory, vyředěním,  
nadbytkem proteinů (např. sérem)  
Pomocné látky – EDTA (zejména vychytávání  $\text{Ca}^{2+}$ )

**Suspenní linie** – prostým ředěním

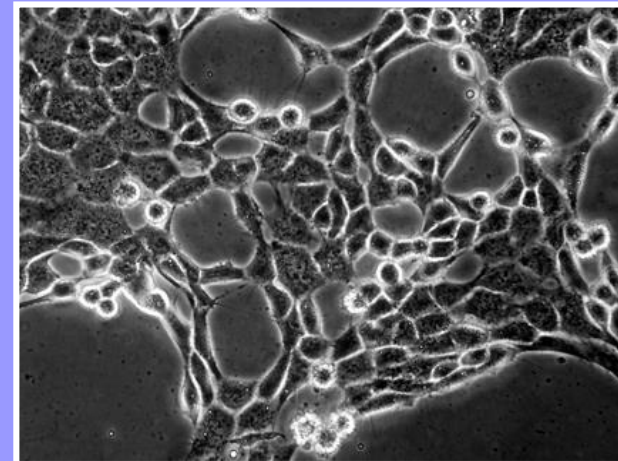
\* Ve většině případů je u adherentních linií nutno počítat s jejich zvýšenými nároky na kvalitu podkladu, na kterém rostou. Běžně se používá ošetření 0.01 – 0.1 % roztokem želatiny (prasečí, hovězí) v  $\text{dH}_2\text{O}$ . Podle potřeby a typu buněk se používají ale i ostatní proteiny ECM.

# Pasážování buněk pomocí tzv. trypsinizace (enzymatické rozvolnění)

**konfluentní buňky (100%)**



**rozvolněné konfluentní buňky**



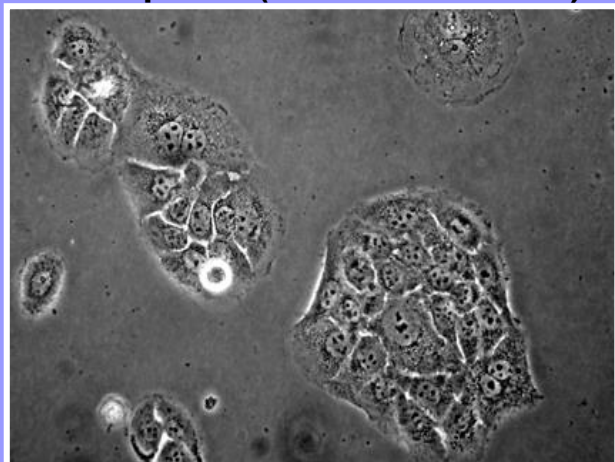
*rozvolnění buněk deplecí  $\text{Ca}^{2+}$  iontů  
(chelatony např. EDTA)*



*růst kultury*



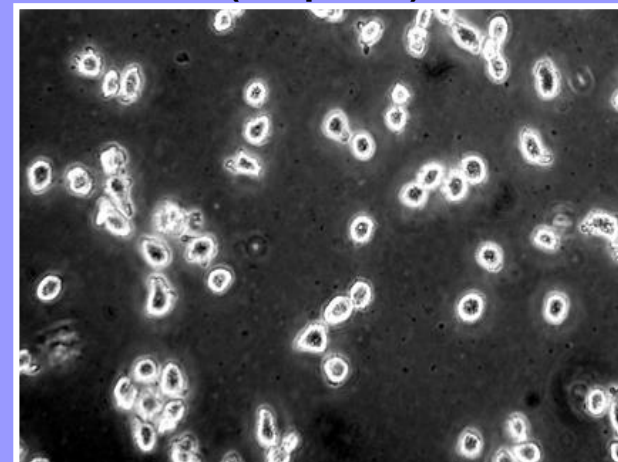
**nová pasáž (konfluence ~20%)**



*enzymatické štepení  
např. trypsinem*



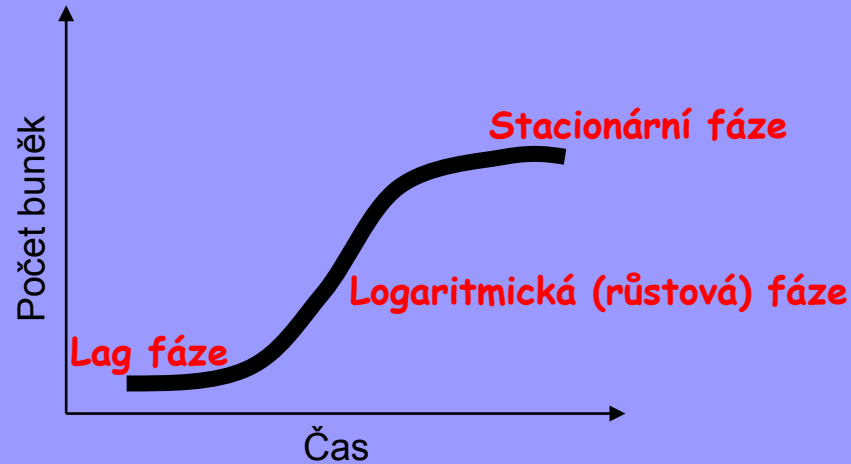
**enzymaticky rozvolněné buňky  
(suspenze)**



*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  $\text{cm}^2$

- **konfluence** – počet buněk na plochu u adherentních linií (b. /  $\text{cm}^2$ ,  
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

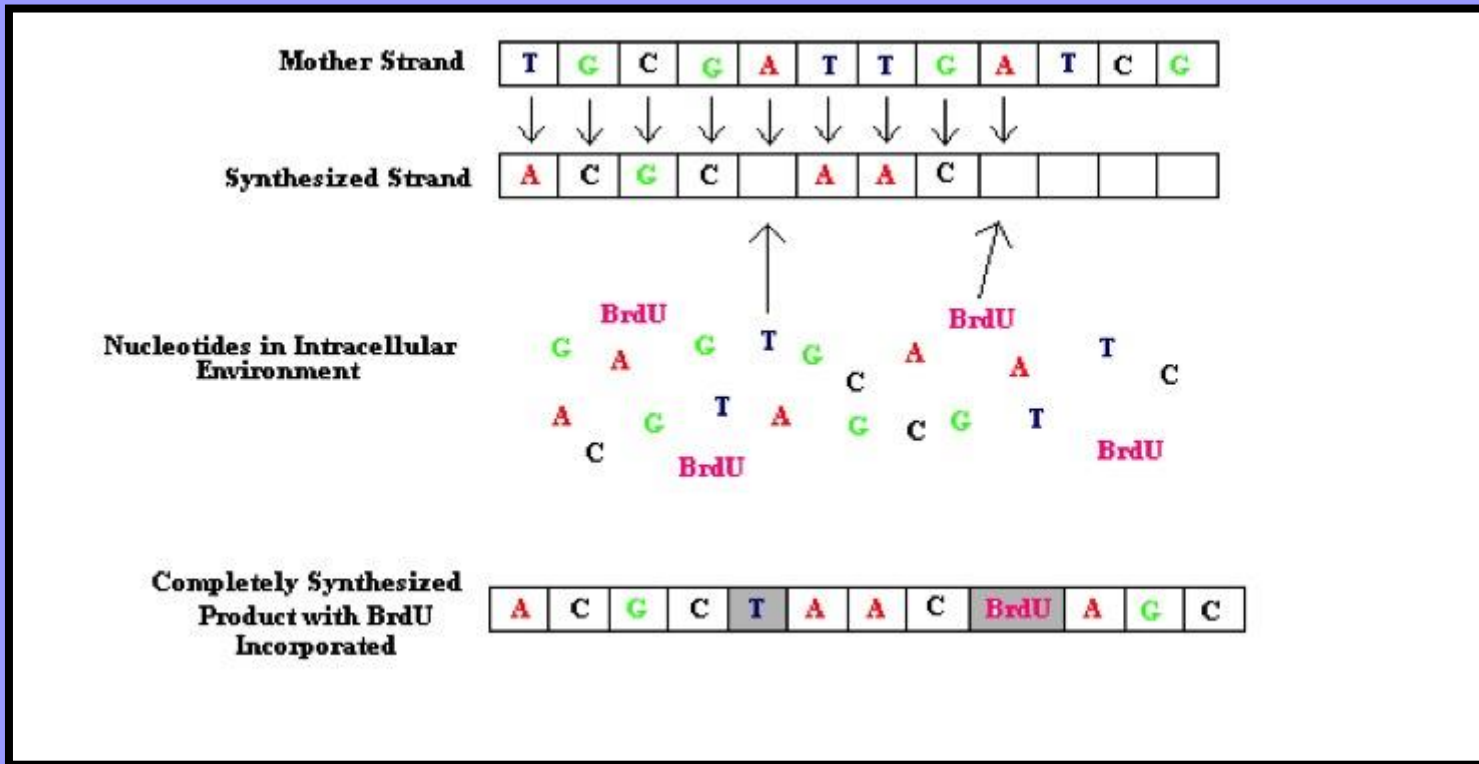
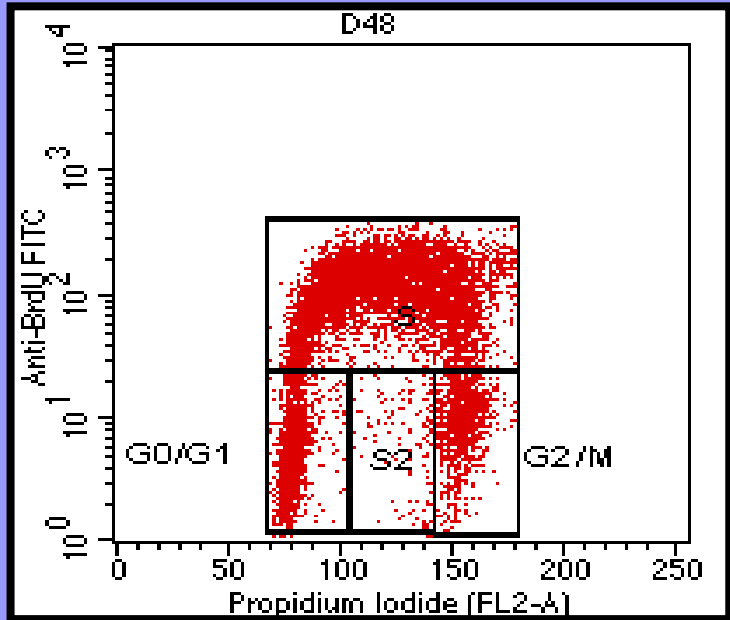
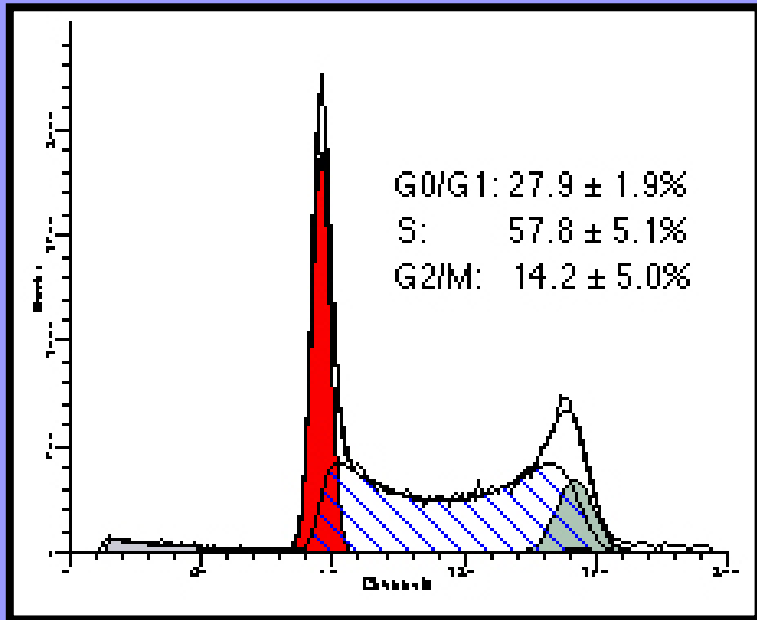
## Počítáním buněk

