

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, vibrace,...

- dodržet podmínky na které jsou buňky zvyklé/přizpůsobené

TEPLOTA

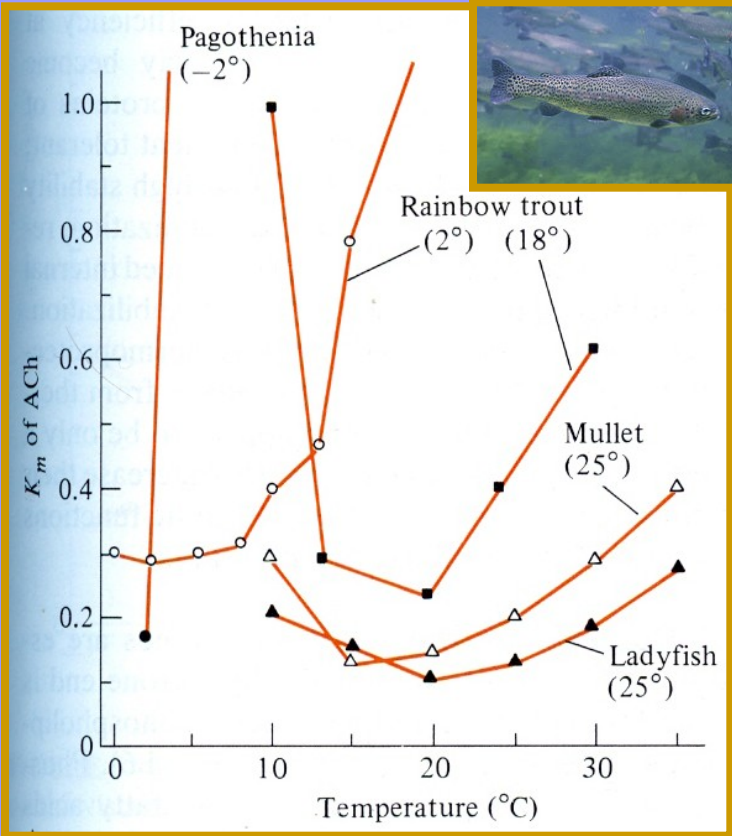
Buňky se kultivují při optimální teplotě pro organismus, z kterého byly izolovány. Pro buněčné linie odvozené od člověka a běžných laboratorních zvířat (myš, krysa, makak, pes,..) je to většinou 37°C. Pro buněčné linie odvozené od poikilotermních živočichů (ryby, hmyz, hád'átko - *Caenorhabditis*) od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





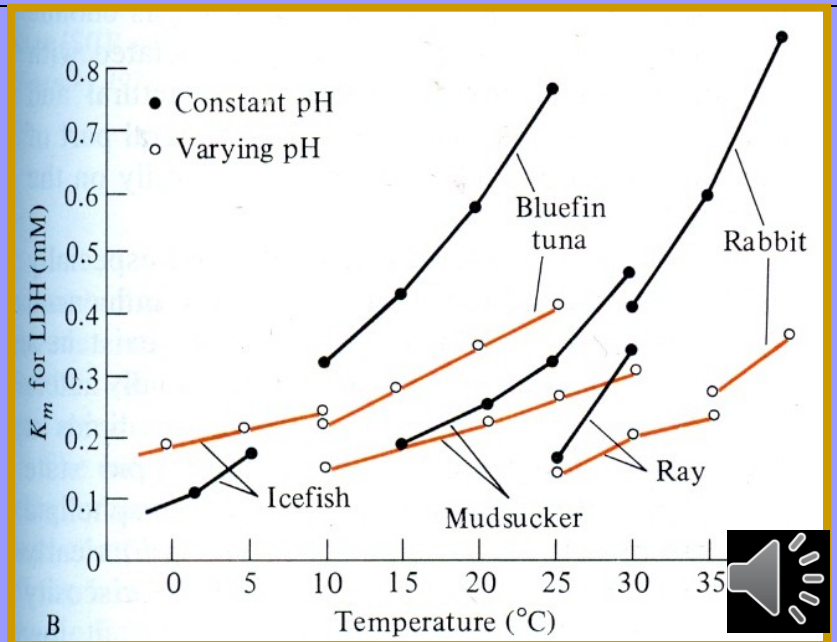
Teplota modifikuje biochemické děje

- 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!



