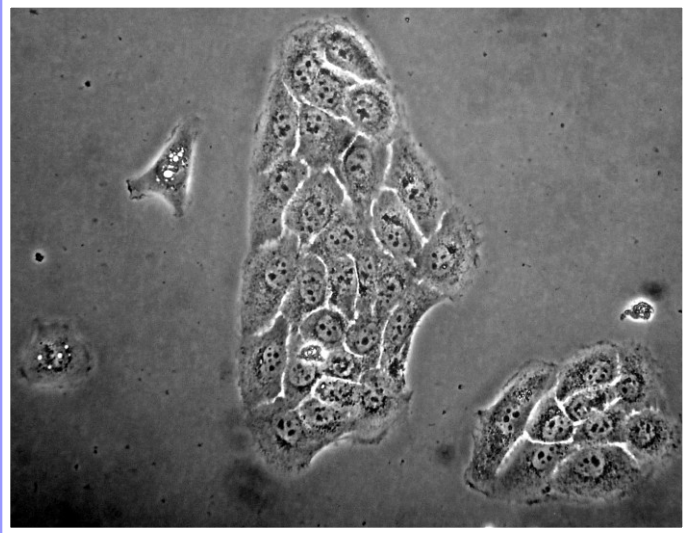


BUŇKY V TC

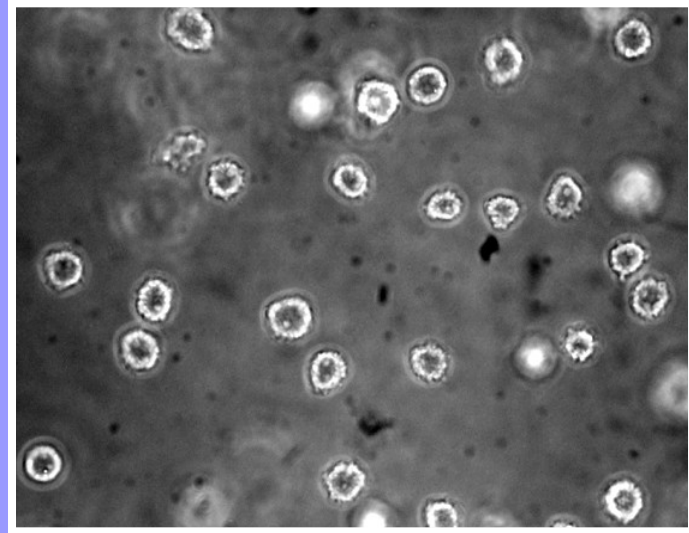
Podle způsobu kultivace

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

Adherentní – (linie HaCaT)



Suspennzí – (linie HL60)



100 μ m

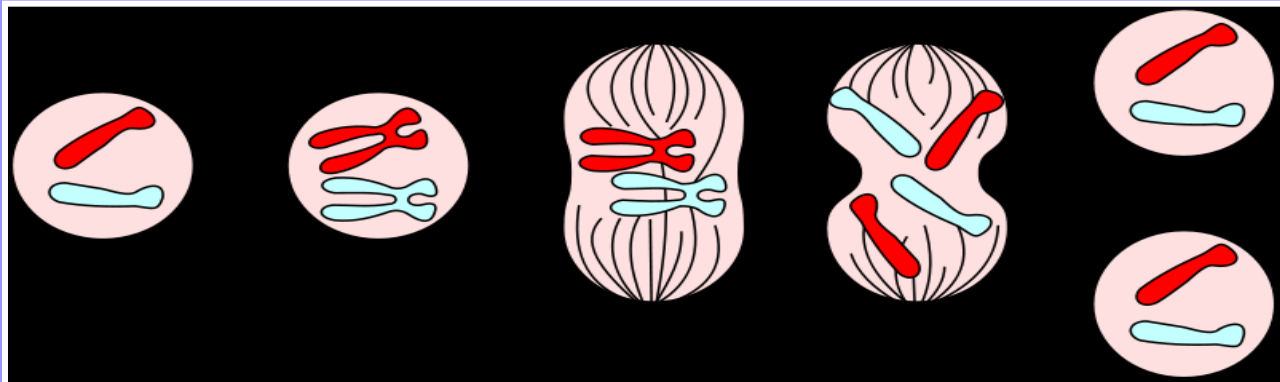
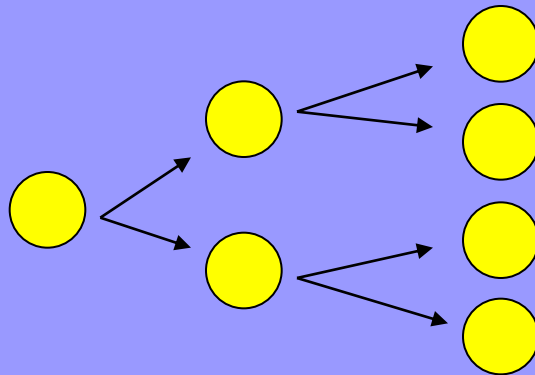


Buňky a jejich vlastnosti (v TC).

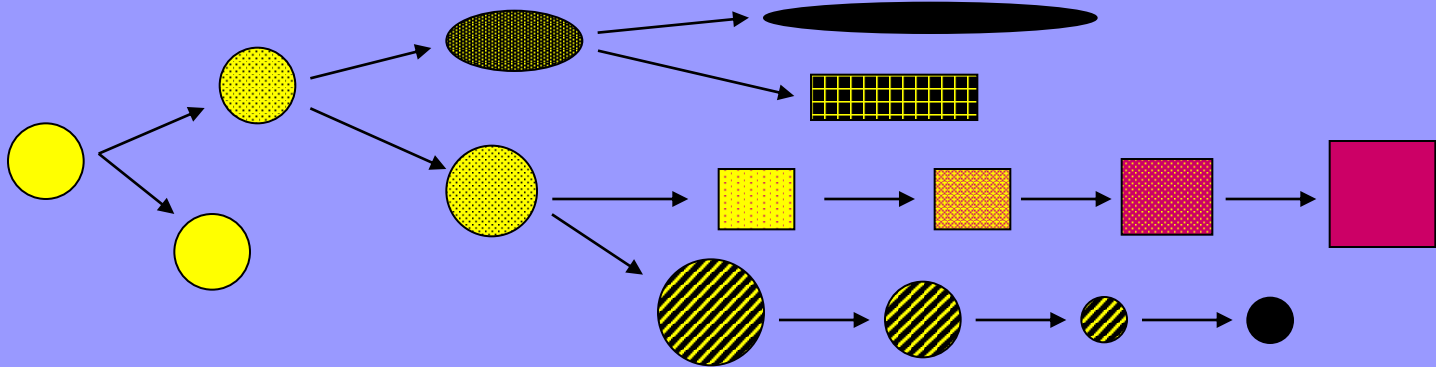
**PROLIFERACE x DIFERENCIACE
x APOPTÓZA**