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

## Přírůstek v množství DNA (lze použít i pro jednotlivou buňku)

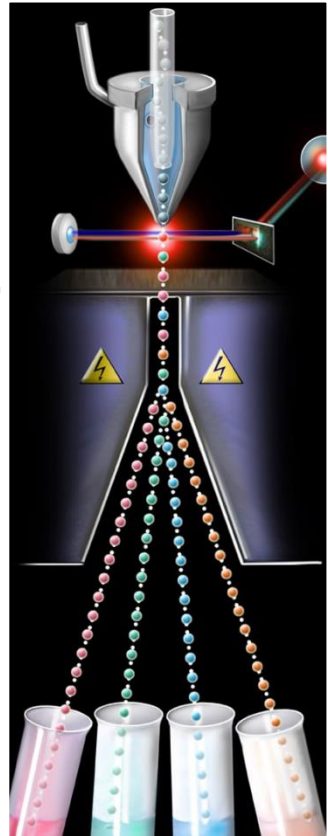
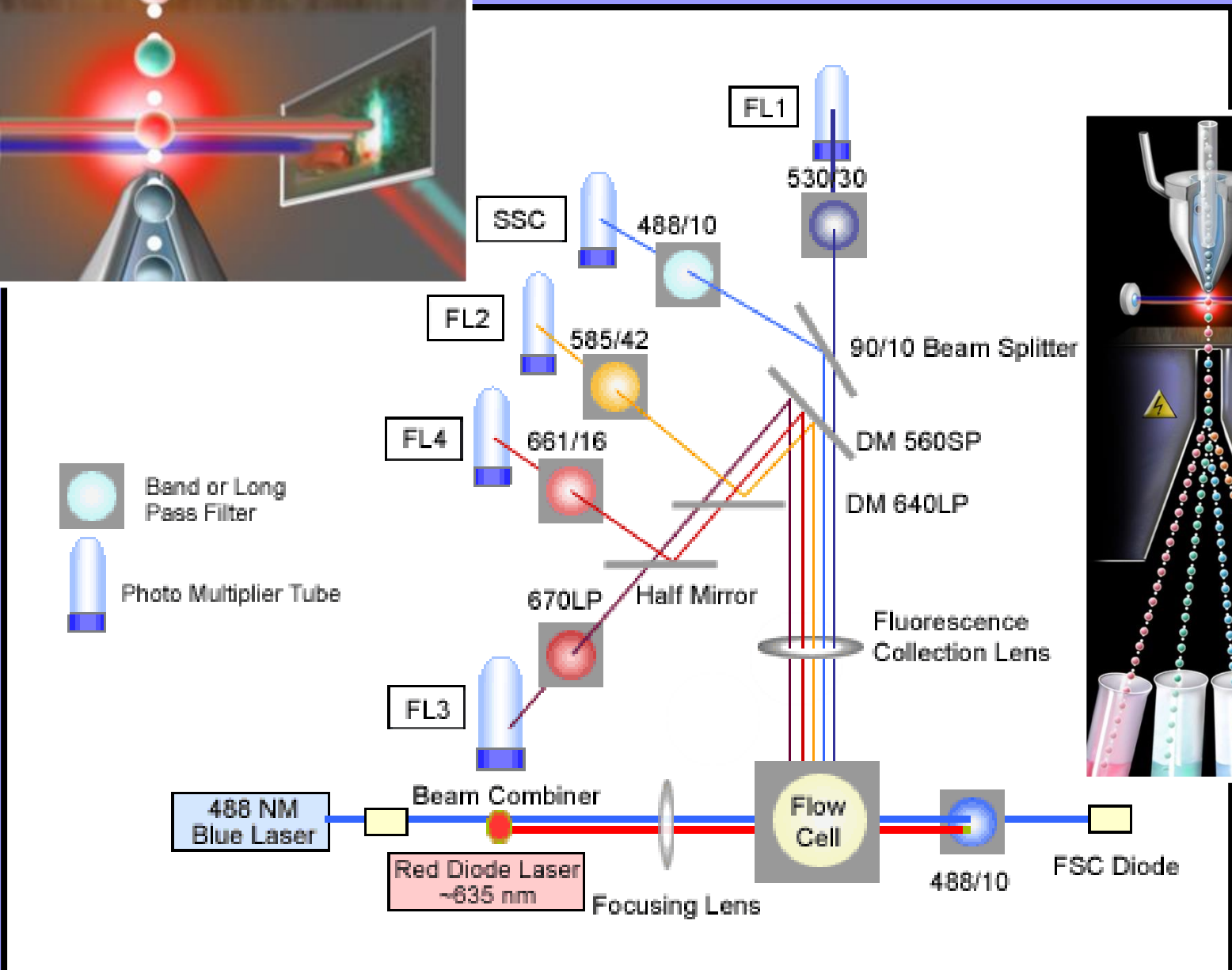
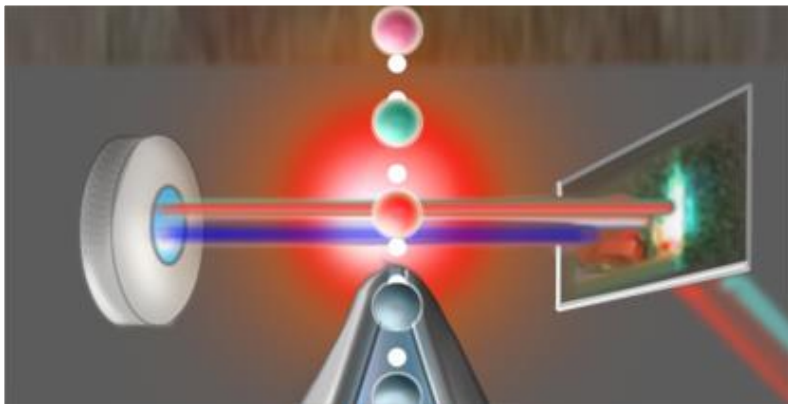
- Inkorporace  $^3\text{H}$  thymidinu (měří se přírůstek radioaktivity, celkový, nebo u jednotlivé buňky)
- Inkorporace BrdU (bromdeoxyuridinu, analog thymidinu), množství BrdU se stanoví pomocí protilátky (lze na populaci i jednotlivé buňce)
- Celkové množství DNA v buňce -> stanovení fáze buněčného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

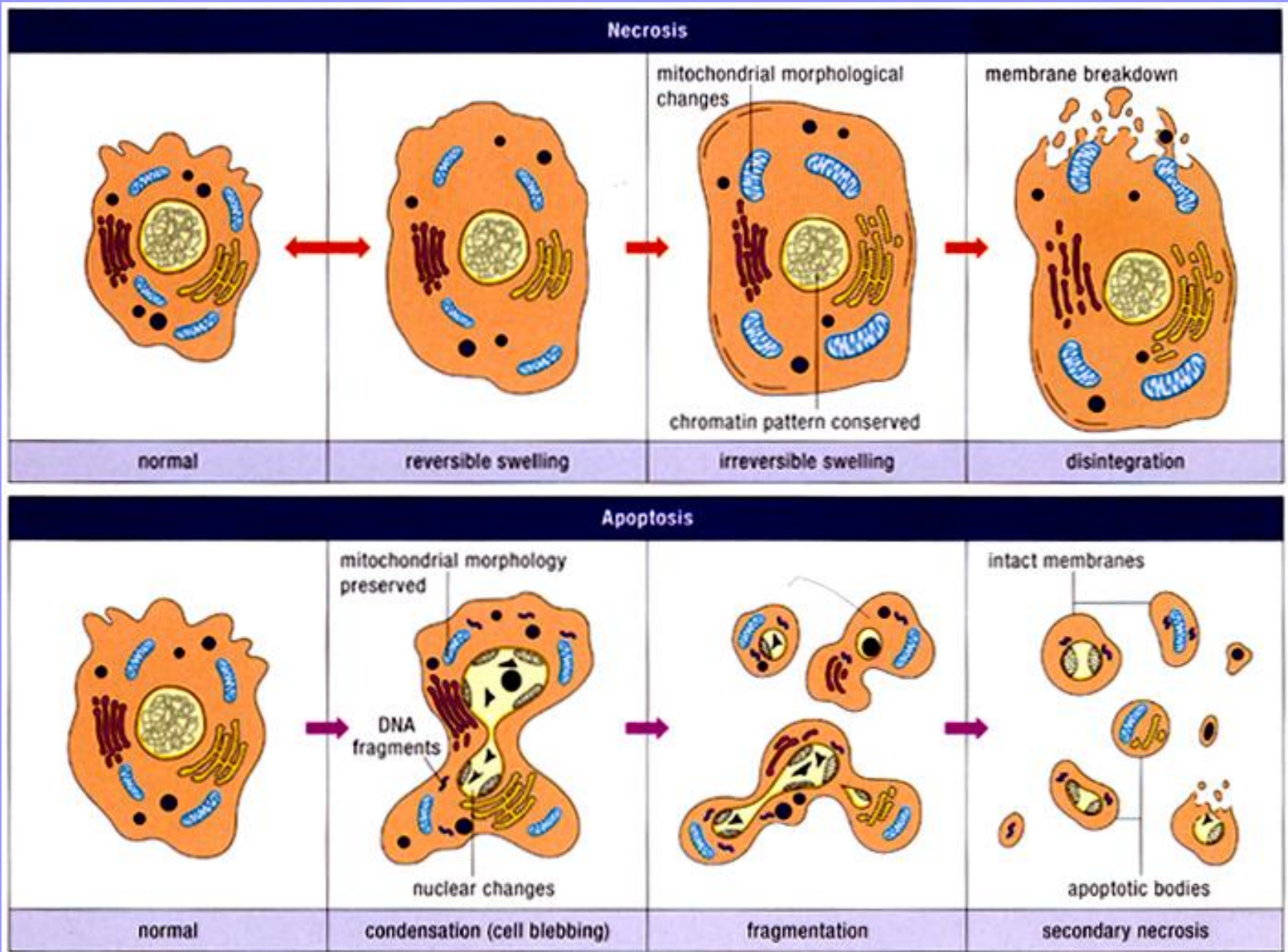
- testy využívající tetrazoliové soli (např. MTT, WST-1), které jsou redukovány na barevné formazany, které se dají stanovit spektrofotometricky (různé tetrazoliové soli jsou různě citlivé pro jednotlivé enzymatické (oxidačně redukční, NADP) systémy a i vhodné pro různé typy buněk)
- Stanovení celkového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

## 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),..

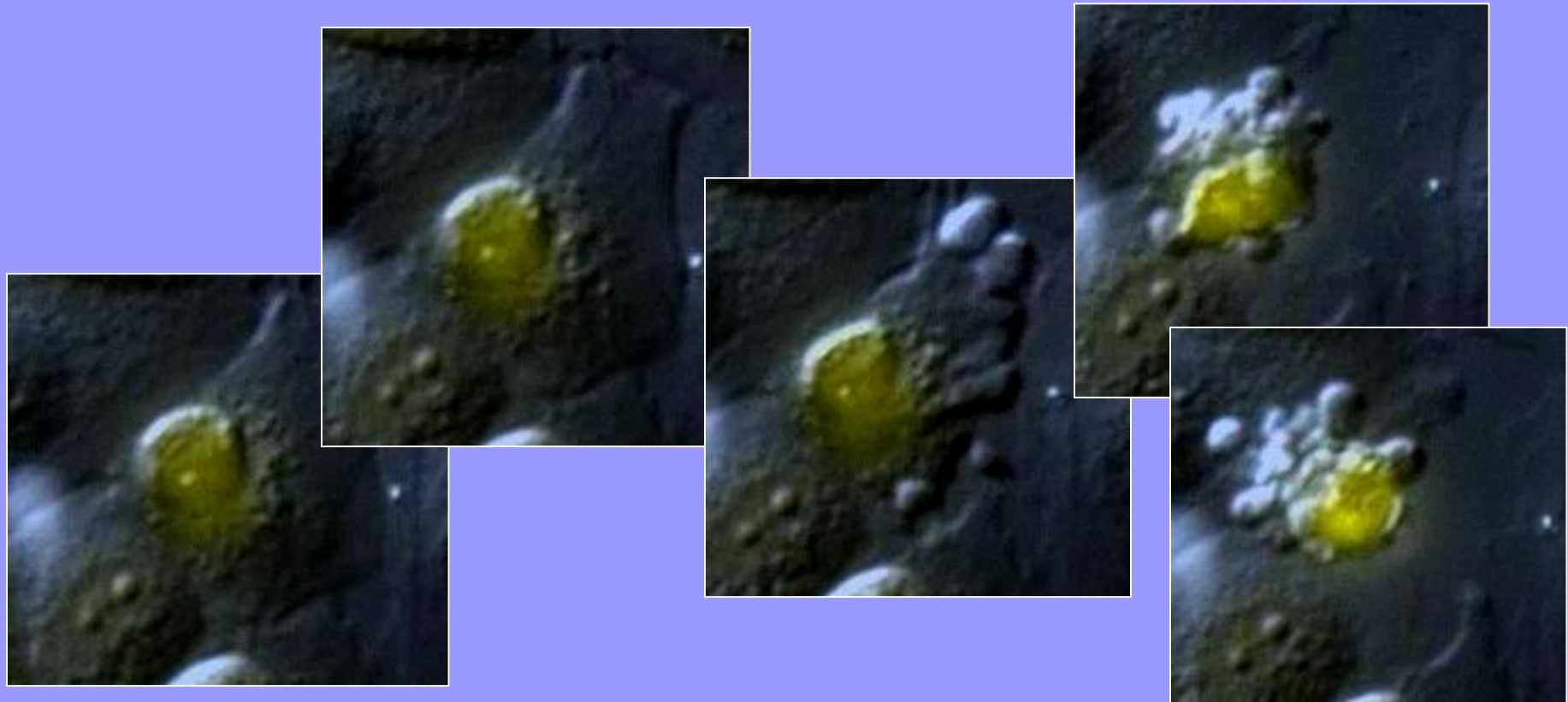
Nedílnou součástí sledování proliferační aktivity buněk je i detekce jejich životaschopnosti = **viability**, která je spojená s buněčnou smrtí = **apoptózou**, případně s **nekrózou**