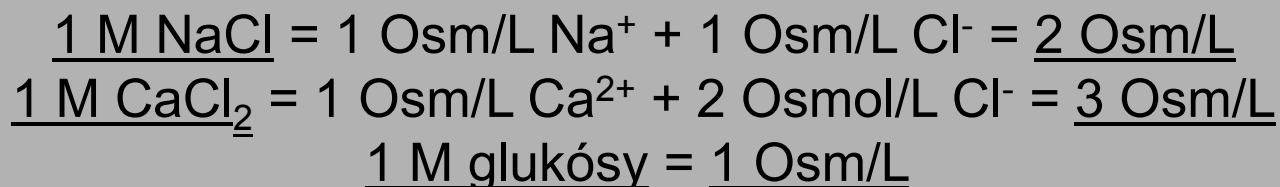
Na **CHEMICKÉ** faktory lze nahlížet jako na média (jejich komponenty) v kterých buňky rostou a plyny, které tato média obklopují případně jsou v nich rozpuštěny.

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)	75	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)	154	141	0.916
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180	4500	
Phenol Red	376.4	16	



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) **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 μ M in cell culture medium (DMEM)



pH 6,0

6,2

6,3

6,4

6,5

6,6



pH 6,7

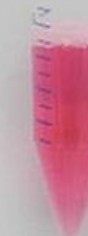
6,8

6,9

7,0

7,1

7,2



pH 7,3

7,4

7,5

7,6

7,7

8,0



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 $\sim \frac{1}{2}$ 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**
- **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 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 preventivně *Penicilin/Streptomycin* nebo *Gentamycin*,
léčení a speciální aplikace *Tetracyklin* , *Sparfloxacin*,...

b) Selekční (viz. Příprava transgenních linií)

Geneticin (G418), *Hygromycin*, *Puromycin*

c) Speciální

Mitomycin C (- blokuje replikaci DNA, DNA crosslinker)



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, 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+ ... grampozitivní bakterie