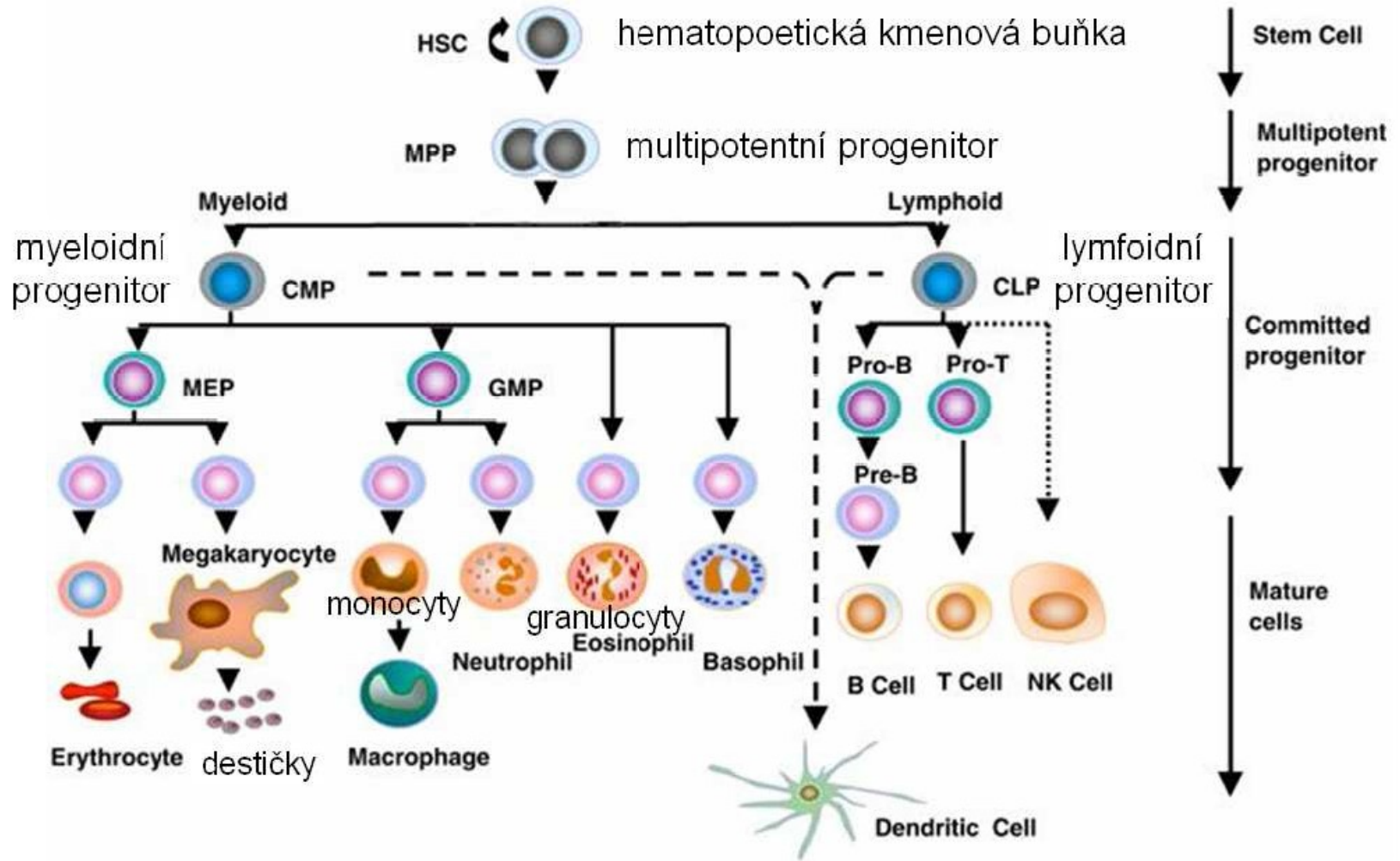
PROLIFERACE = dělení buněk



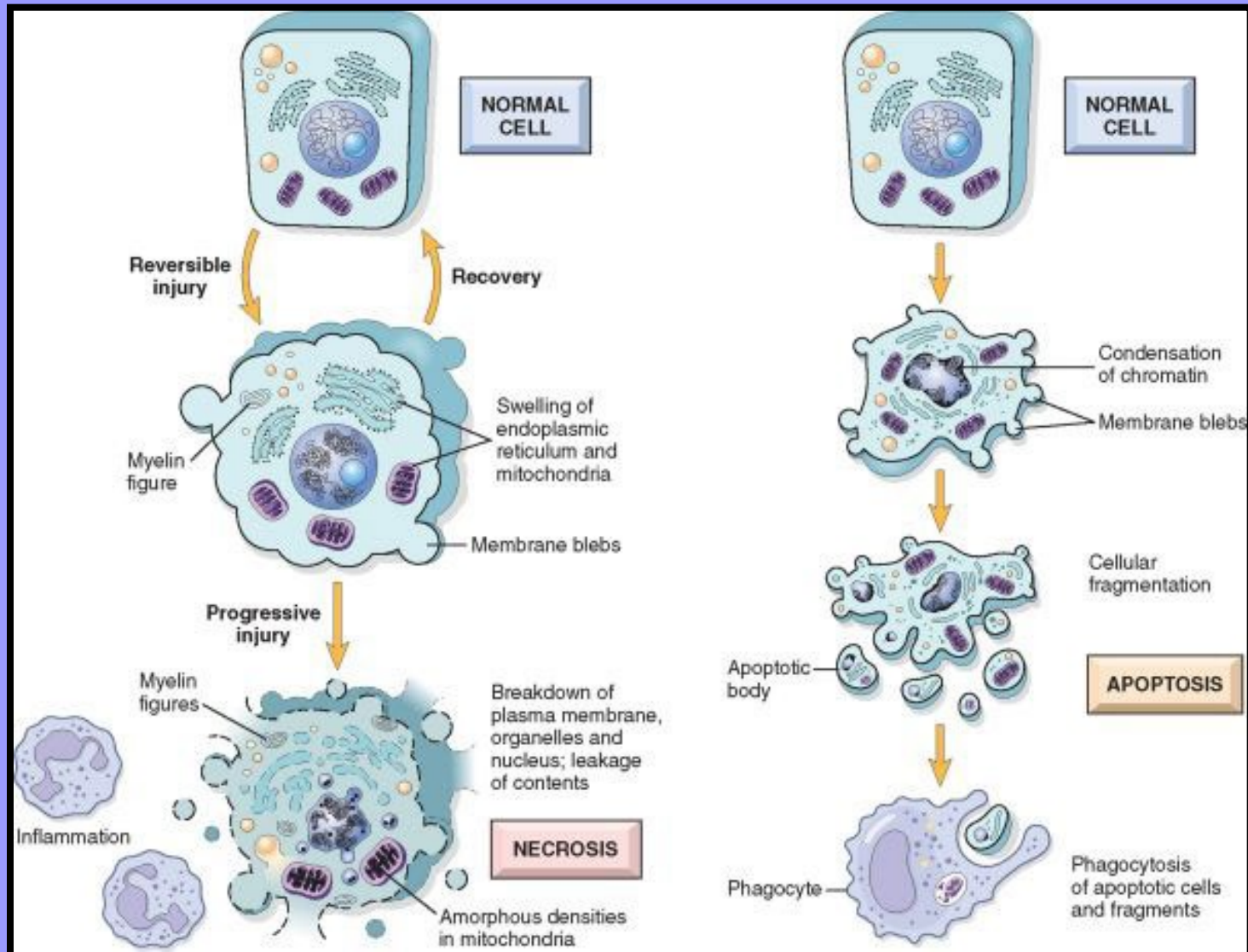
DIFERENCIACE = rozrůžňování buněk



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*!!!