# Analýza viability a apoptózy

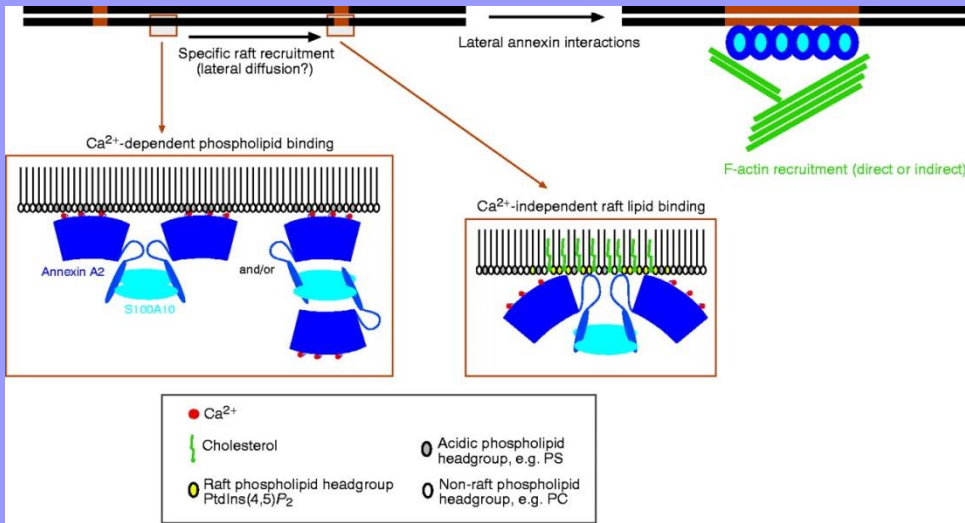


## A) Testy založeny na kompaktnosti zdravé buňky a jejím „správném“ chování / funkci

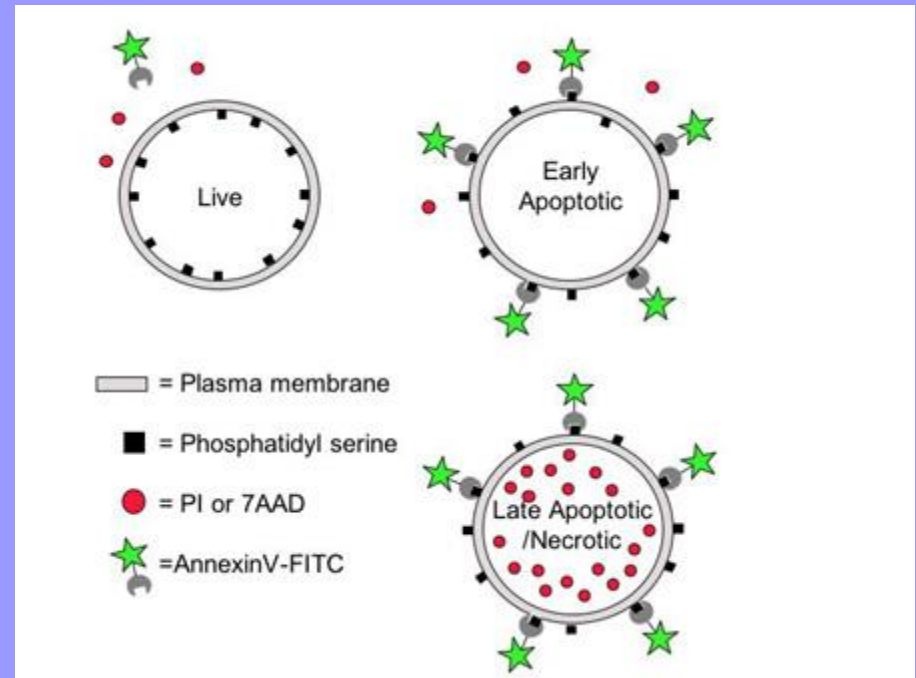
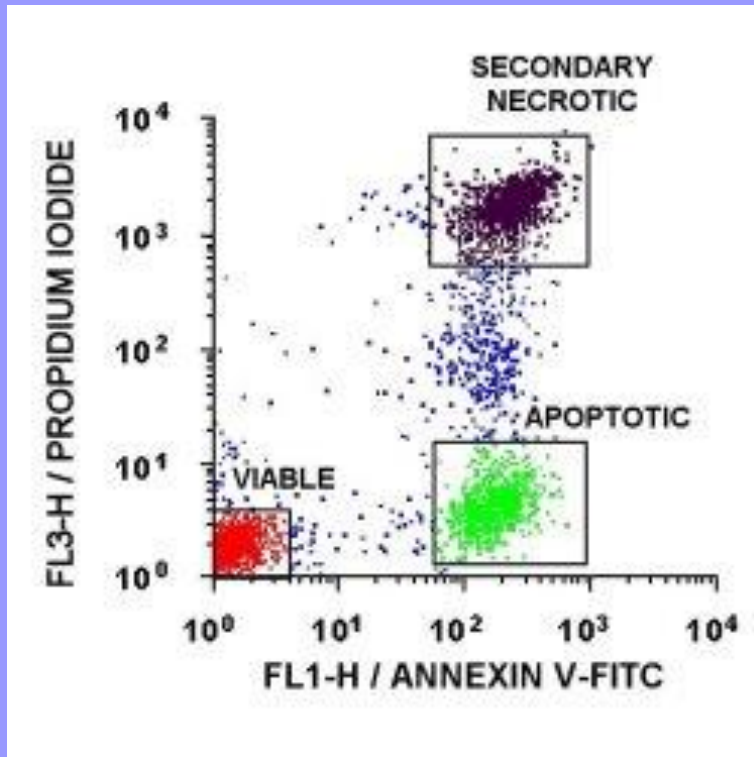
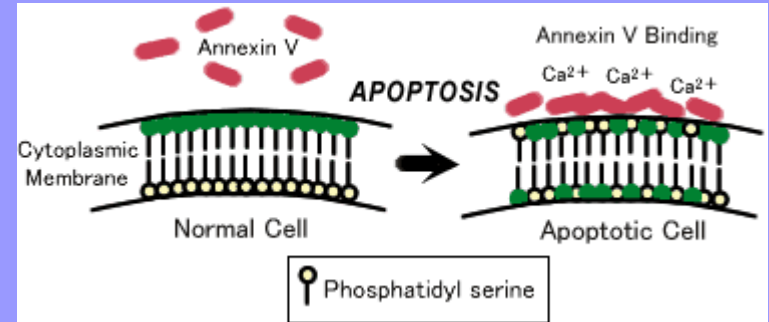
- Morfologické změny (apoptická tělíška, výběžky, ...)
- Schopnost vylučovat barviva živými buňkami (eosin, bromfenolovou modř pro detekci ve VIS, propidium iodid pro fluorescenci: mikroskopicky, FACS)
- Enzymatická aktivita, nejčastěji esterázy (fluorescein diacetát pro fluorescenci: mikroskopicky,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





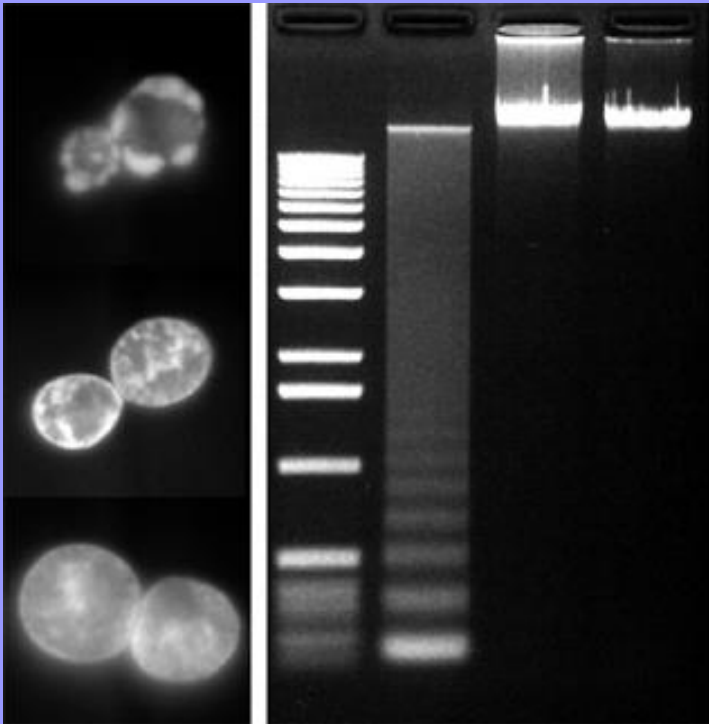


# Annexin assay

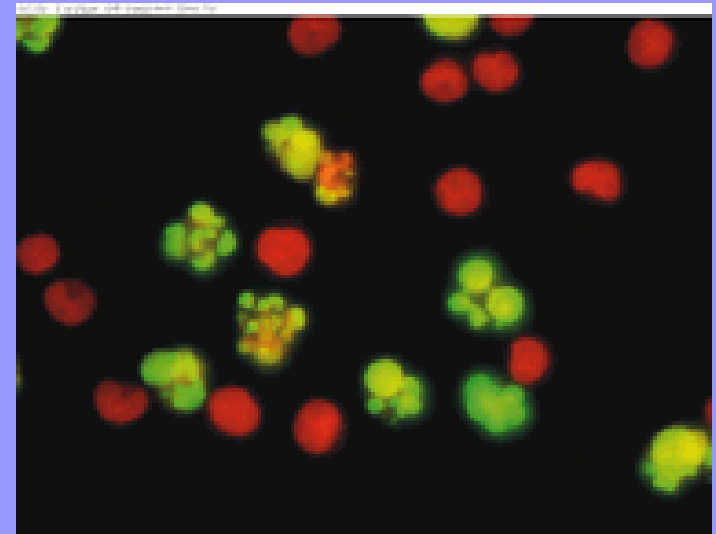


## B) Testy založeny na stanovení biochemických a molekulárně biologických parametrů

- 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)



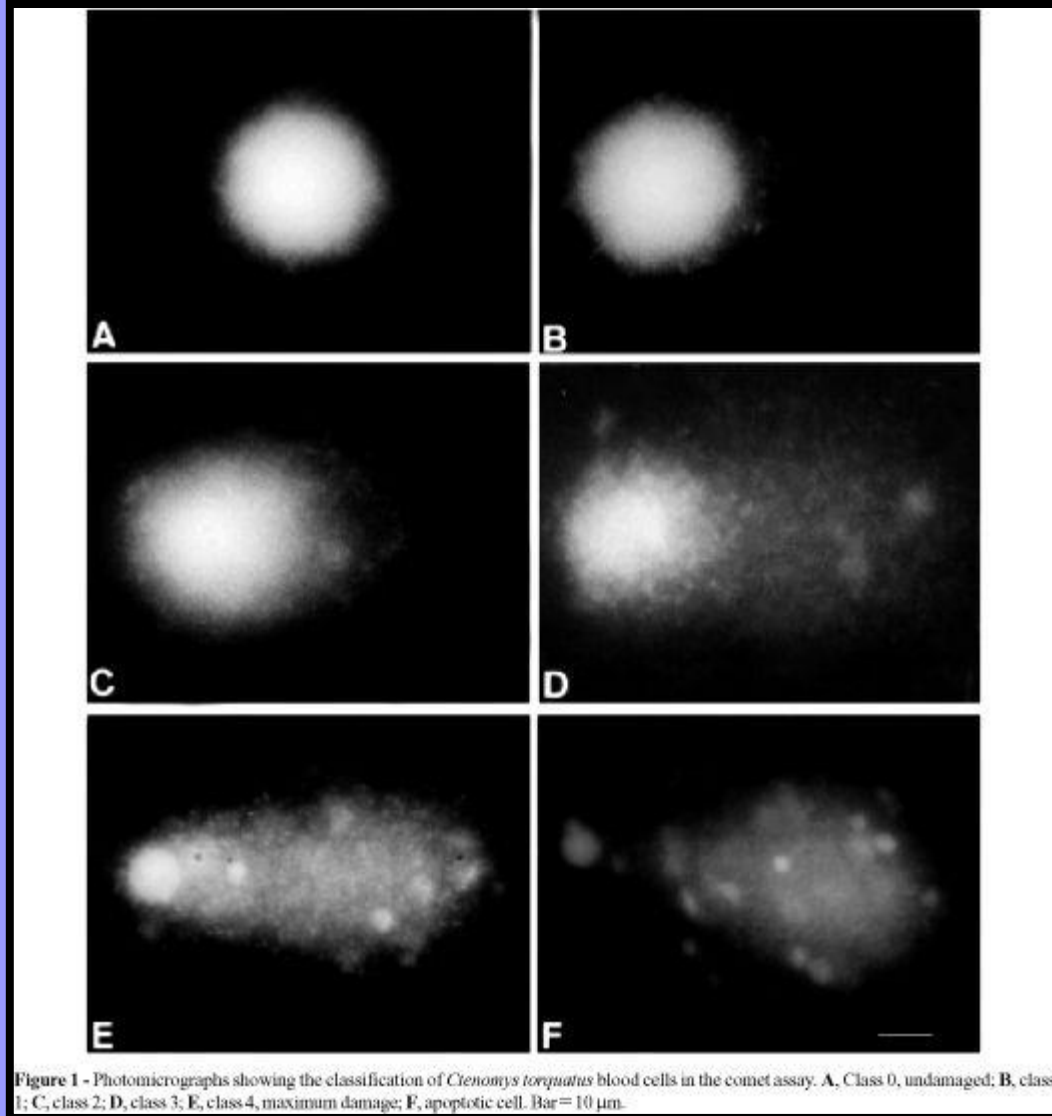
TUNEL assay, red - nuclei, green apoptosis





# Comet assay

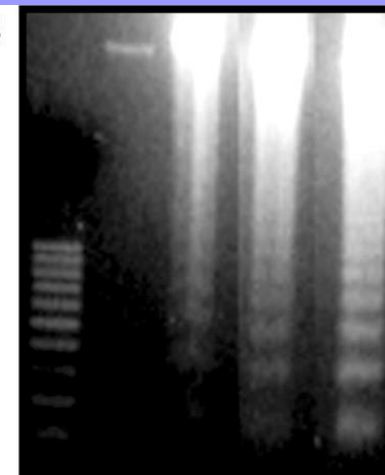
Eosin (Trypan blue)  
stain of viability



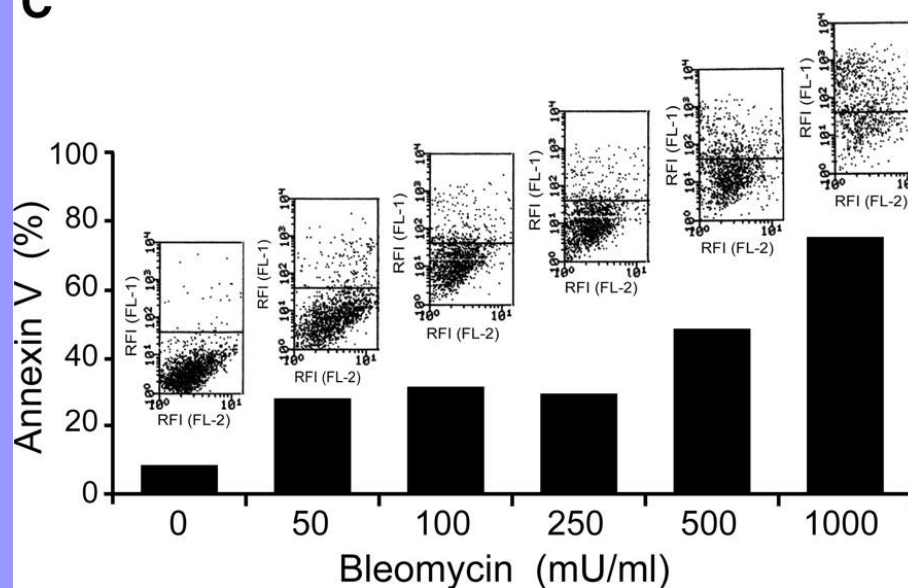
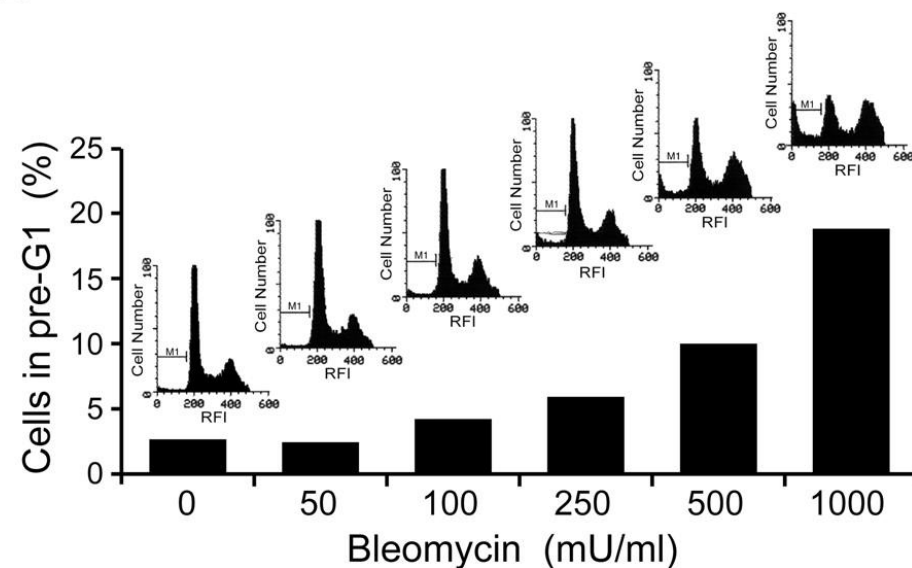
**A**

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

1 - % viable cells out of total cells

2 - [<sup>3</sup>H] thymidine release assay (DPM)**B**

M 0 50 250 500  
BLEO (mU/ml)