G- ... gramnegativní 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

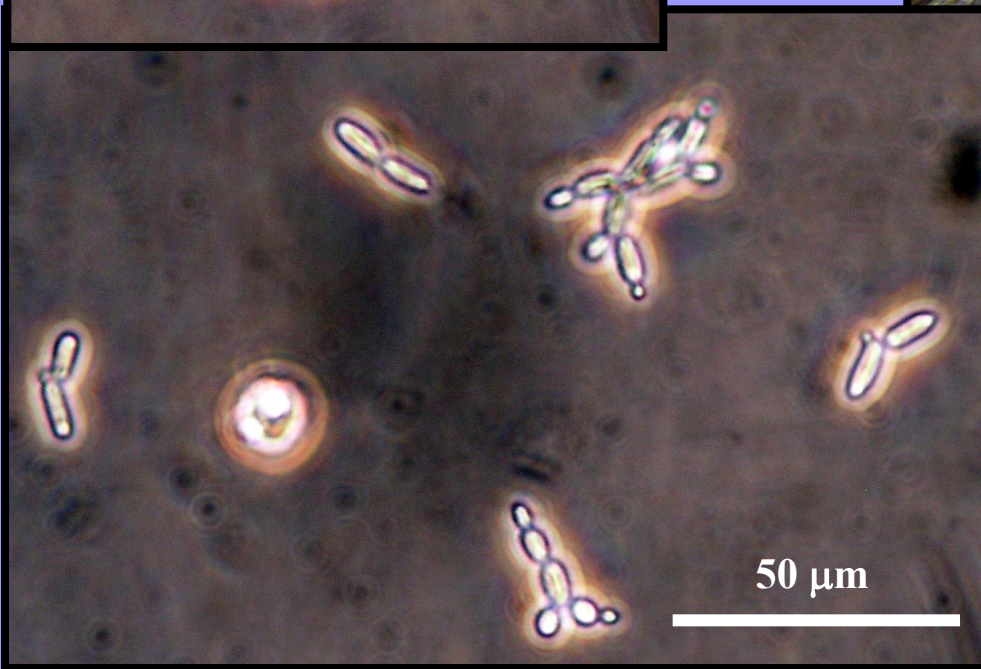
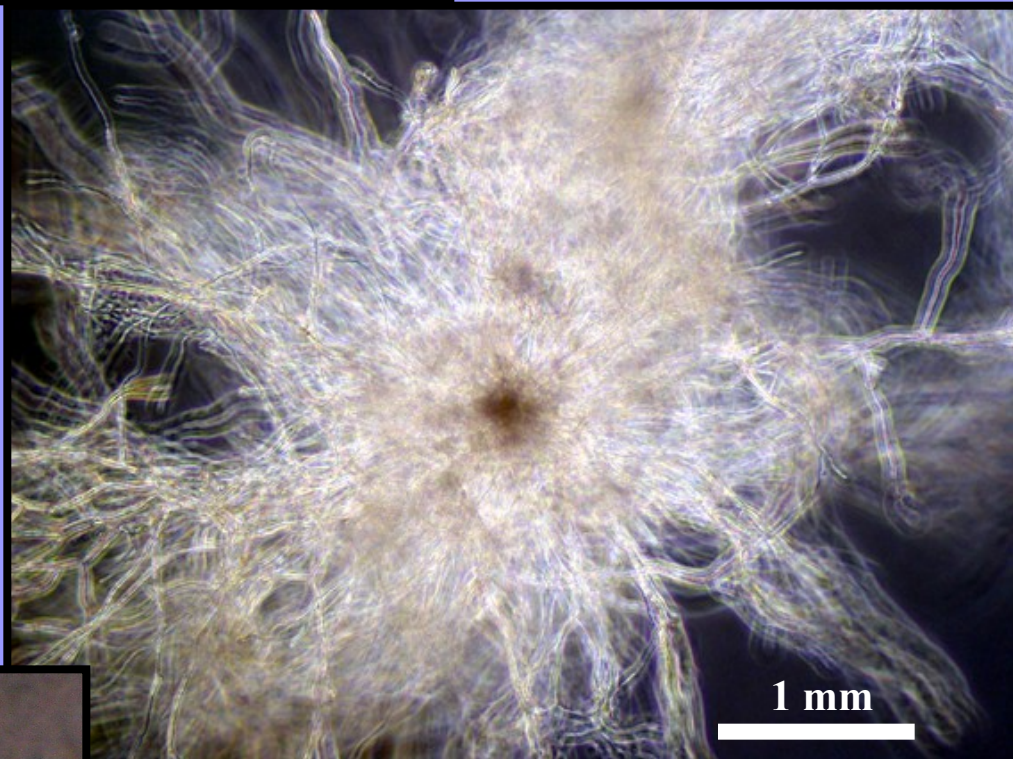
- **Likvidace zasažené kultury**
- **Kombinací antibiotik**
- **Kultivací buněk v kompatibilním organismu**
(např. v břišní dutině = ascites)



?