| 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 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 Ca^{2+})

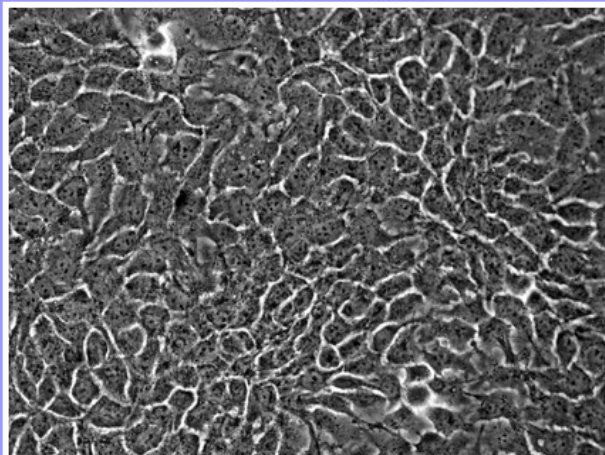
Suspenní linie – prostým ředěním

* 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 dH_2O . Podle potřeby a typu buněk se používají ale i ostatní proteiny ECM.

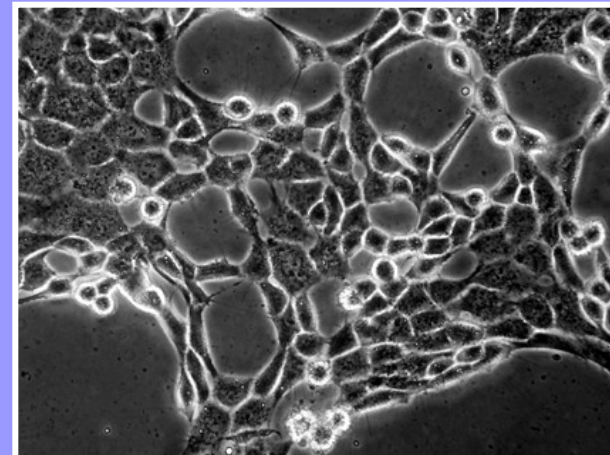


Pasážování buněk pomocí tzv. trypsinizace (enzymatické rozvolnění)

konfluentní buňky (100%)



rozvolněné konfluentní buňky



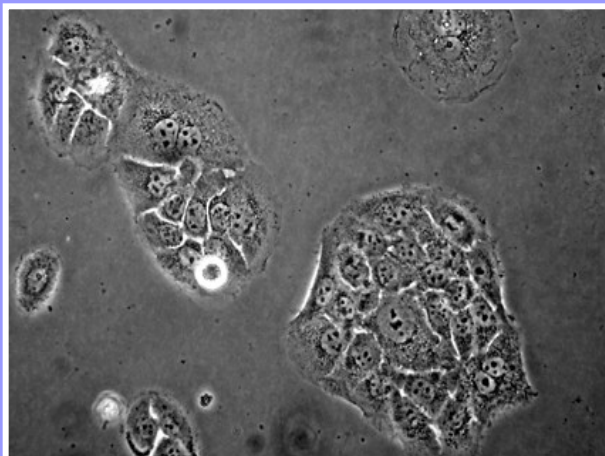
*rozvolnění buněk deplecí Ca^{2+} iontů
(chelatony např. EDTA)*



růst kultury



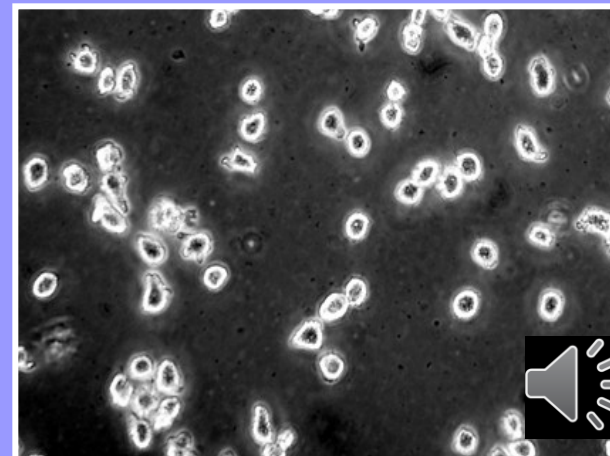
nová pasáž (konfluence ~20%)



*enzymatické štepení
např. trypsinem*



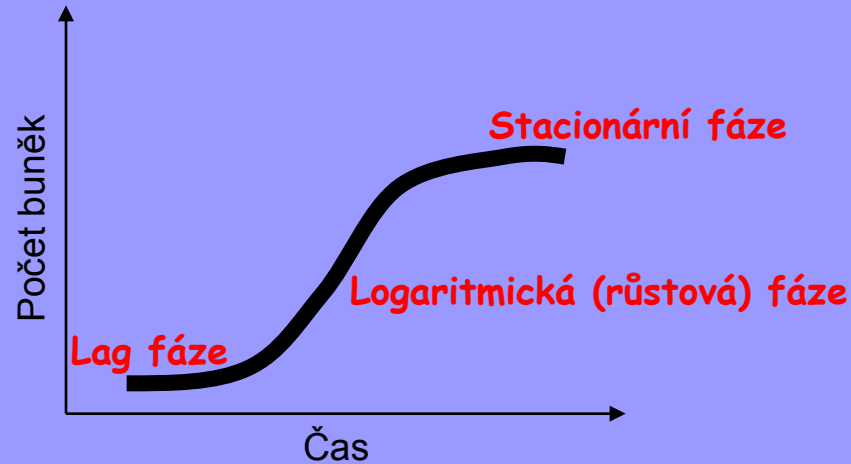
**enzymaticky rozvolněné buňky
(suspenze)**



*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 *cm²*

- **konfluence** – počet buněk na plochu u adherentních linií (b. / *cm²*,
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