**C****D**

# Diferenciace buněk

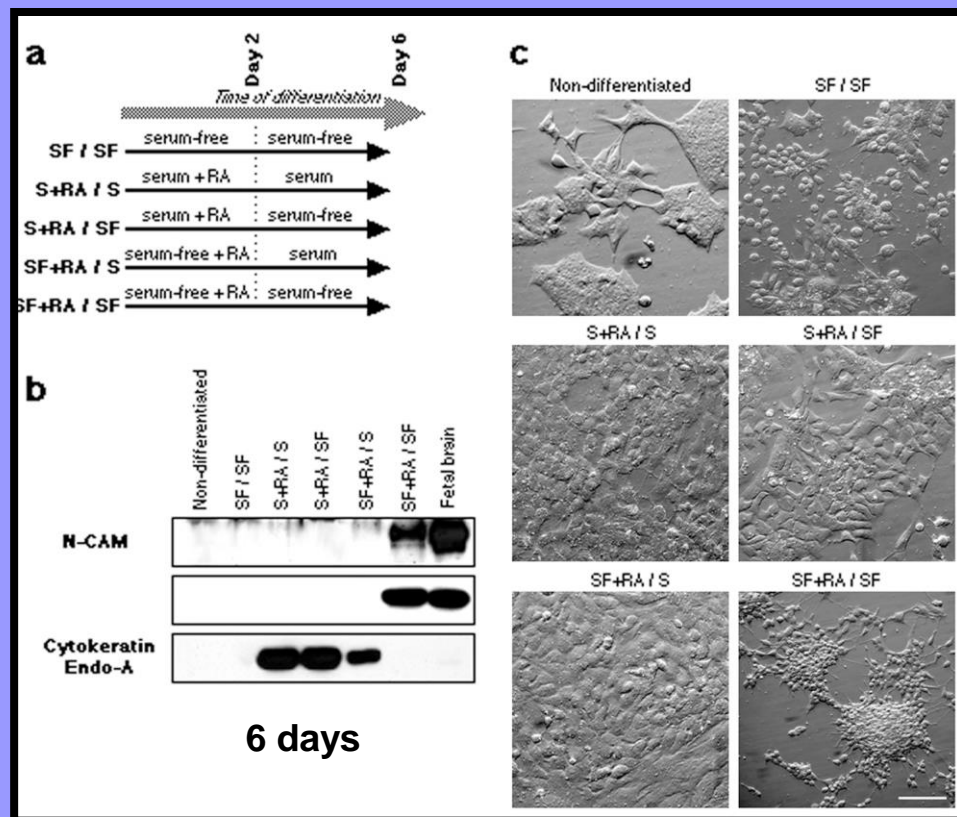
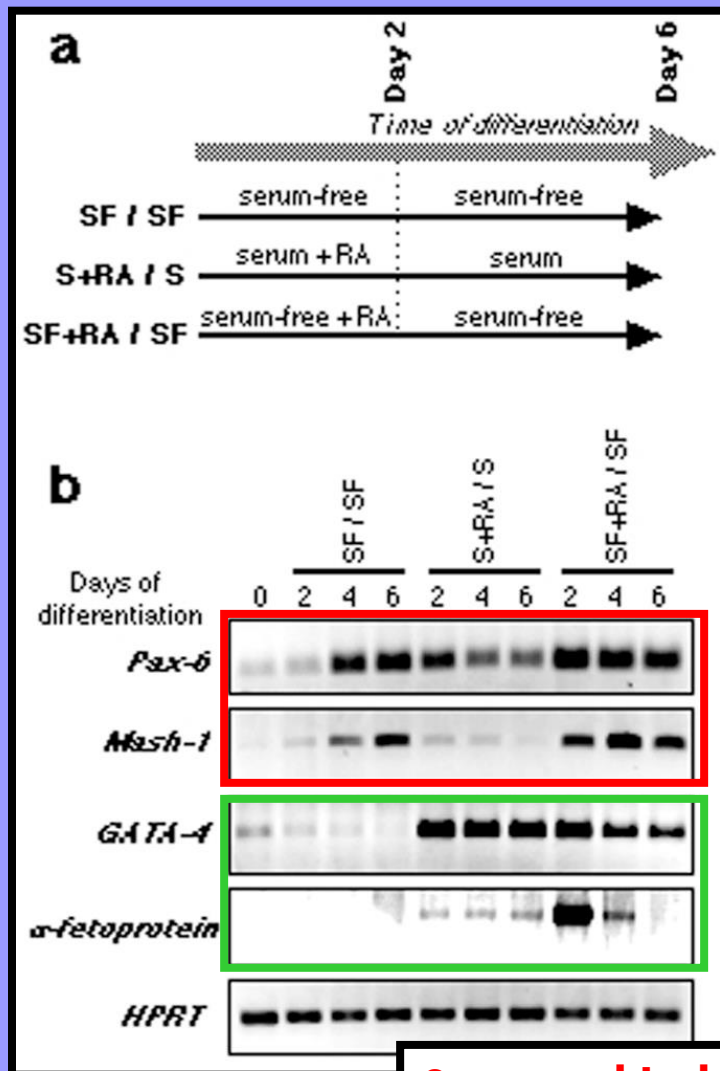
V průběhu kultivace (pasážování) buněk se volbou vhodných podmínek snažíme, aby si buňky dlouhodobě zachovali stabilní genotyp i fenotyp. Přitom u nádorových linií je udržení stabilního genotypu už z principu problematické. Změny kultivačních podmínek mohou vést k nestabilitě již tak obecně nestabilního 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; epitelý - produkce mucinů;.....; **transplantace** a sledování jak se transplantované buňky zapojí do funkce dané tkáně)

# Účinek séra na RA indukovanou neurální diferenciací EC buněk

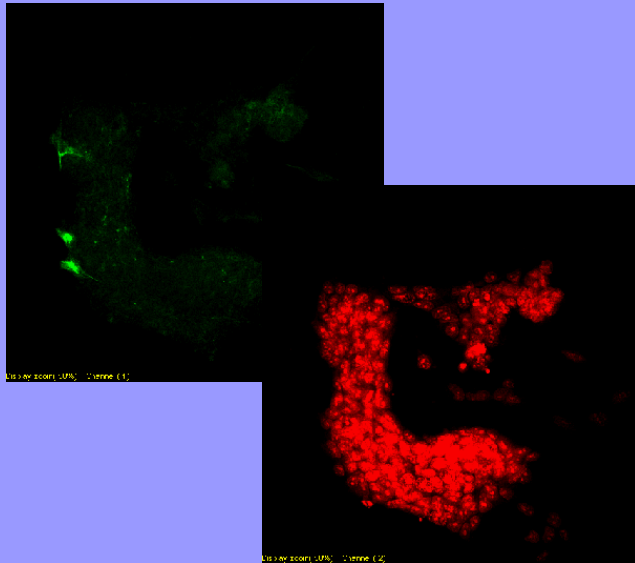


RT-PCR analýza exprese liniově specifických genů

- neuroektoderm
- entoderm

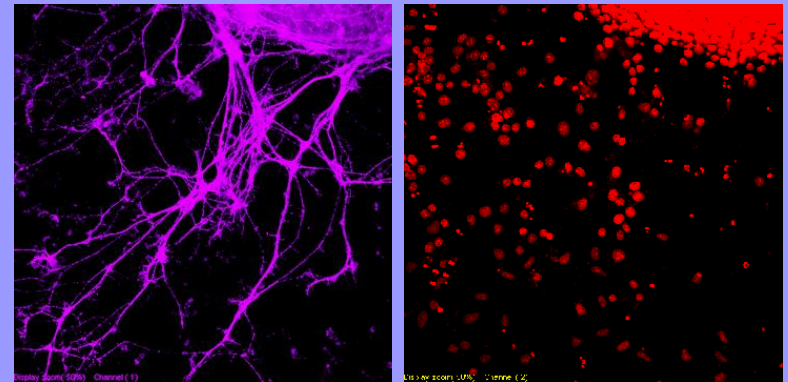
# Účinek séra na RA indukovanou neurální diferenciaci EC buněk

## Nediferencované buňky EC

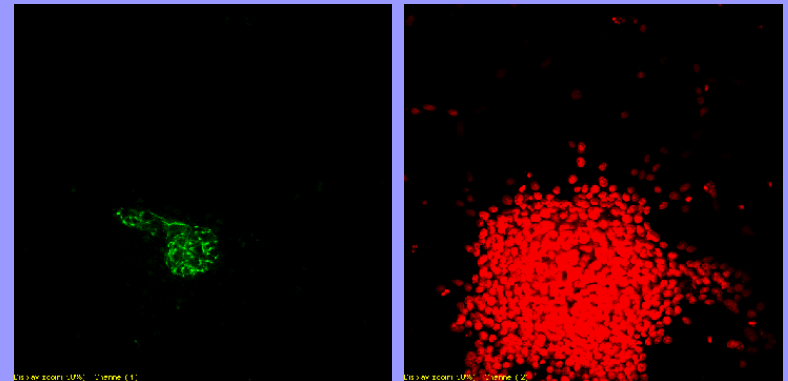
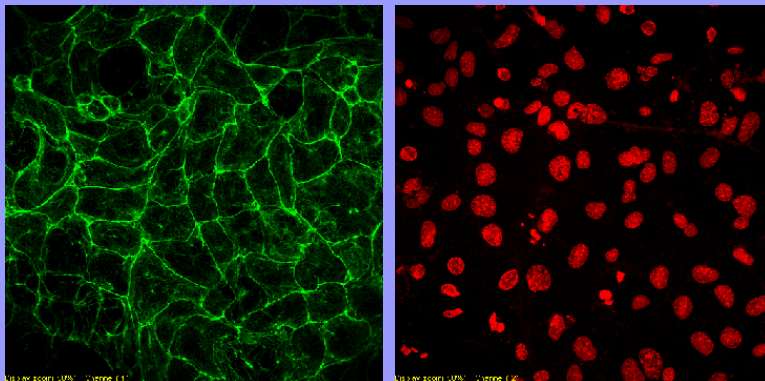


- ◆ buněčná jádra
- ◆ cytokeratin EndoA pozitivní buňky – entoderm
- ◆ N-CAM pozitivní buňky - neurony

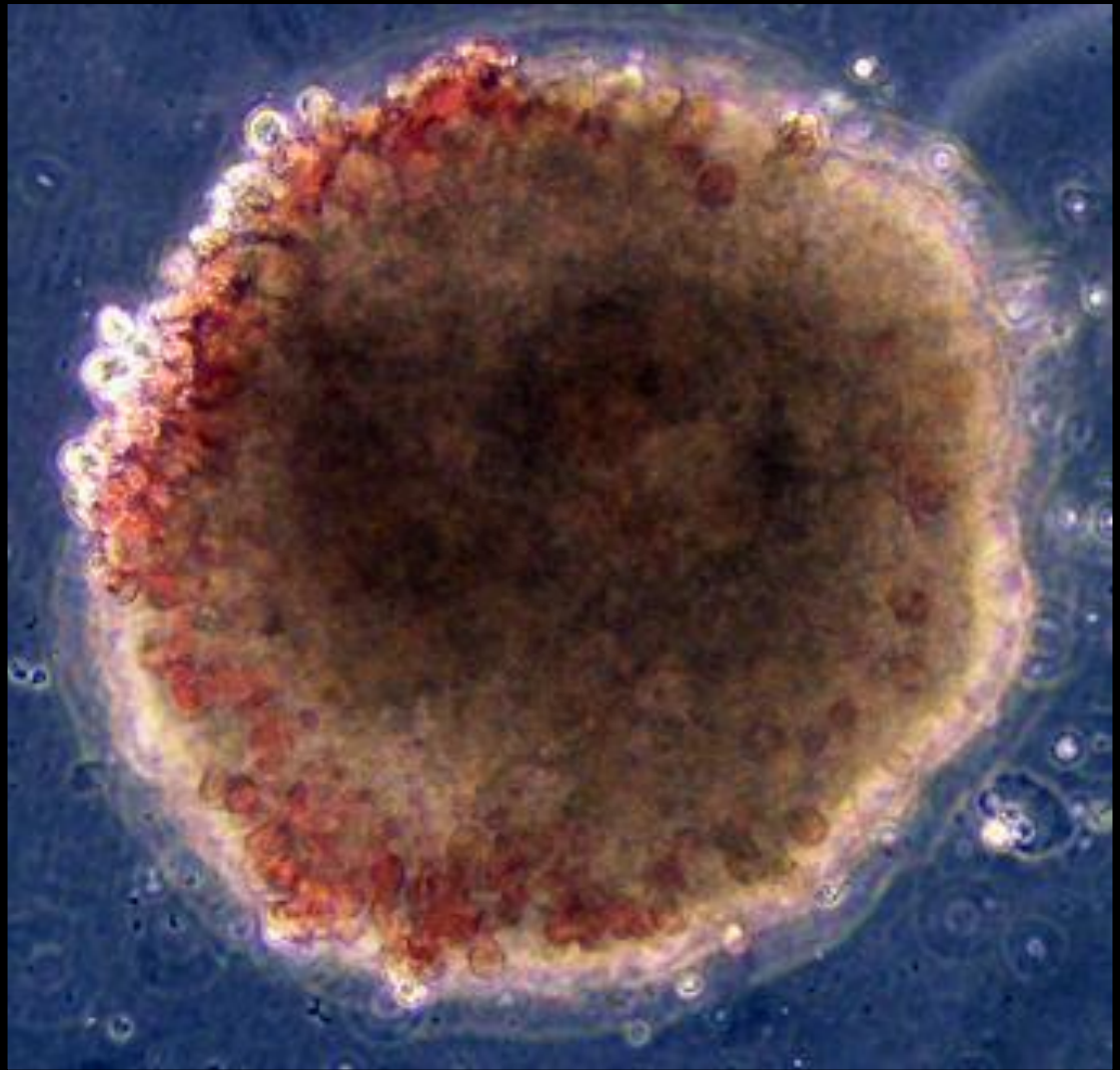
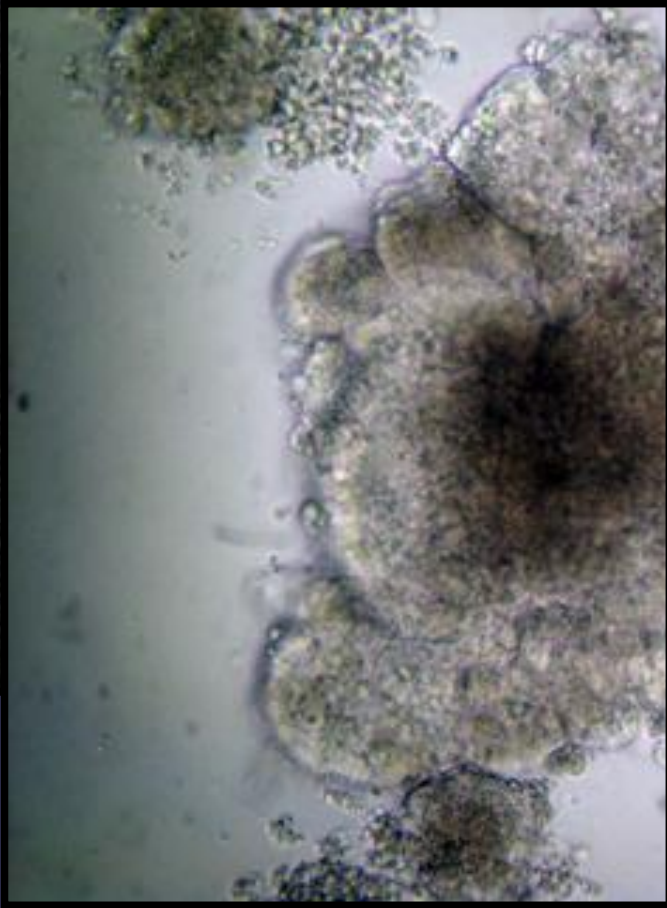
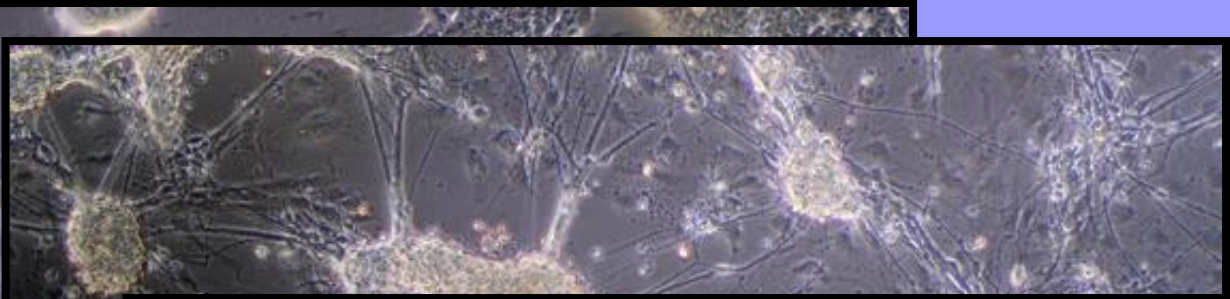
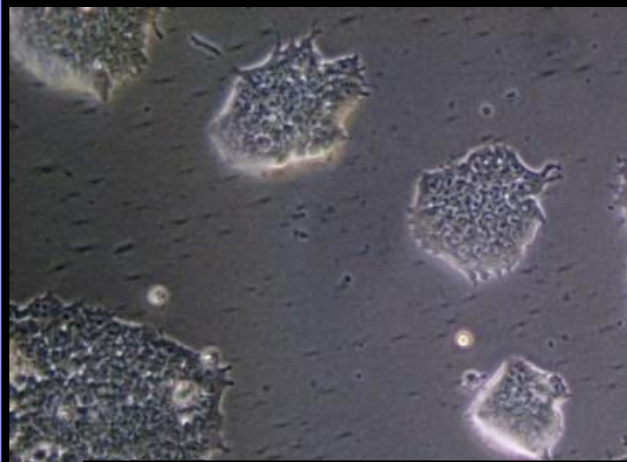
## Diferencované buňky EC monovrstva + RA - sérum