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

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

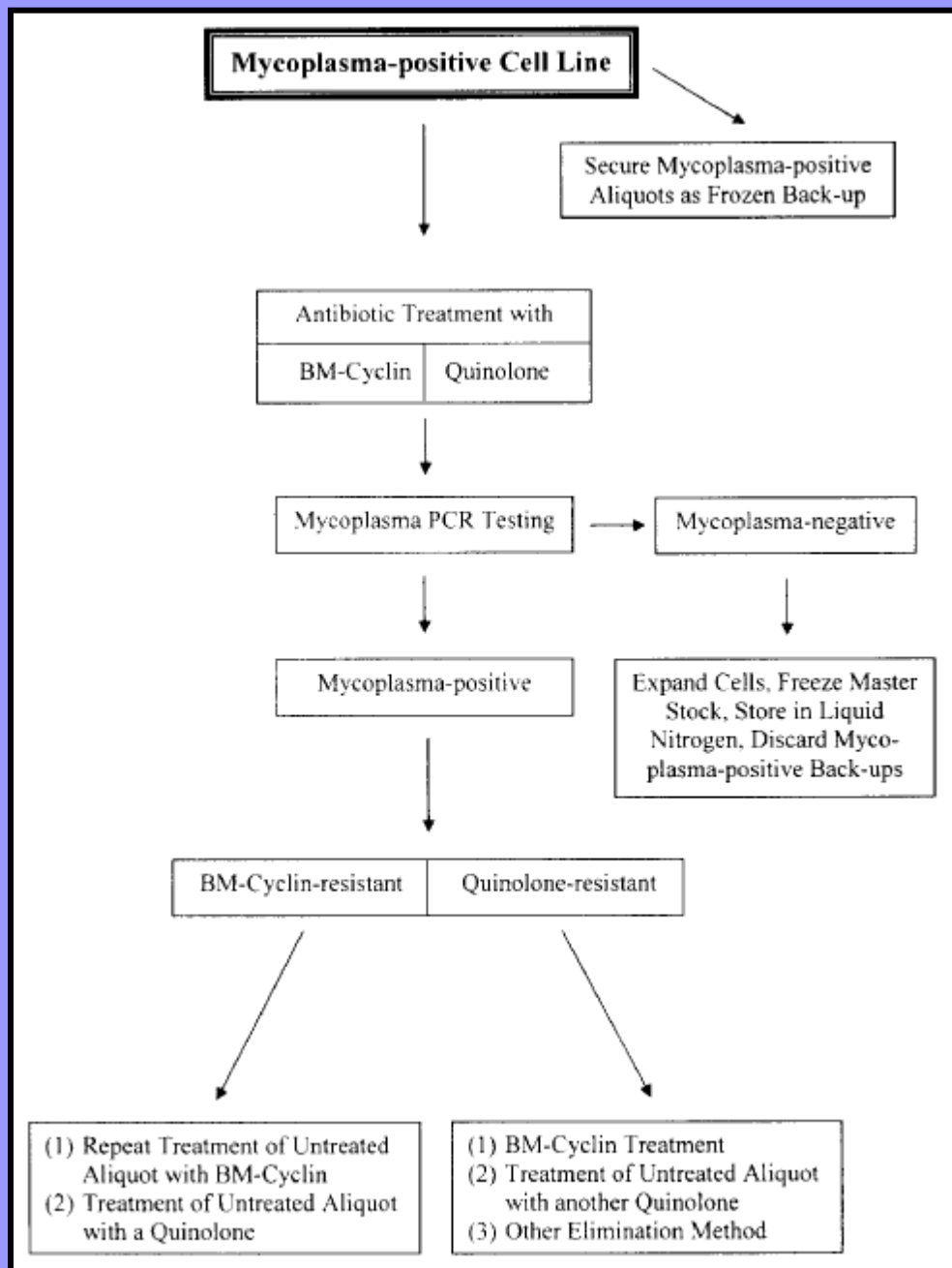
Shimizu, T., Nagatomo, H., and Nagahama, K. Zentralblatt fur Bakteriologie (1990), Supplement 20, 950-952.