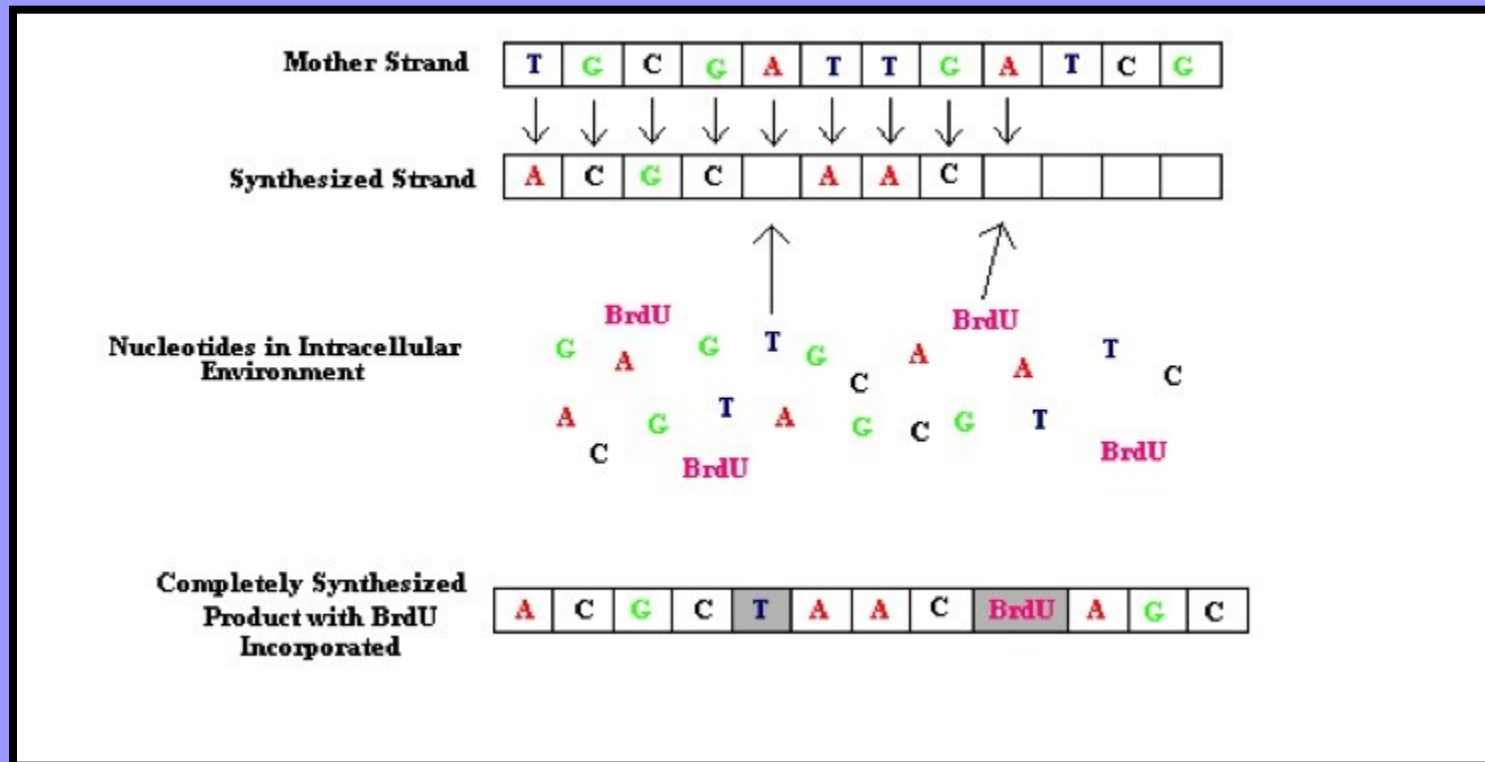
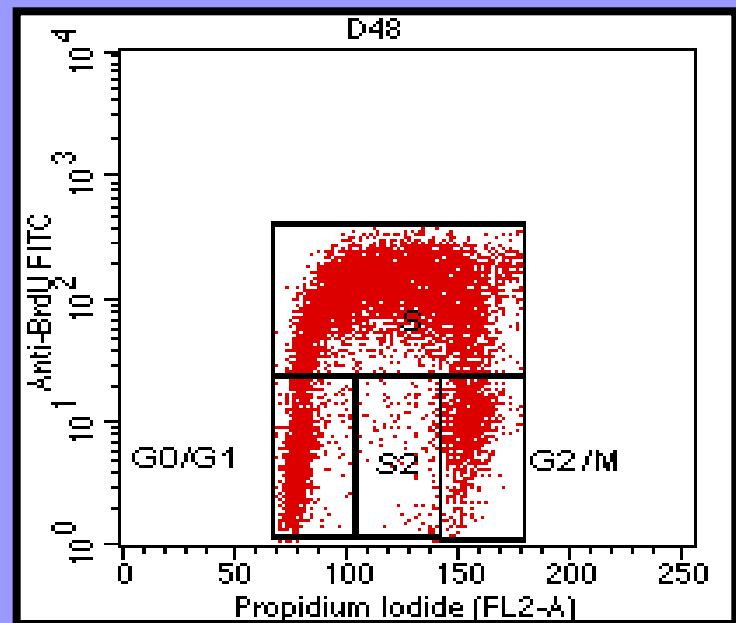
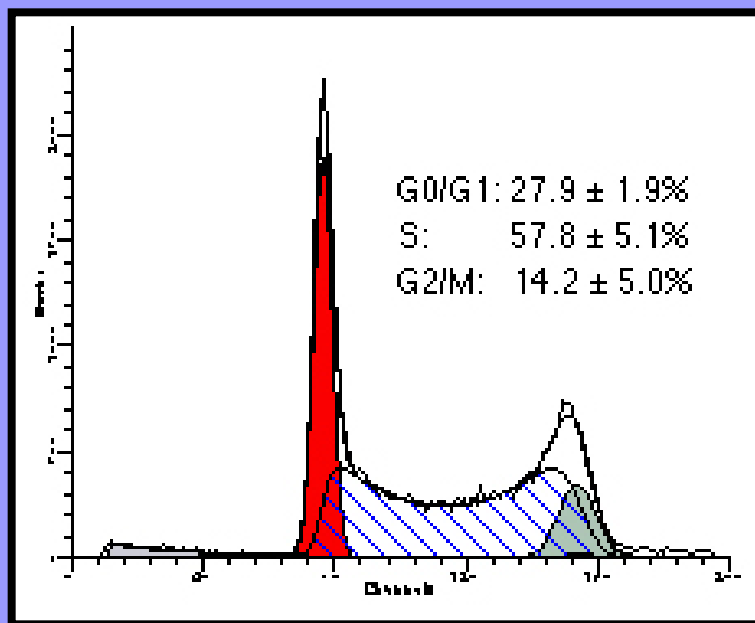
Počítáním buněk