## Diferencované buňky EC monovrstva + RA + sérum



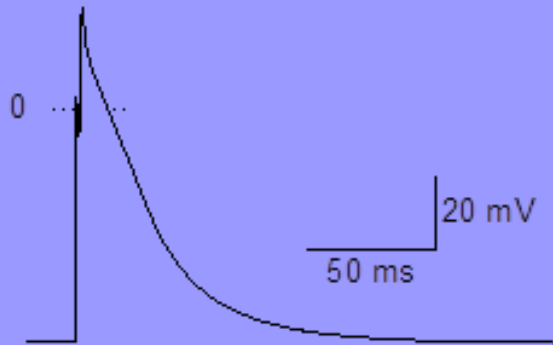




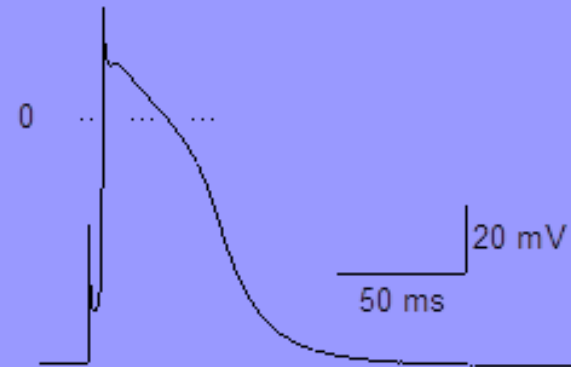


# Elektrofyzilogické parametry kardiomyocytů jako součást identifikace jejich fenotypu

Akční potenciál atriálního kardiomyocytu



Akční potenciál ventrikulárního kardiomyocytu



## Zdroje buněk v TC

### A) Tkáňová banka nebo darem

např. American Tissue Culture Colection ([www.atcc.com](http://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,..)

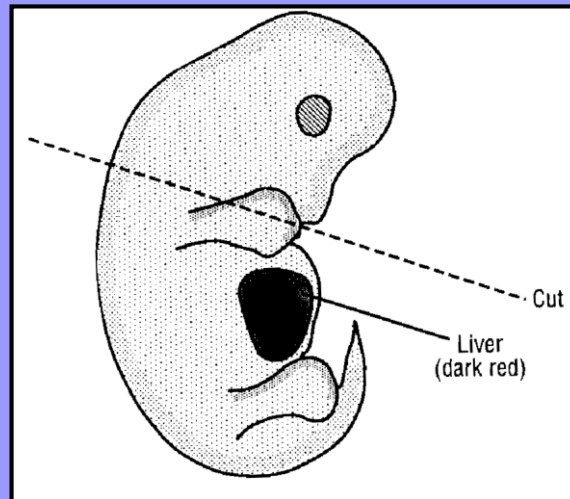
### C) Příprava primokultur z živočišných tkání

## Příprava myších embryonálních fibroblastů

MEF – mouse embryonic fibroblast

PEF – primordial embryonic fibroblast

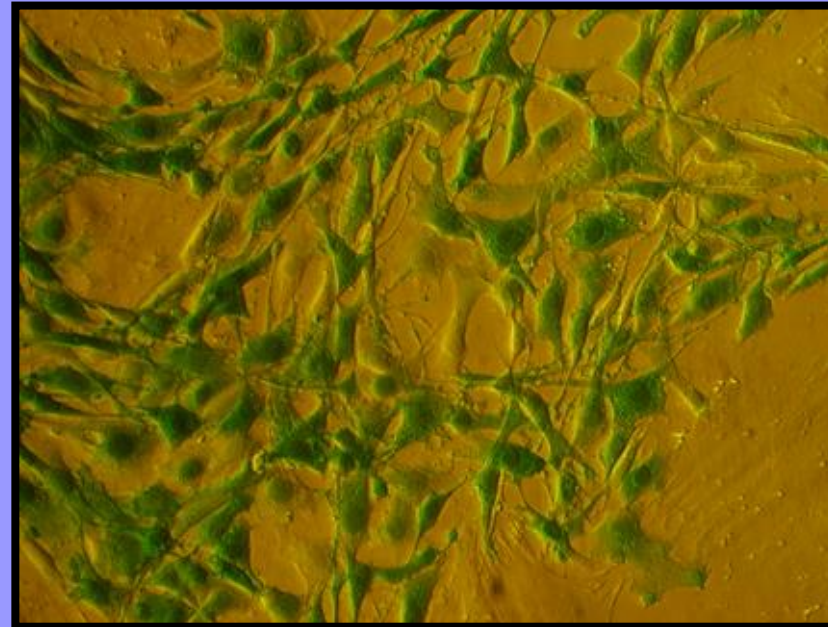
- Připravují se nejčastěji z 13.5 denních embryí (11-13.5 dpc.)
- Gravidní samice se usmrtí a vypreparuje se děloha s embryi
- Z embryí se odstraní hlava a vnitřní orgány
- Zbytek embrya se enzymaticky a mechanicky rozruší a po odstranění kompaktních zbytků, se suspenze vyseje na kultivační misku
- Rozrostlé 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

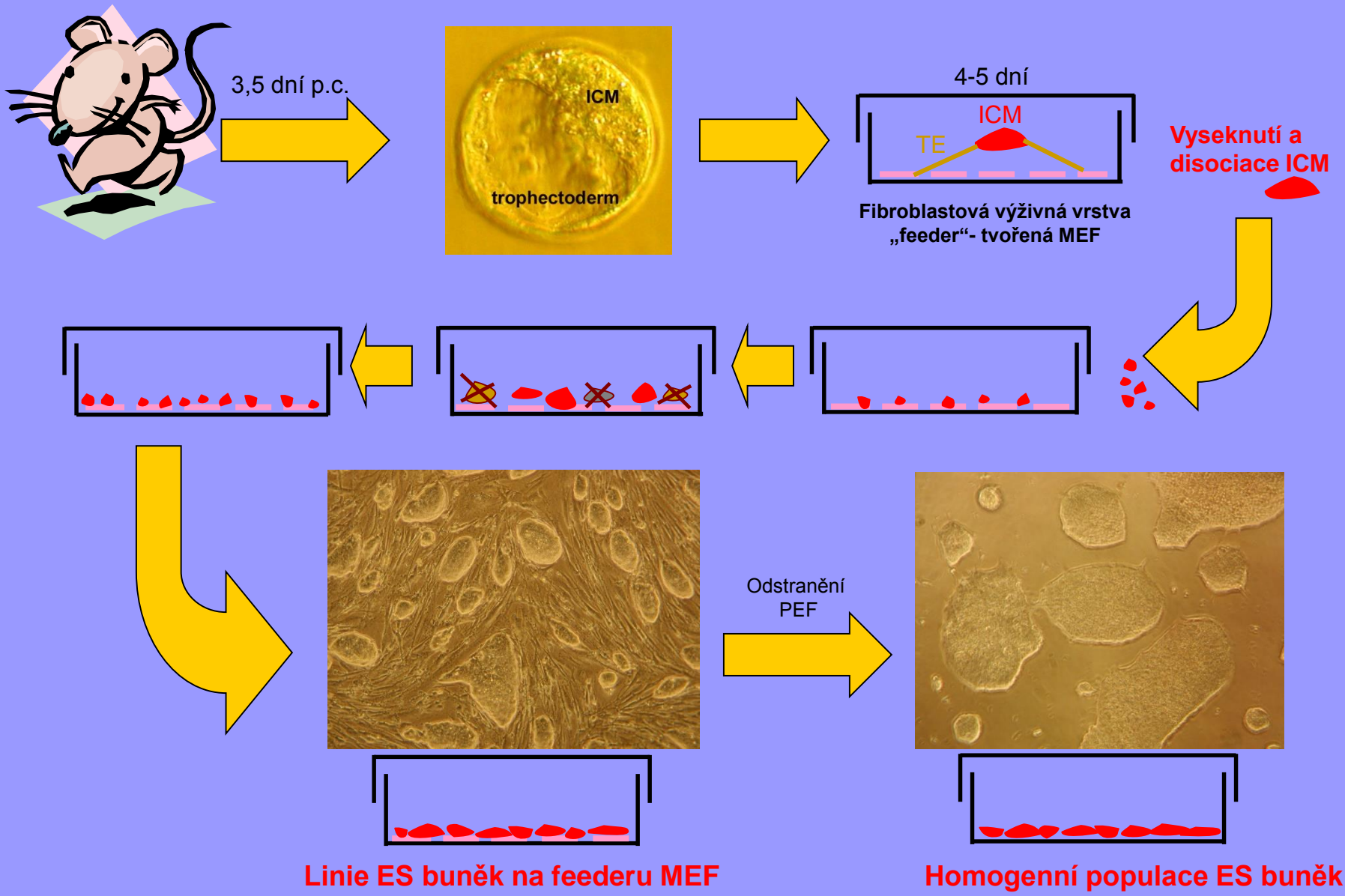
- Vypreparujeme stehenní kost, odstříhneme hlavice a propláchneme (např. injekční stříkačkou) vhodným kultivačním médiem do kutivační misky (Ize i kost navrtat a odsát (např. injekční stříkačkou) = možné autotransplantace).
- Po 24 hodinách kultivace odstraníme médium se zbylými krevními elementy opláchneme 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



Upraveno podle Kroupová 2004

## 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 přídavkem DMSO (5-10%)
- c) vzácně se sérem (10-20-50%) a přídavkem 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  $\text{N}_2$  ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) 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  $\text{N}_2$
- 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 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), pak na 3 hodiny do hlubokomrazícího boxu, následně k trvalému uchování
- Teplota nesmí kolísat, zejména k vyšším teplotám

## 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.



**Dewarovy nádoby**

## Přeprava buněk

- V zamraženém stavu v tekutém N<sub>2</sub> (v termosce, dálková, lokální přeprava)
- V zamraženém stavu v isolačním boxu se suchým ledem (CO<sub>2</sub>)  
(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