Survival of MS under Various Conditions

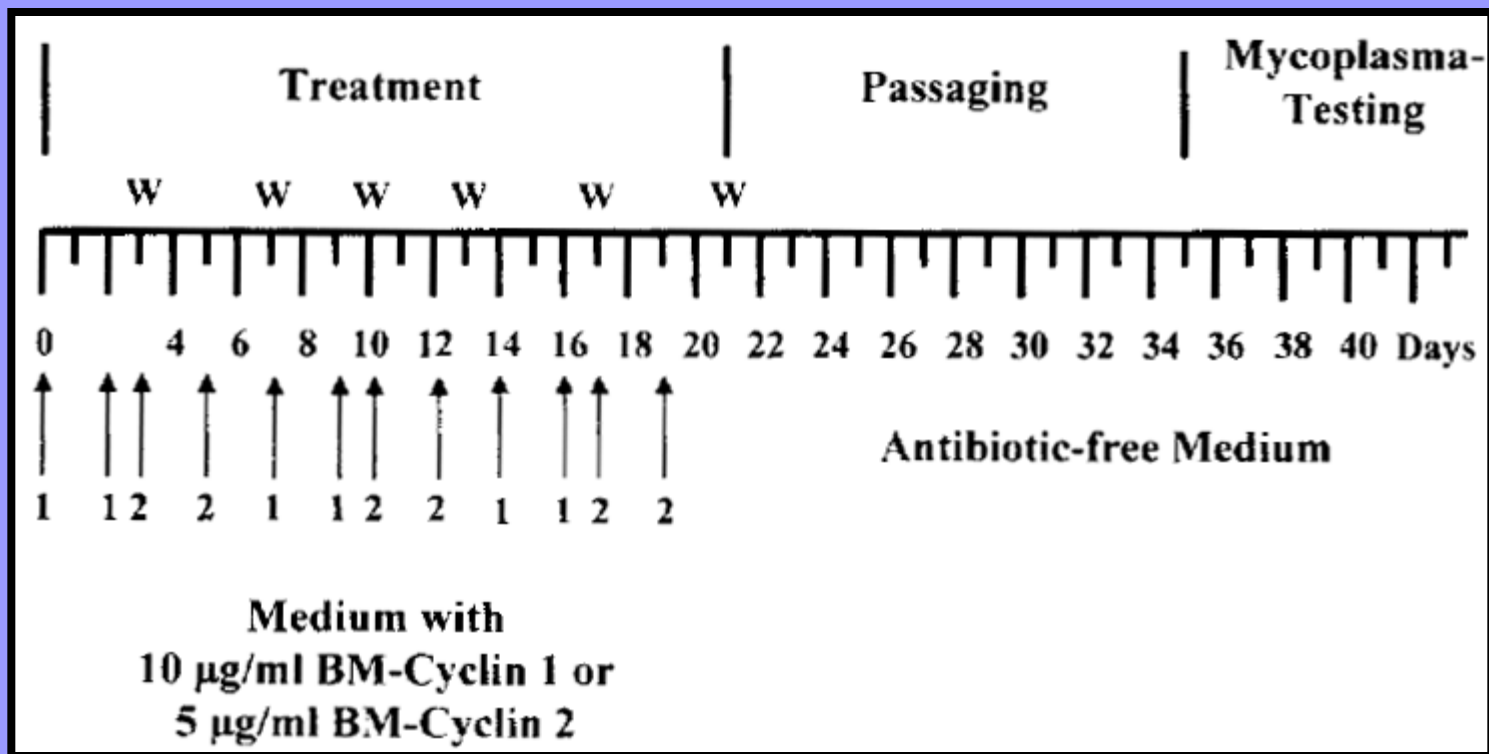
Sunlight	30 to 120 min
UV light	30 - 60 min
Well water with 1% serum	1 - 2 days
Well water	1 - 2 days
50% soil extract	1 - 2 days
Dry at 4° C	51 - 77 days
Dry at 20° C	10 - 21 days