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

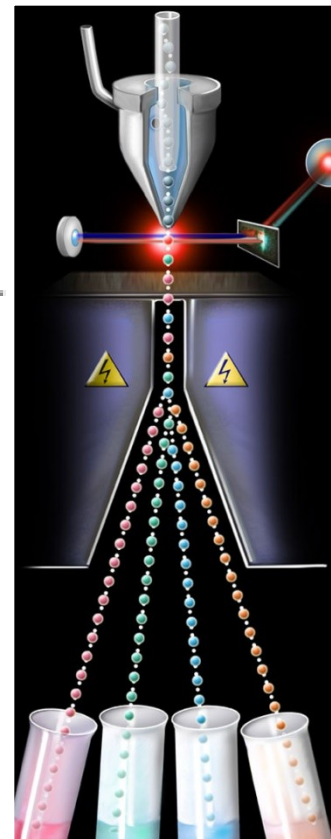
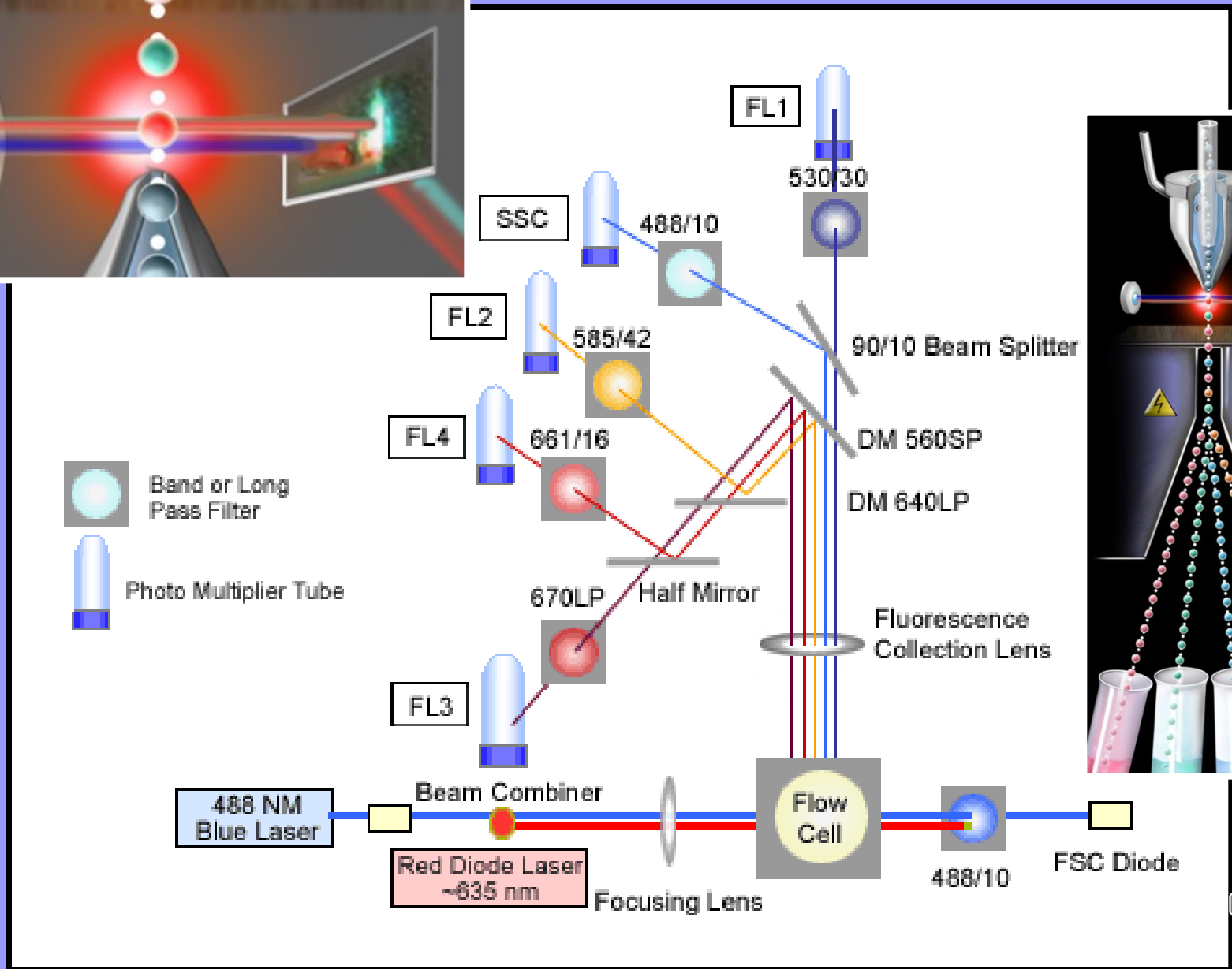
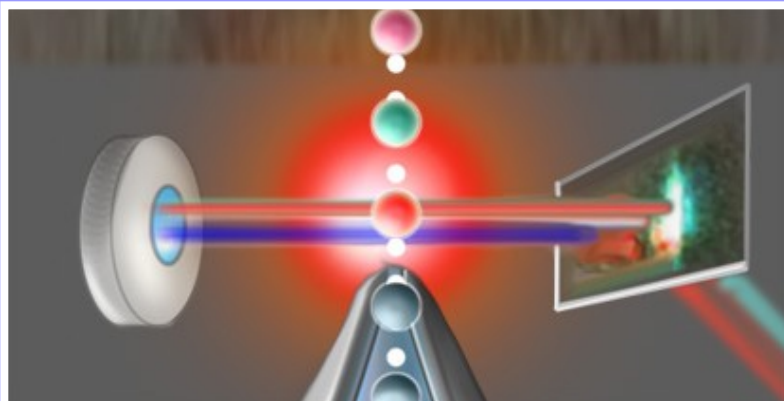
Přírůstek v množství DNA (lze použít i pro jednotlivou buňku)

- Inkorporace ^3H 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), nověji EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)
- 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