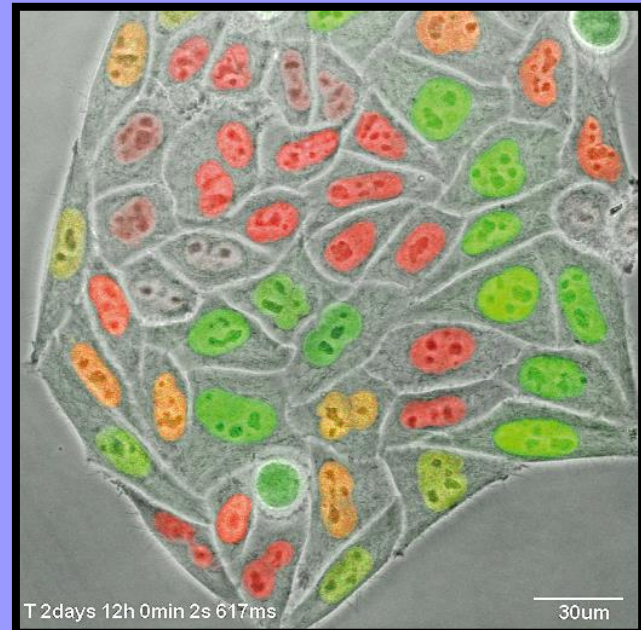
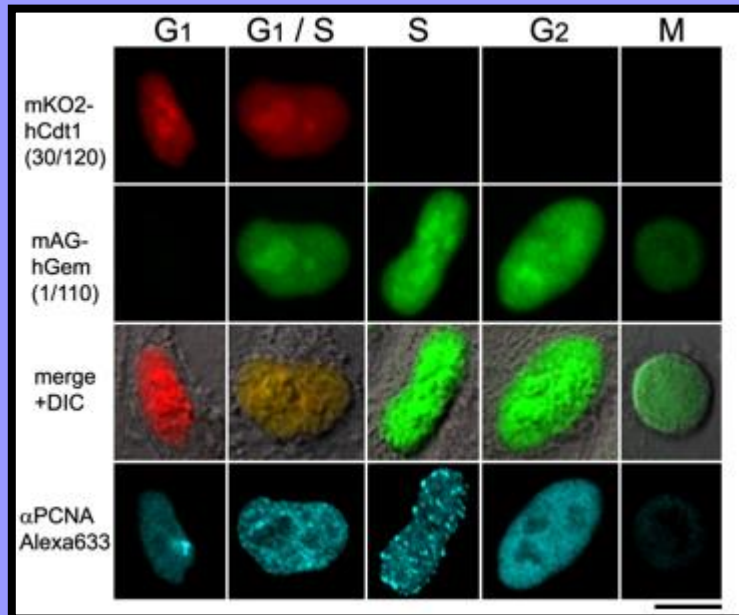
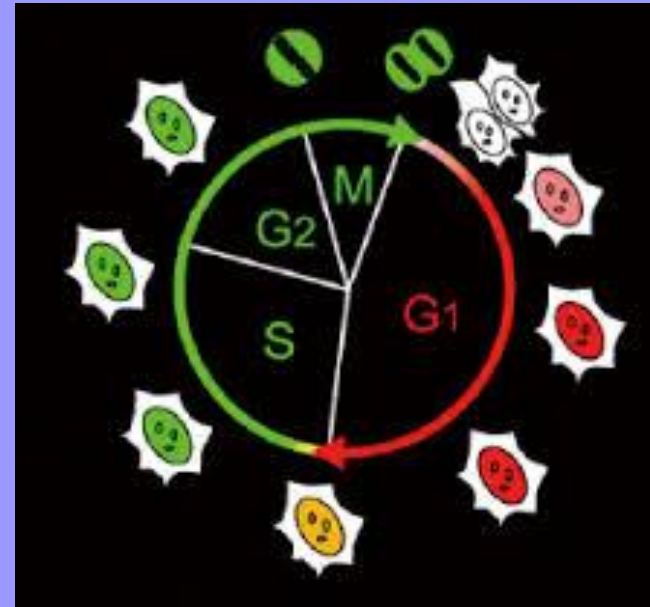
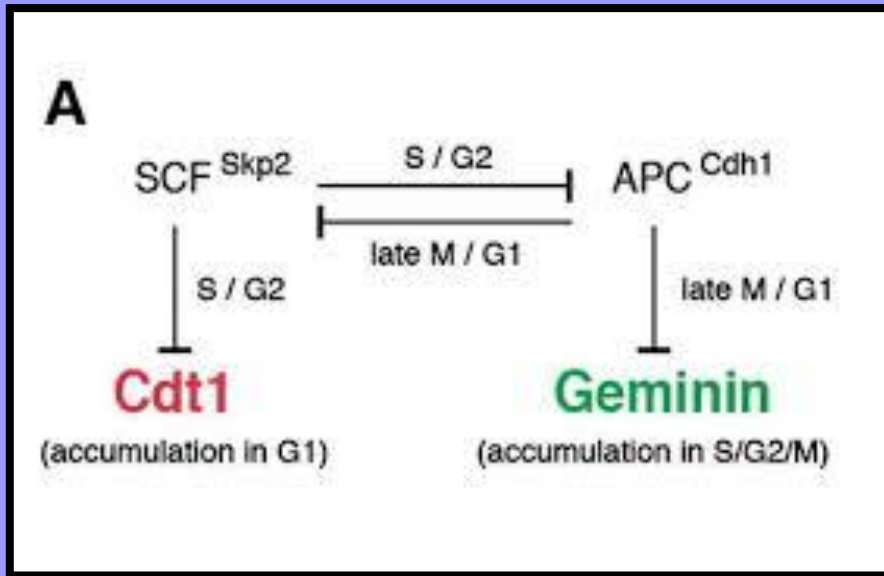
- Setřásání mitotických buněk u adherentních kultur
- Centrifugace (G0/G1 buňky jsou nejlehčí)
  - a) v gradientu
  - b) elutace (centrifugace s protiproudem média)
- FACS, sortování pomocí flow-cytometru
- Membránové vymývání (zdokonalená metoda setřásání)
- Kontaktní inhibice

## Chemické metody

- Deprivace odstraněním růstových faktorů (sérem)
- Deprivace odstraněním iso-leucinu z média
- Deprivace odstraněním  $\text{Ca}^{2+}$
- 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)

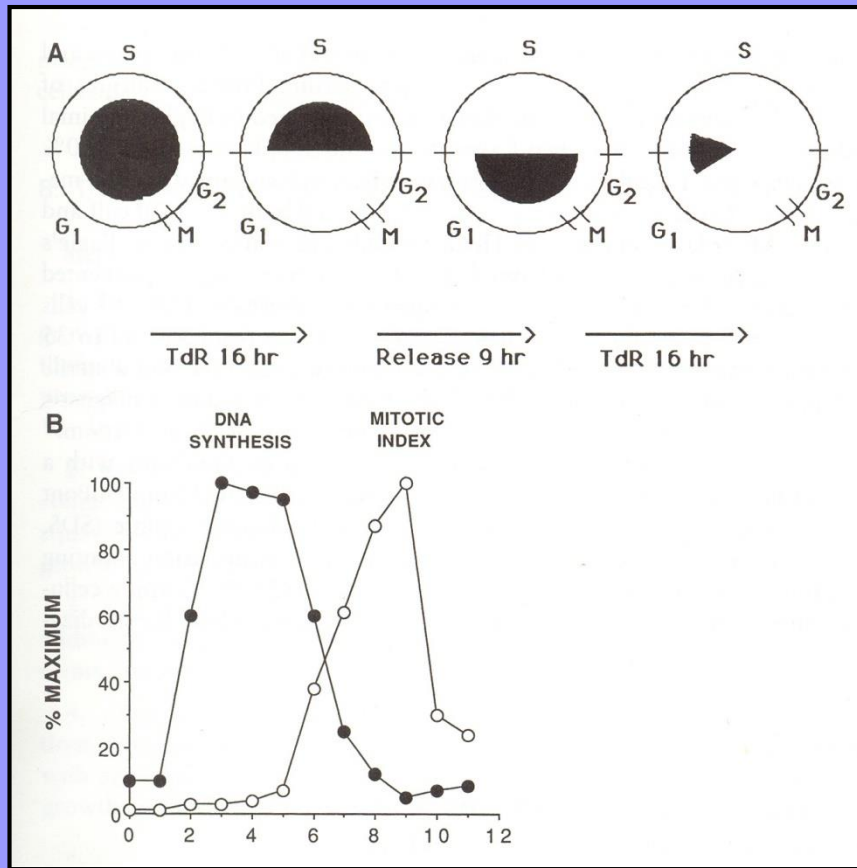






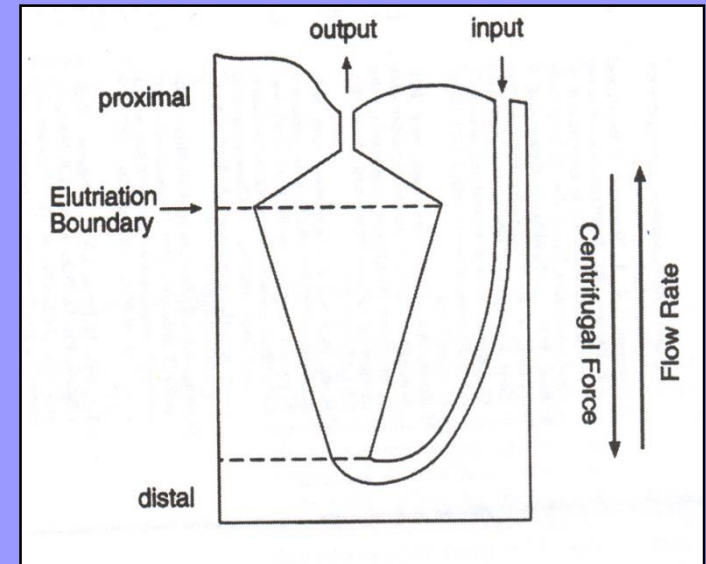
# Princip dvojitého bloku přidavkem nadbytku thymidinu

- 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

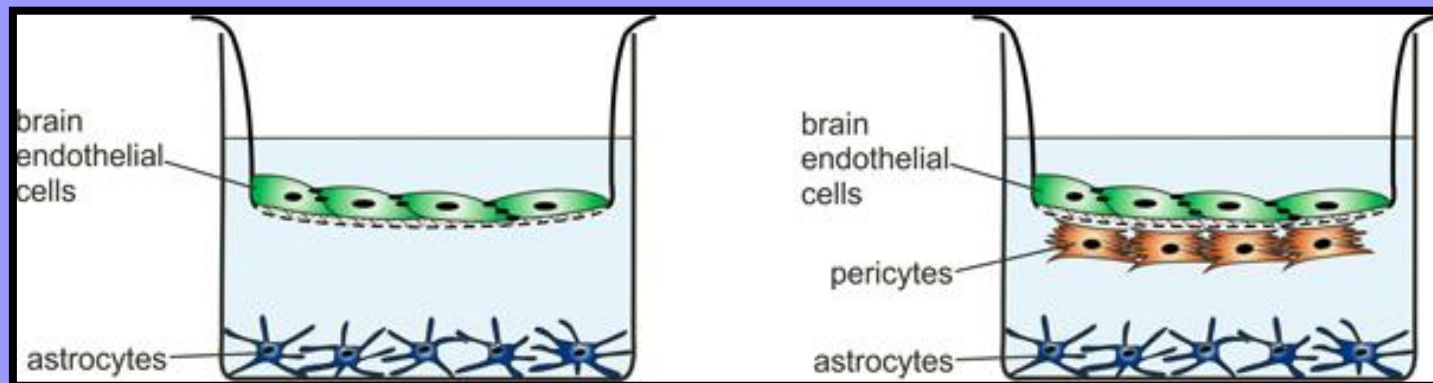
- Produkce růstových faktorů s parakrinním účinkem
- Vhodné mechanické vlastnosti podkladu atd.

### 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



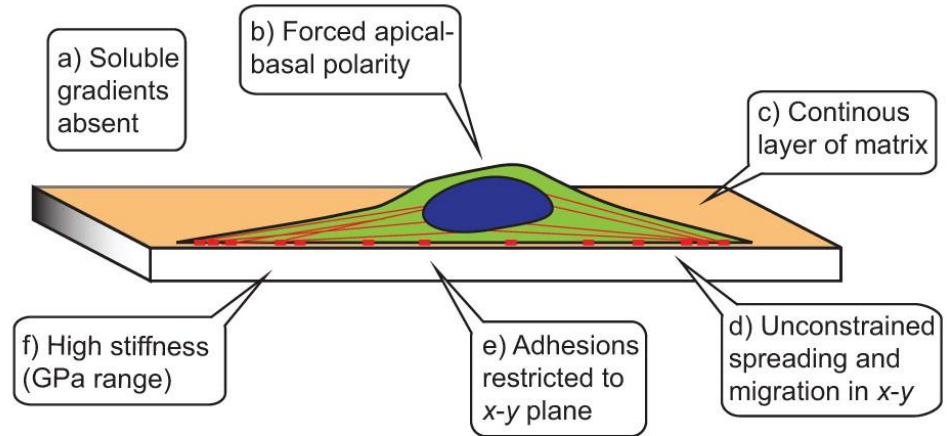
# 3-D kultivace

Dostupnost živin a odstraňování zplodin metabolismu je limitující, většina buněk v TK je předurčena určitému fenotypu ~ netvoří cévy

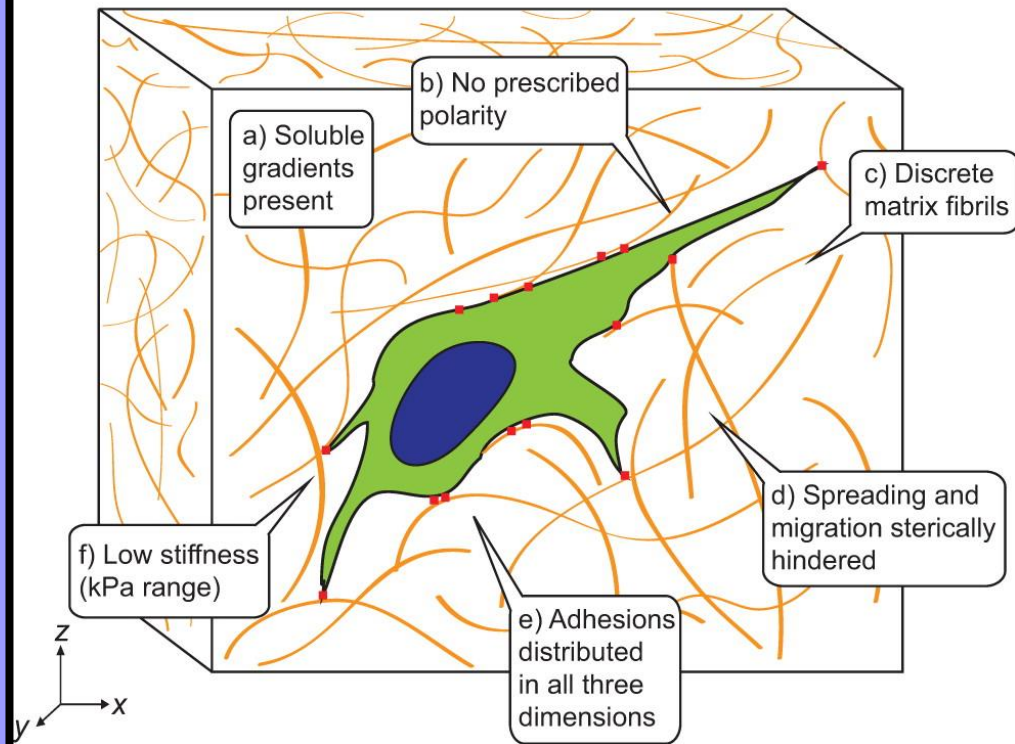
Difúzní koeficienty ( $\text{cm}^2 / \text{s}$ ) pro  $\text{O}_2$  a  $\text{CO}_2$  pro různé biologické materiály