Obecné schéma léčení buněčných linií v LTK na mycoplasmata

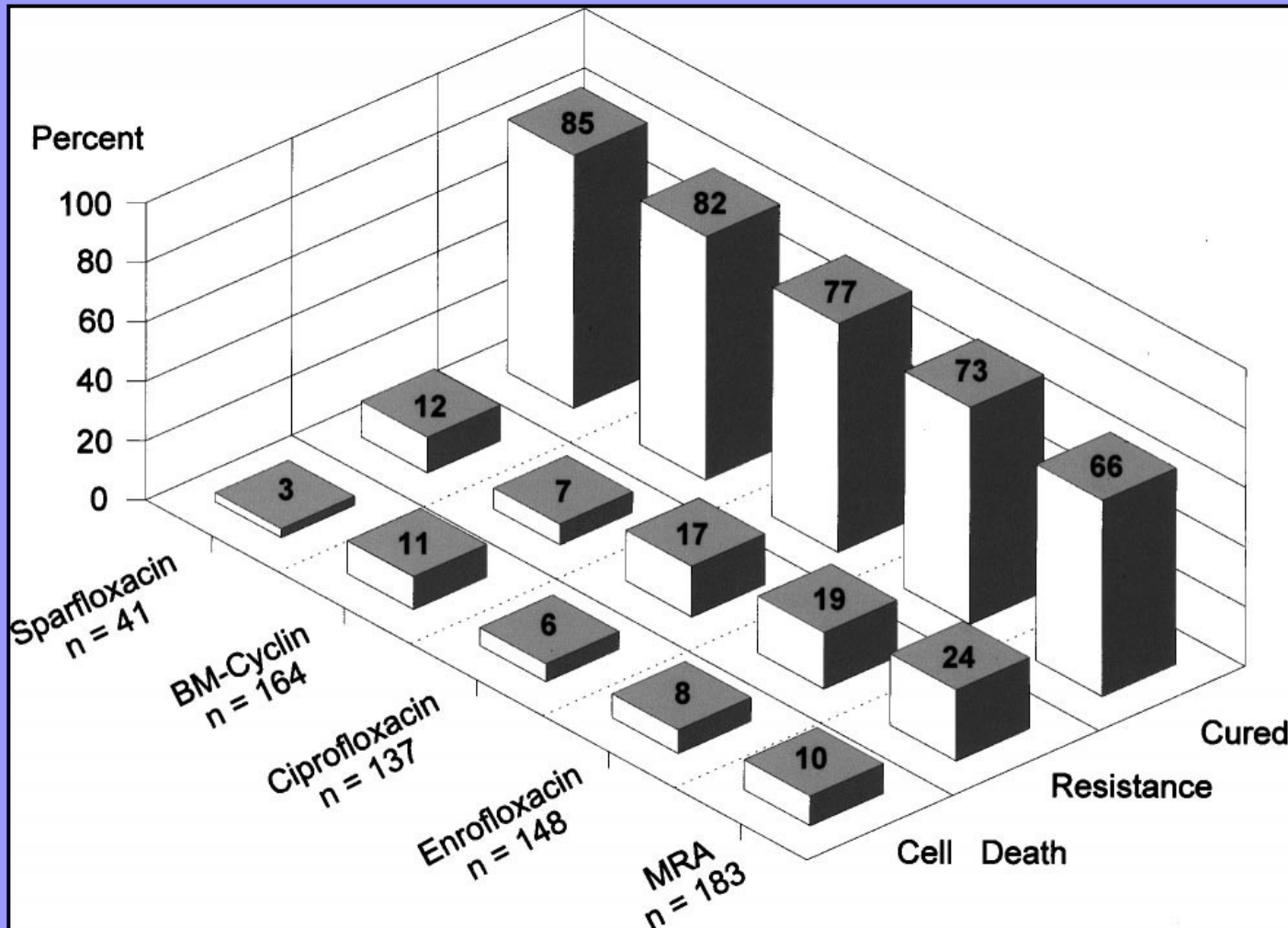


Příklad postupu léčení buněčné kultury na mycoplasmata přípravkem BM-cyclin fy Roche