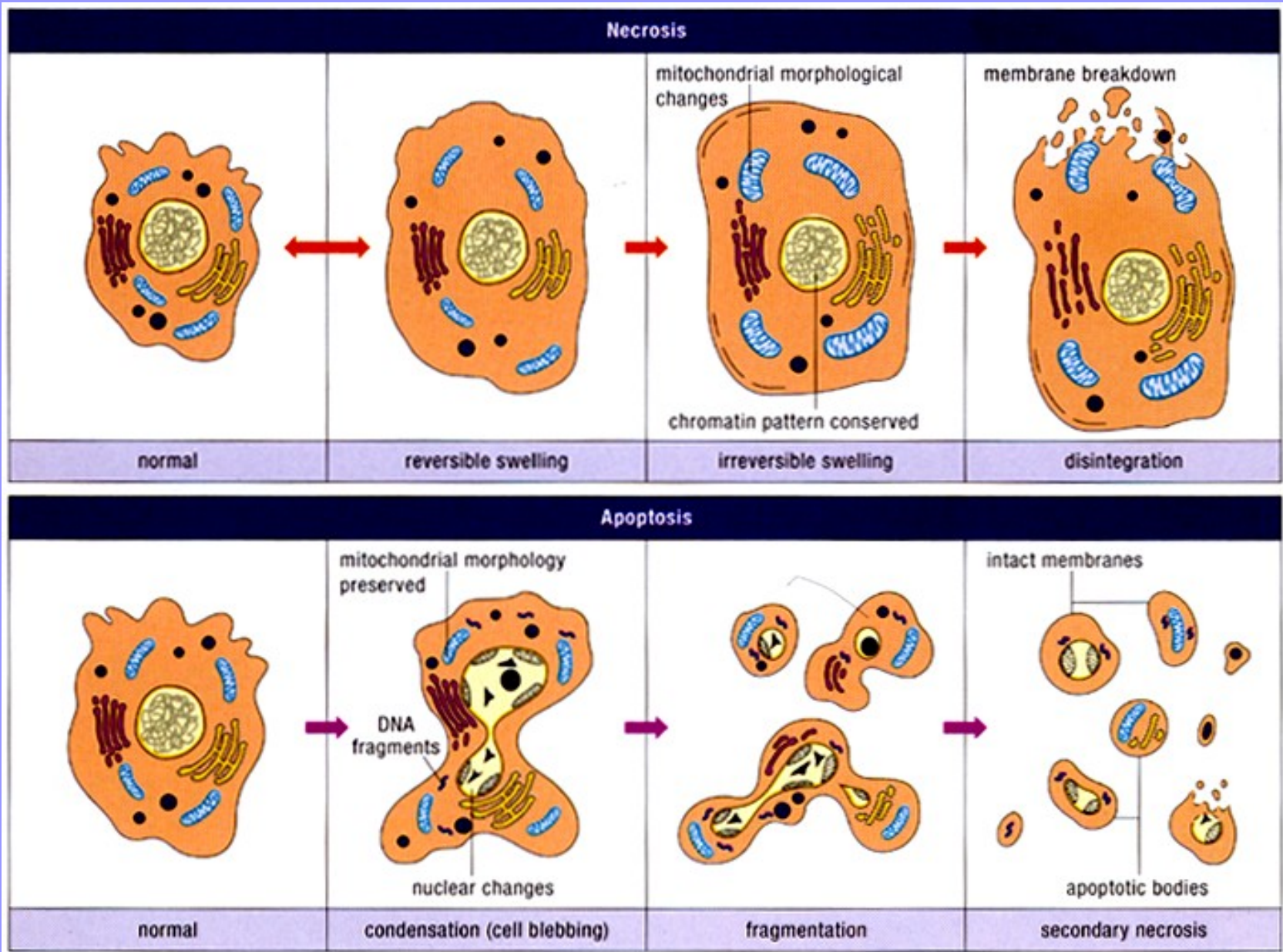
Stanovení exprese specifických proteinů spřažených s proliferací