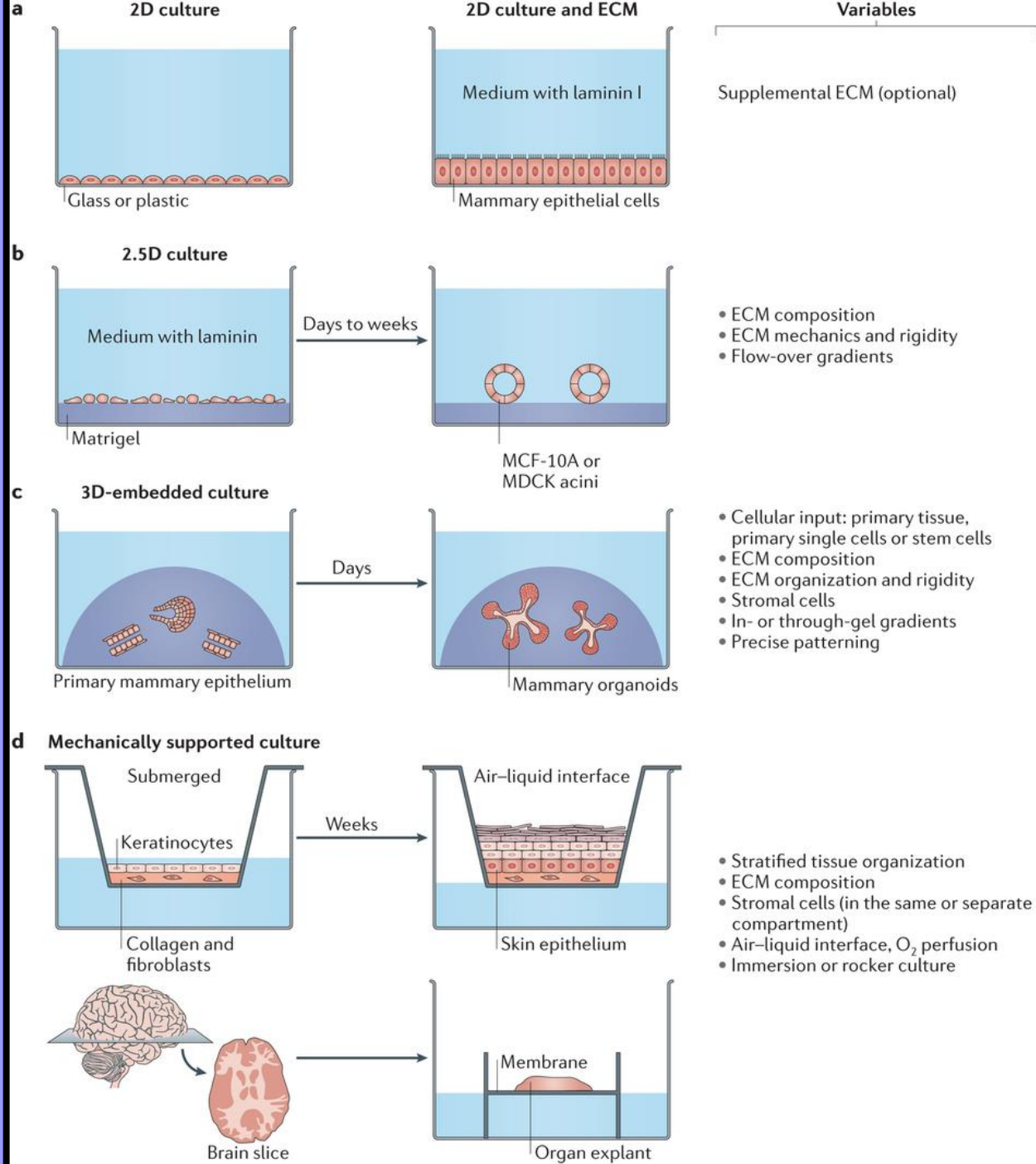
	$\text{O}_2$	$\text{CO}_2$
<b>vzduch</b> (0°C)	0,178	0,139
(20°C)	0,20	
<b>voda</b> (20°C)	$20 \times 10^{-6}$	$18 \times 10^{-6}$
(37°C)	$33 \times 10^{-6}$	
<b>lidské plíce</b> (37°C)	$23 \times 10^{-6}$	
<b>svaly</b> (20°C)	$14 \times 10^{-6}$	
<b>kůže mloka</b> (25°C)	$14 \times 10^{-6}$	
<b>pojivová tkáň</b> (20°C)	$12 \times 10^{-6}$	
<b>rosol žabího vajíčka</b> (20°C)	$10,2 \times 10^{-6}$	
<b>obal žraločího vajíčka</b> (15°C)	$3,0 \times 10^{-6}$	
<b>kůže úhoře</b> (14°C)	$2,4 \times 10^{-6}$	
<b>obal lososí jikry</b> (5-15°C)	$1,8 \times 10^{-6}$	
<b>Chitin</b> (20°C)	$0,7 \times 10^{-6}$	

## Collagen-coated glass (2D)



## Collagen gel (3D)

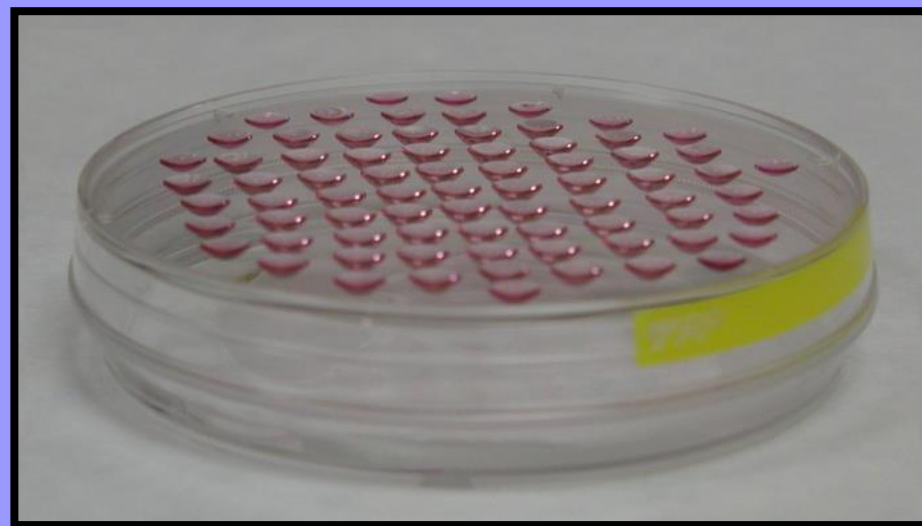
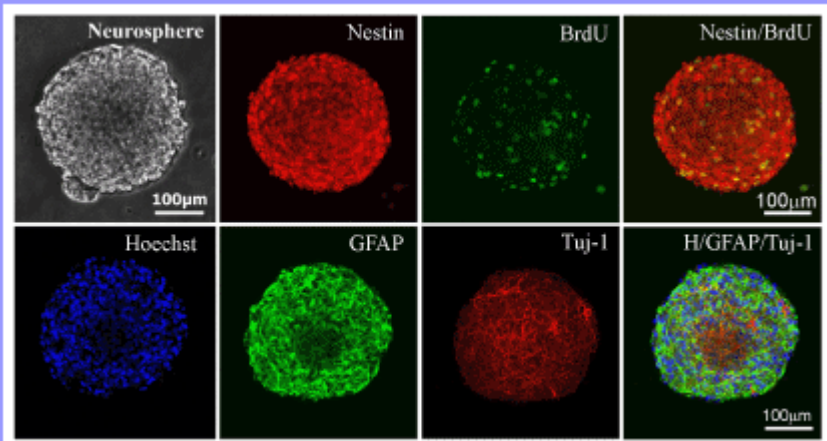


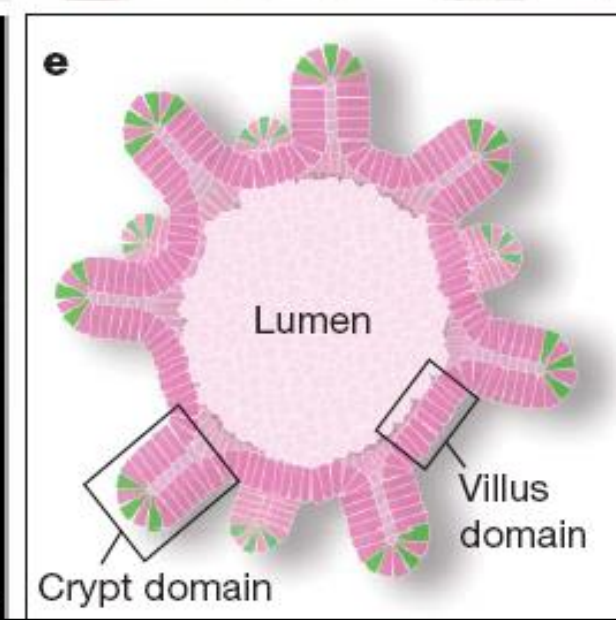
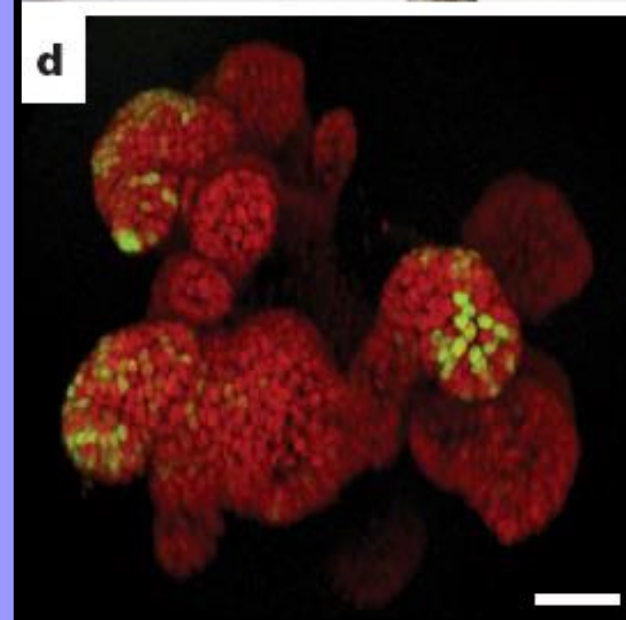
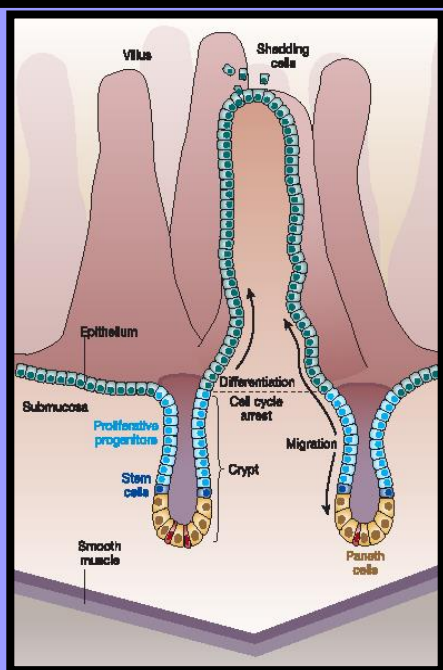
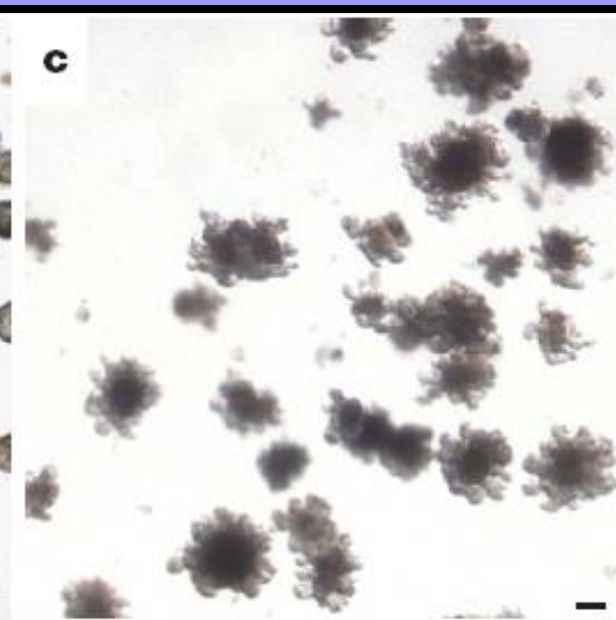
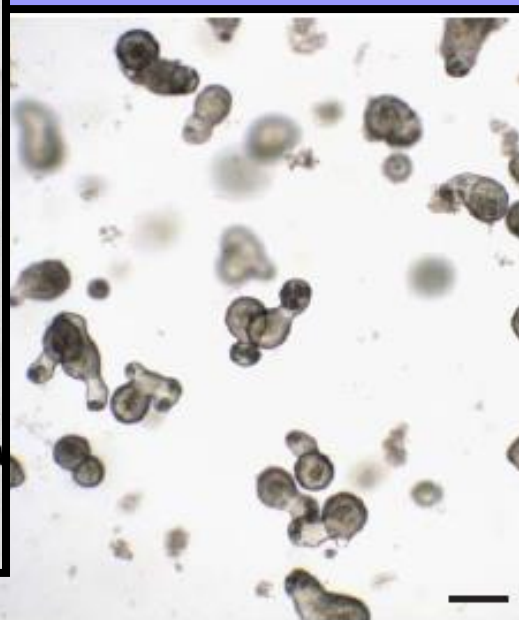
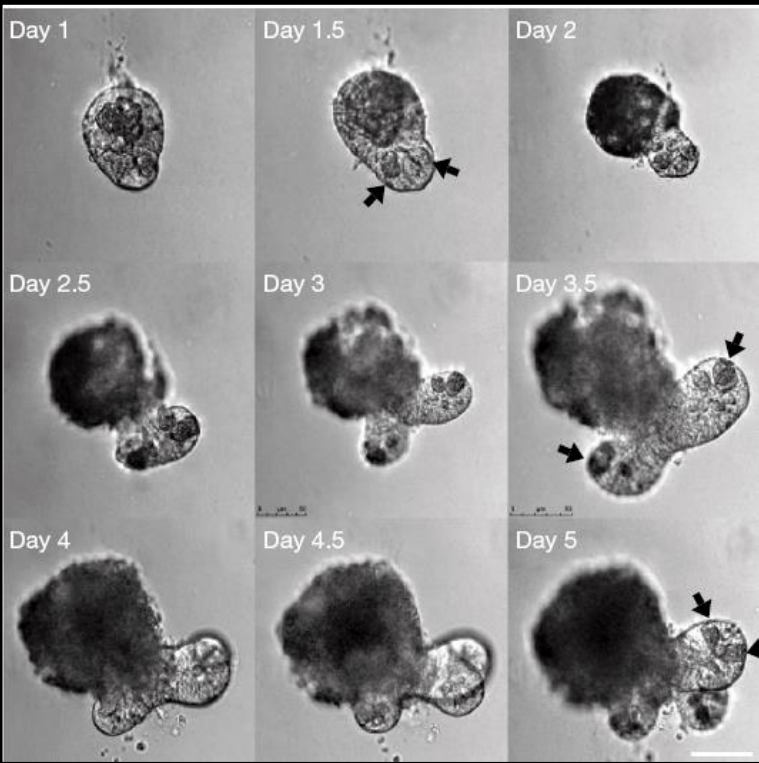