Účinnost komerčně dostupných antibiotik v léčení kultur napadených mycolpasmaty

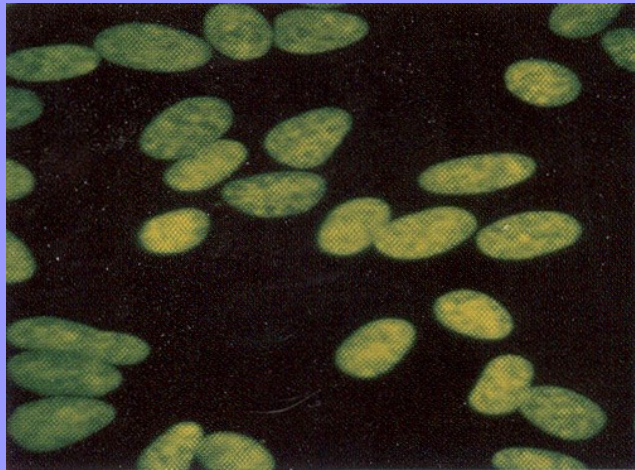
Uphoff & Drexler 2001



n – počet testovaných buněčných linií

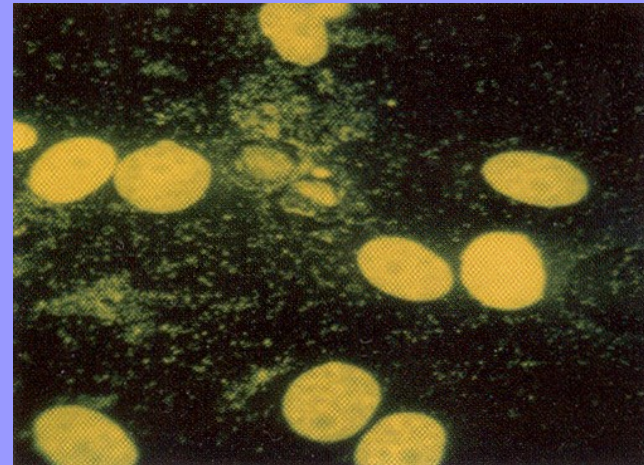


Zdravá buněčná kultura



(vitální barvení pomocí Hoechst 33258)