- 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**

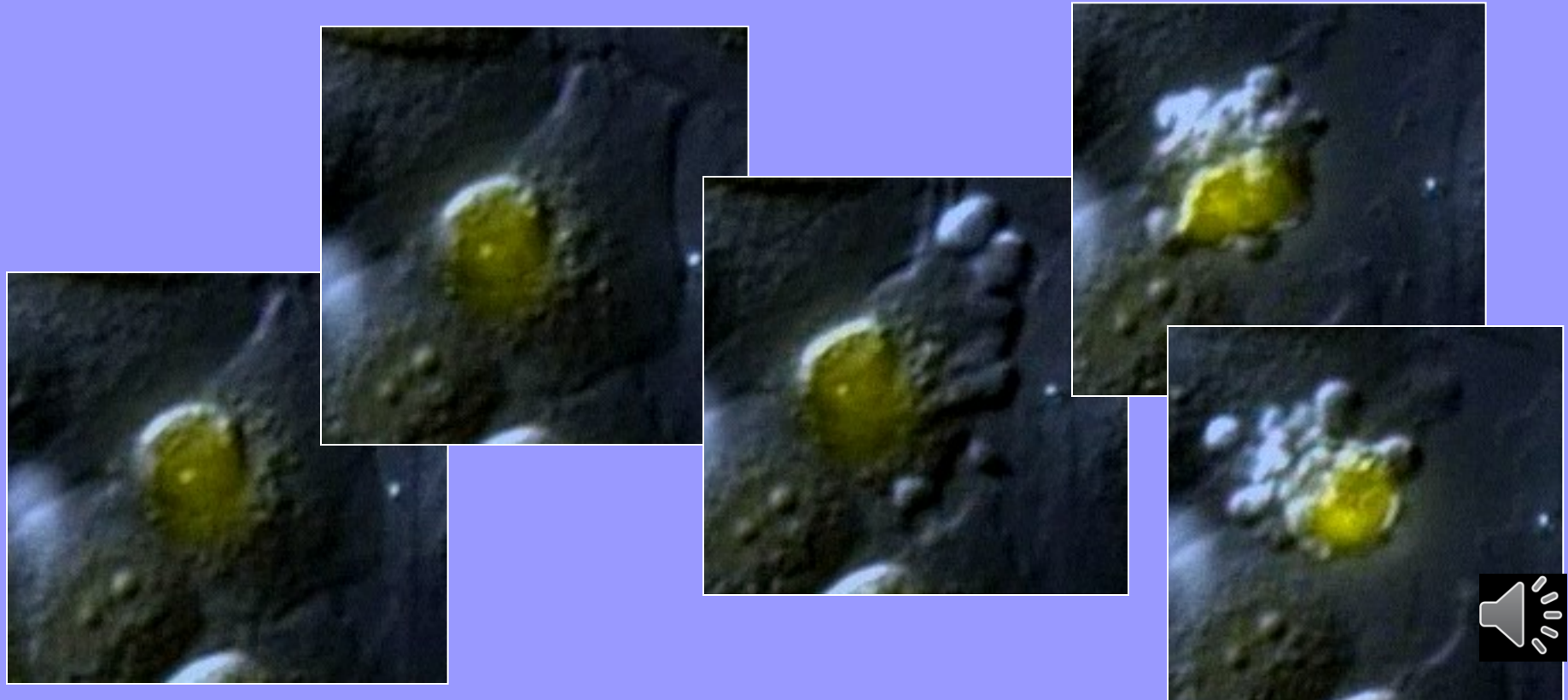


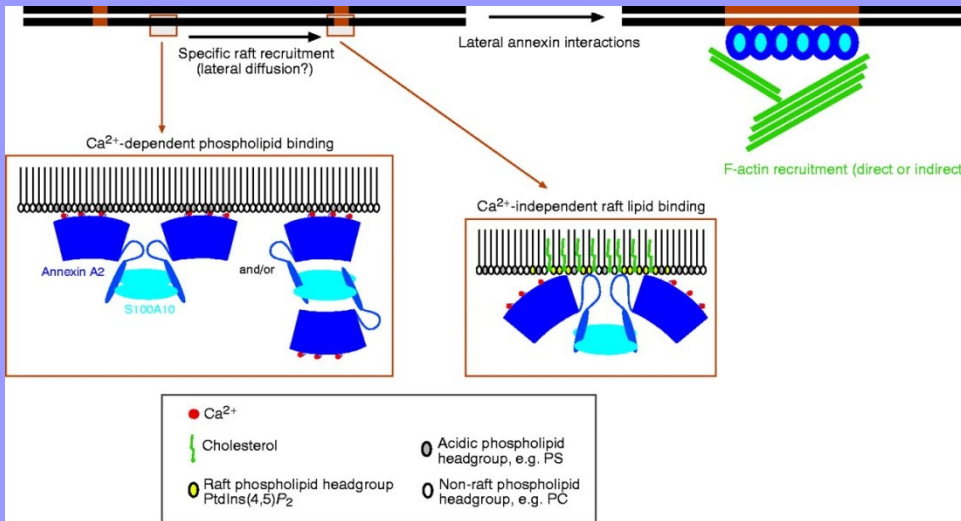
Analýza viability a apoptózy



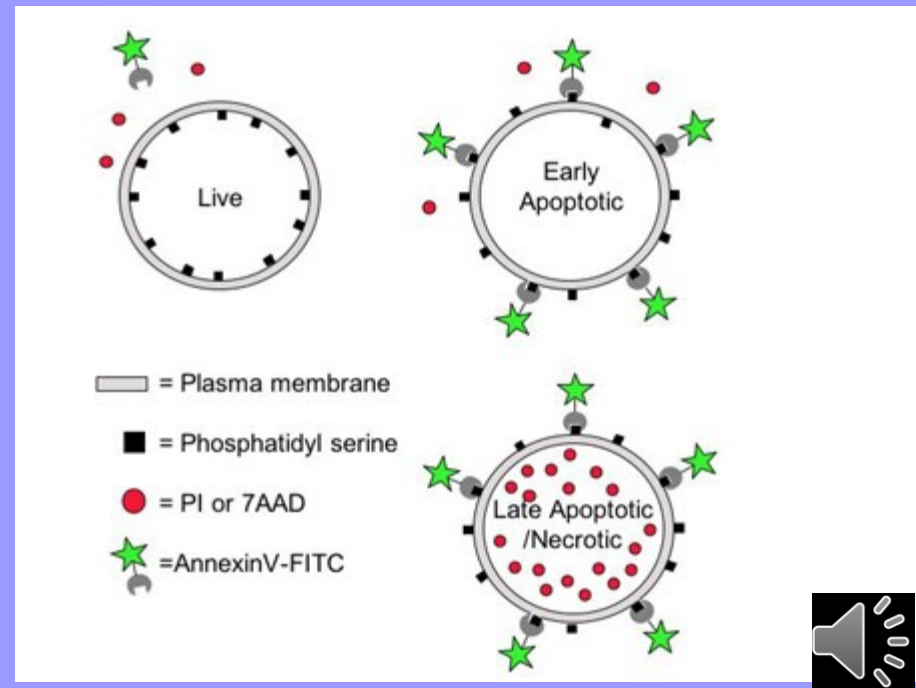
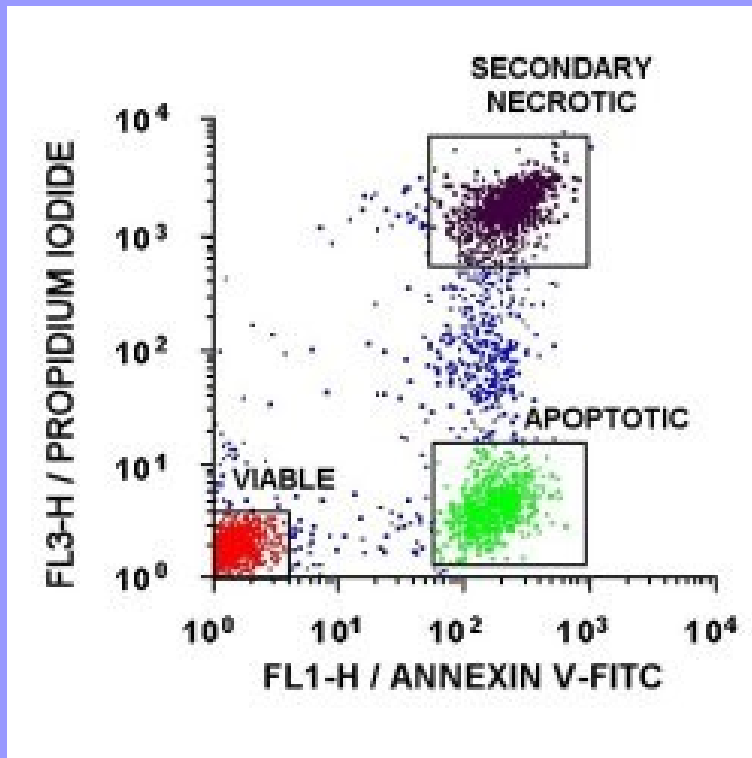
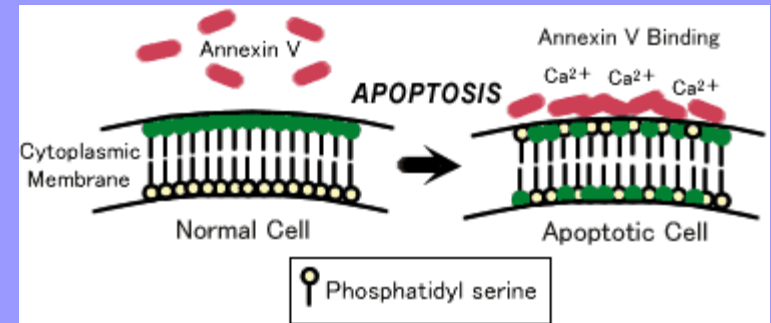
A) Testy založeny na kompaktnosti zdravé buňky a jejím „správném“ chování / funkci