# Sféroidy & Organoidy

*neurosféry*  
*mamosféry*  
*embryoidní tělíska*

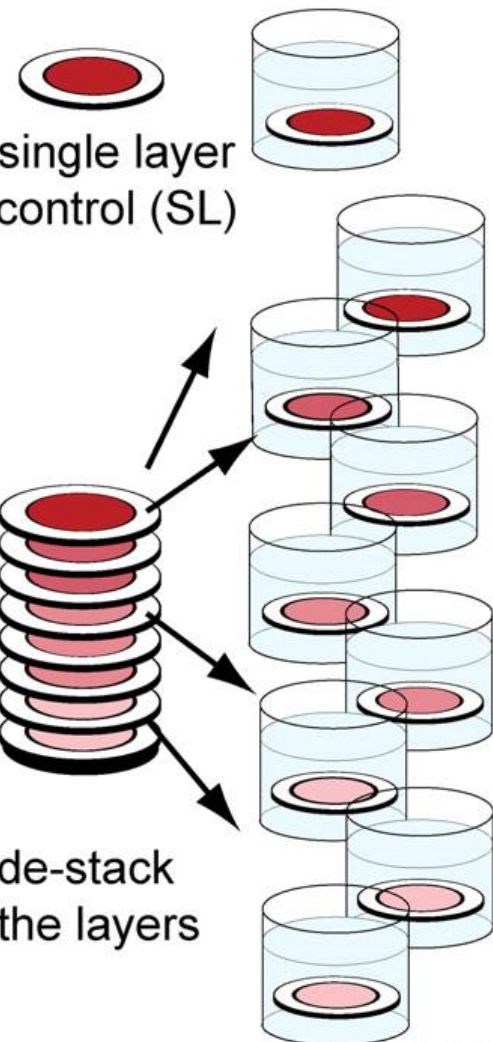




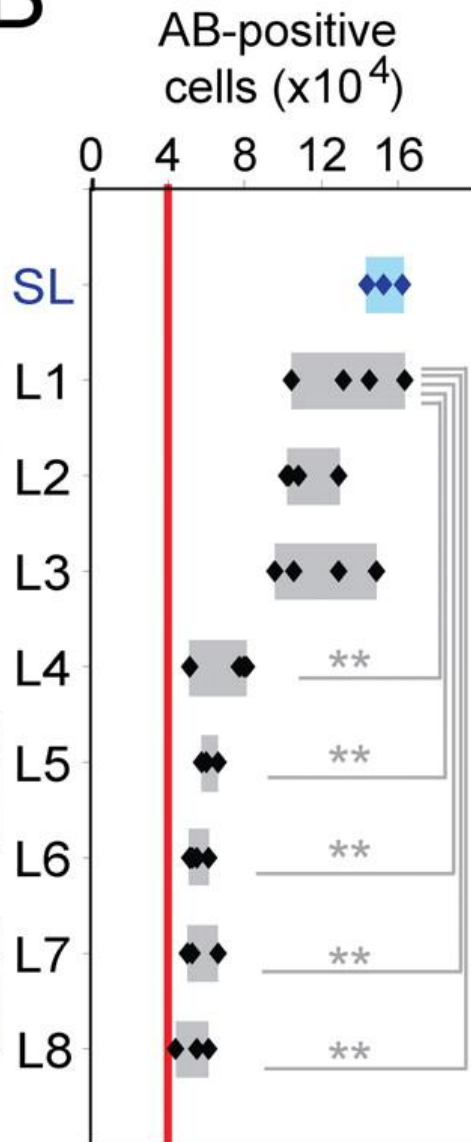


Kultivace na propustných a porézných materiálech

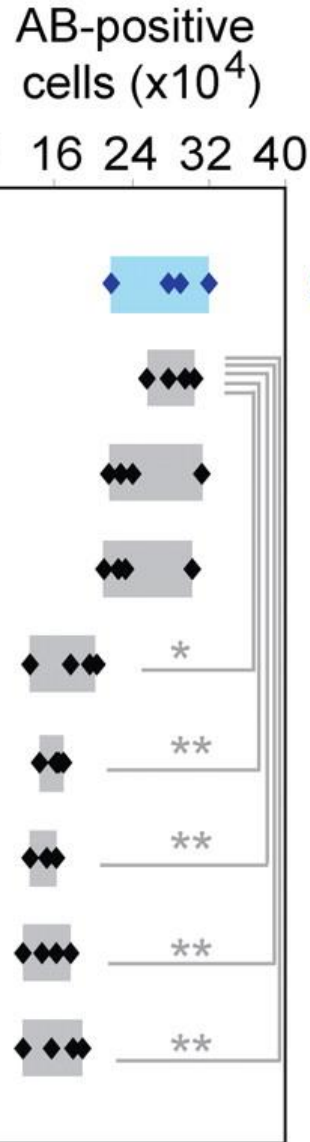
**A**



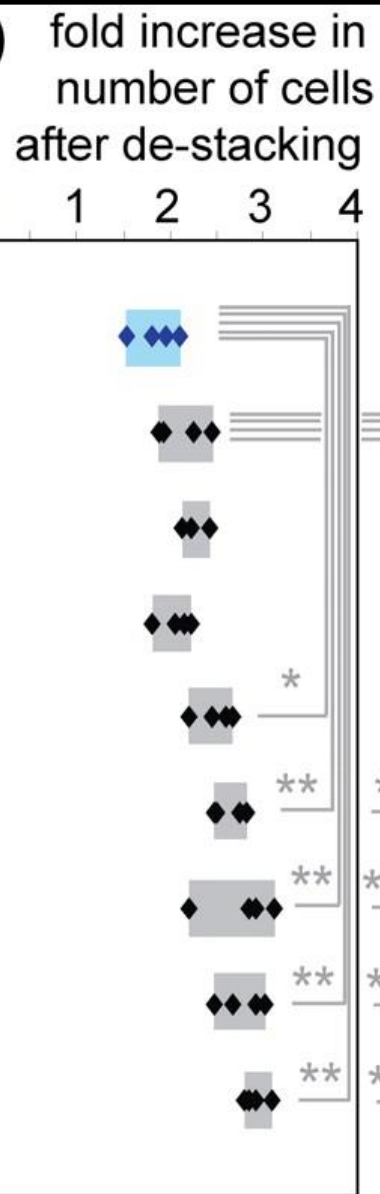
**B**



**C**



**D**



4 h after de-stacking and 4 days later

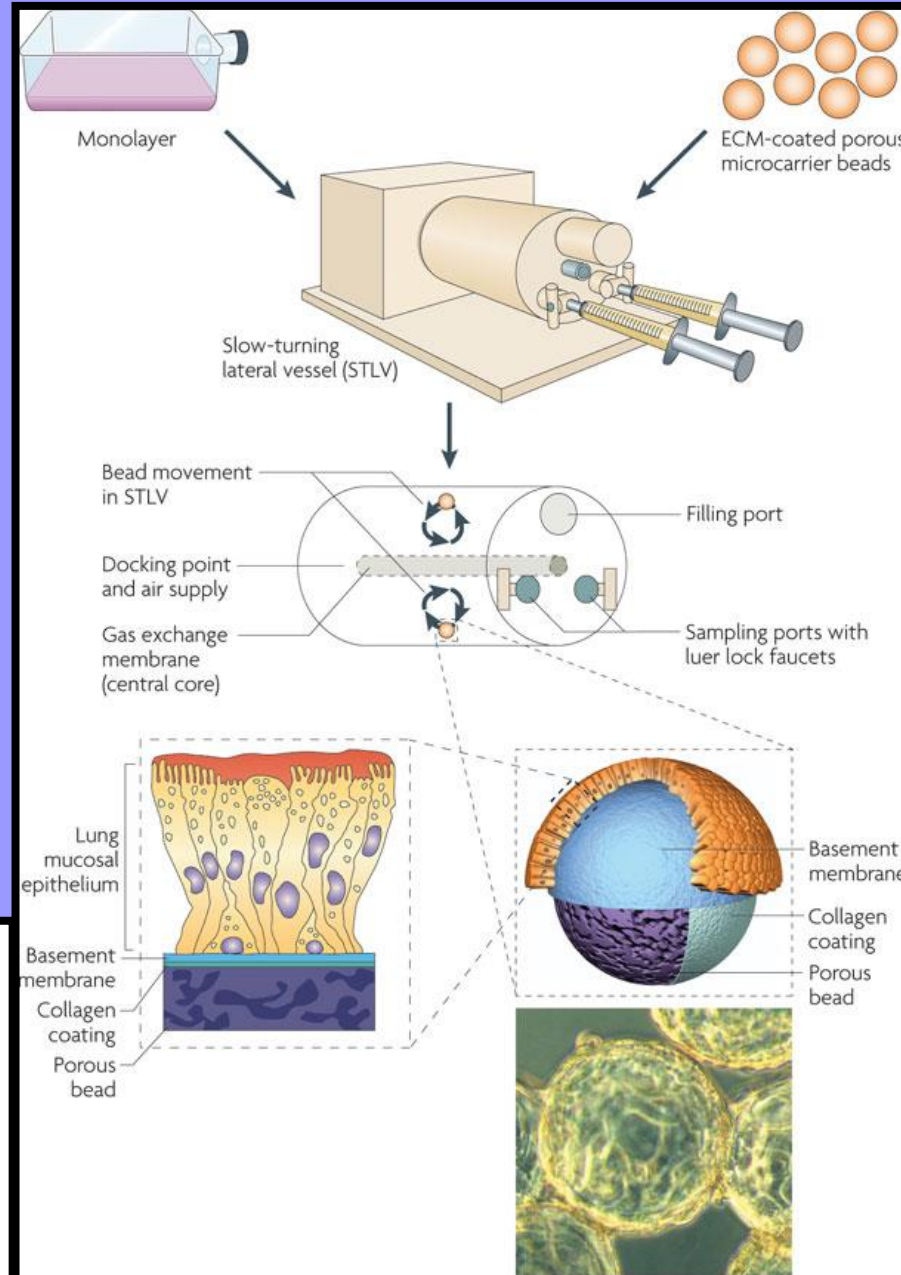
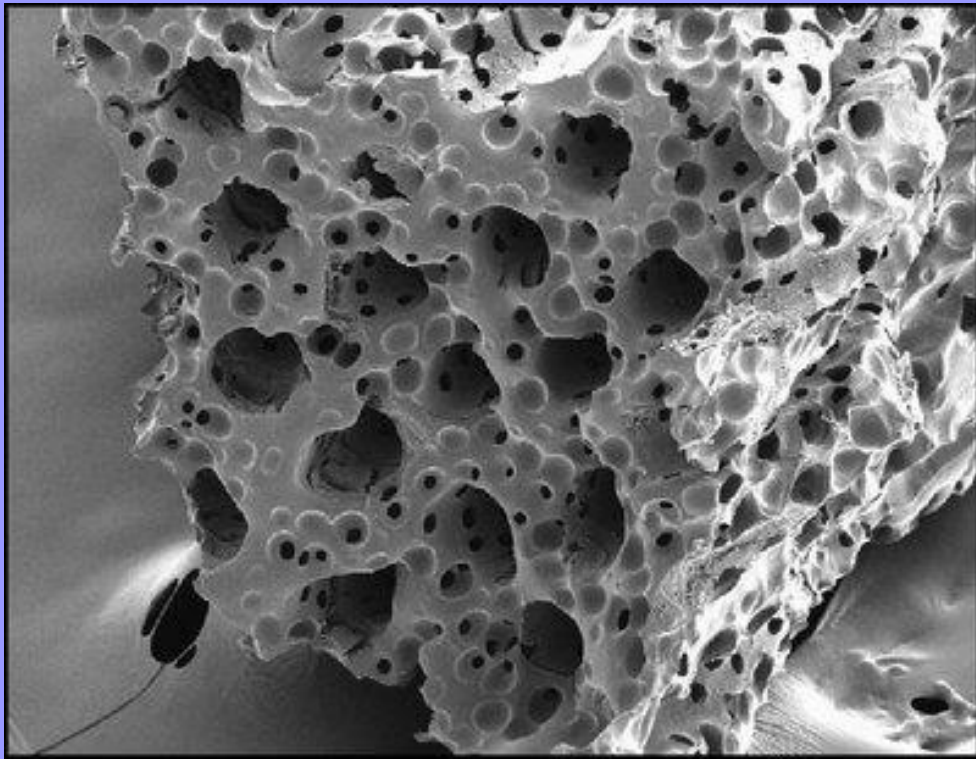


Figure 1b: Cell sheet engineering-- using temperature-responsive polymer.

# Imortalizace buněk

Proč?

- převedení primokultur v permanentní linie
- zjednodušení kultivačních podmínek

a) Spontánně – pomalé, často málo účinné

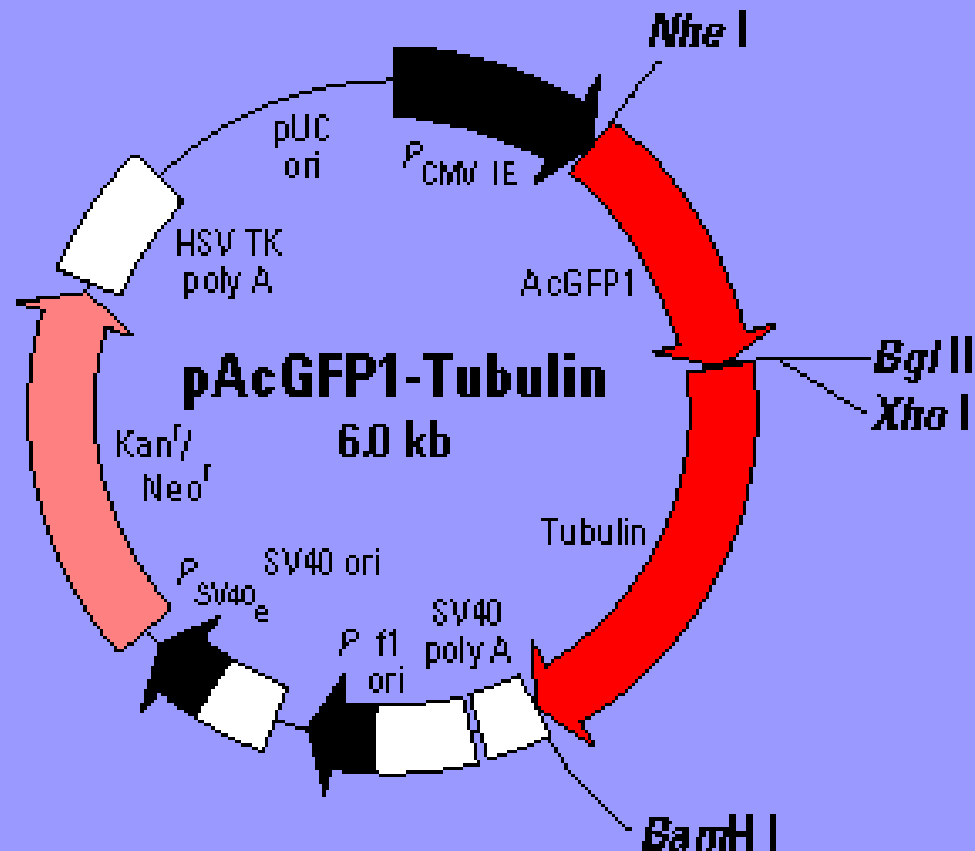
b) Cíleně

- fyzikálními faktory: Gama záření, Rentgenové záření (záření X), teplota
- chemickými faktory: NiCl, NiSO<sub>4</sub>, 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
  - $\text{Ca}^{2+}$  precipitace: vysrážení vektoru na povrchu buněk v komplexu s  $\text{Ca}^{2+}$  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

**Suspenzní 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 CO<sub>2</sub>. 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 (Langernhansových 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.