Buněčná kultura infikovaná mycoplasmaty



MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit



MycoZap™ Mycoplasma Elimination Reagent



Základní vybavení laboratoře tkáňových kultur



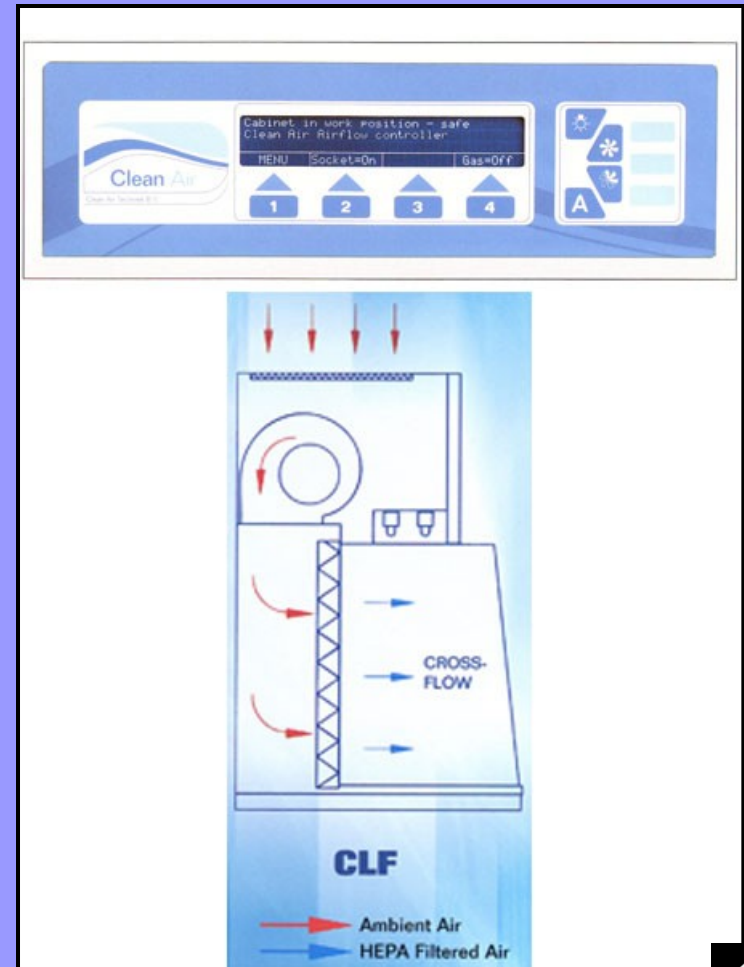
CO₂ inkubátor



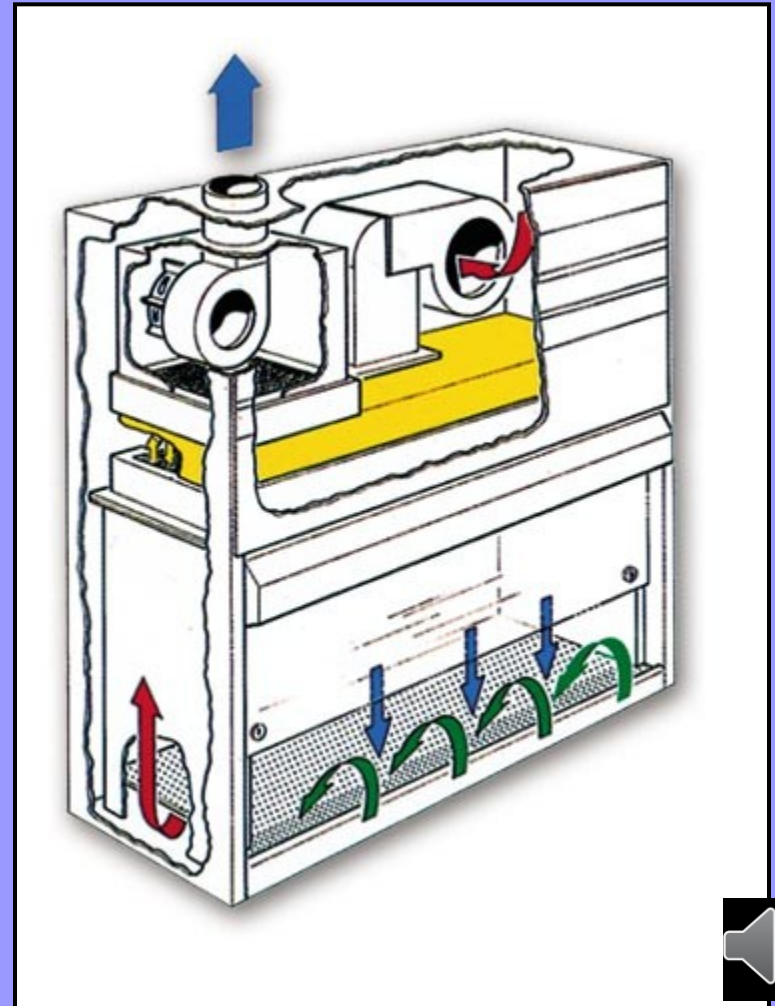
Inverzní mikroskop



Flow-box / laminární box - základní

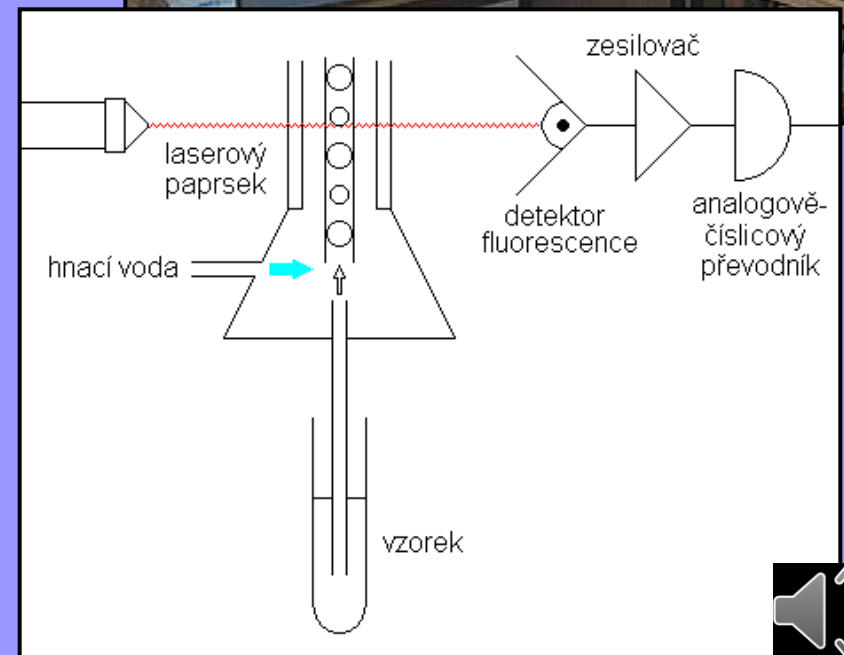


Flow-box / laminární box – biohazard,



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,...