- 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



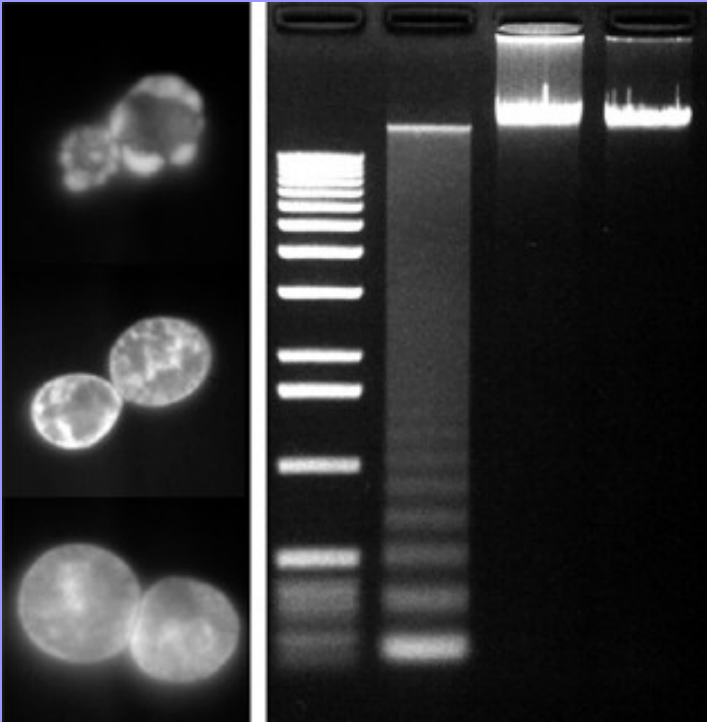


Annexin assay

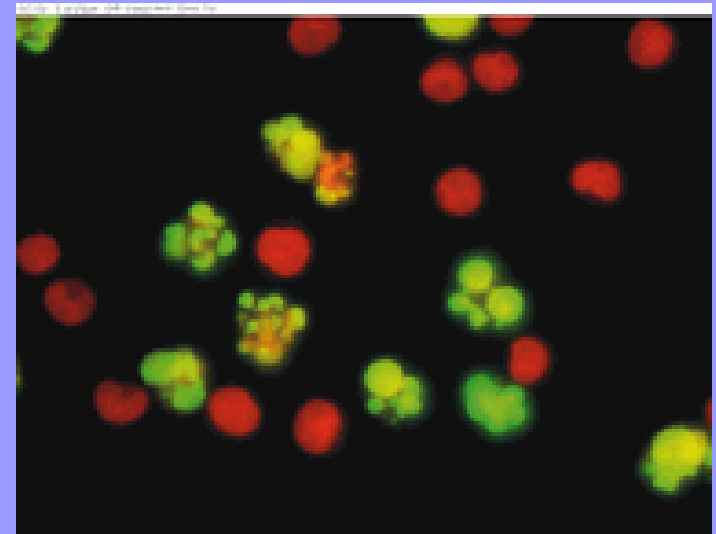


B) Testy založeny na stanovení biochemických a molekulárně biologických parametrů

- 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)

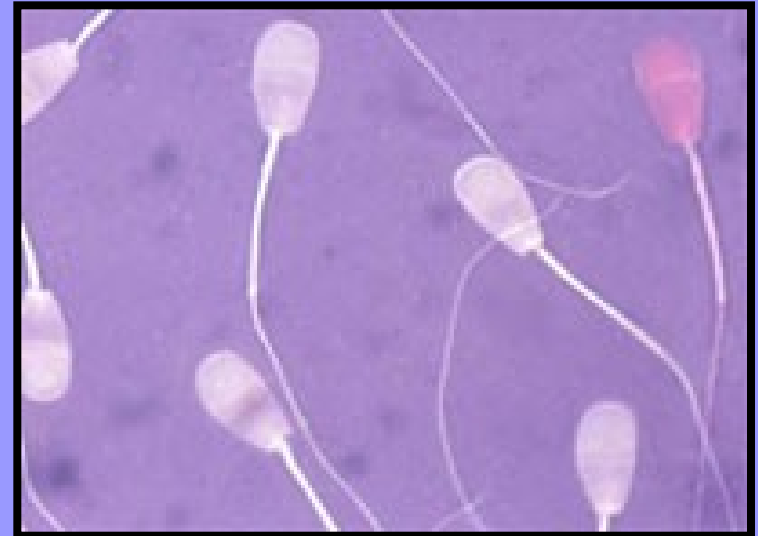
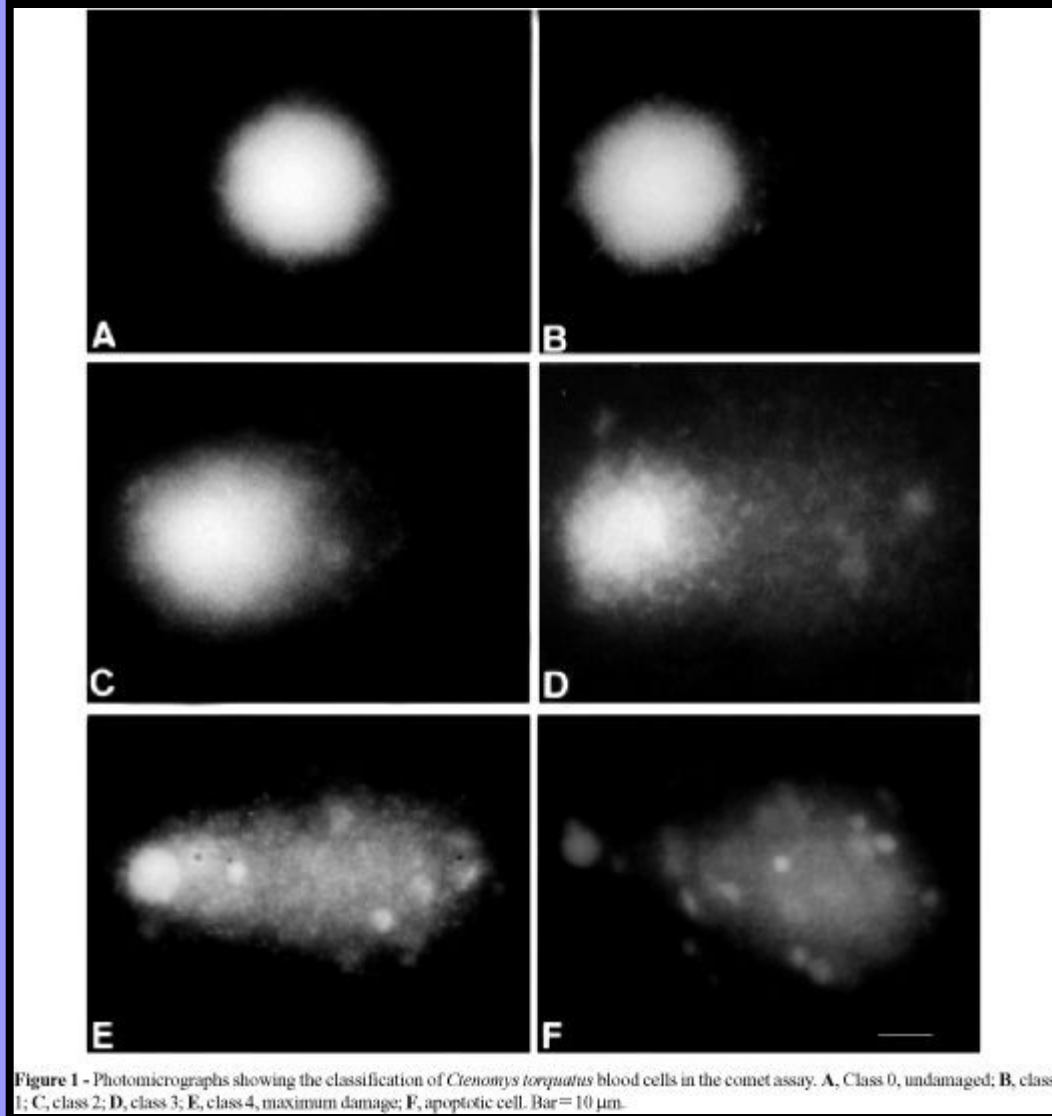


TUNEL assay, red - nuclei, green apoptosis



Comet assay

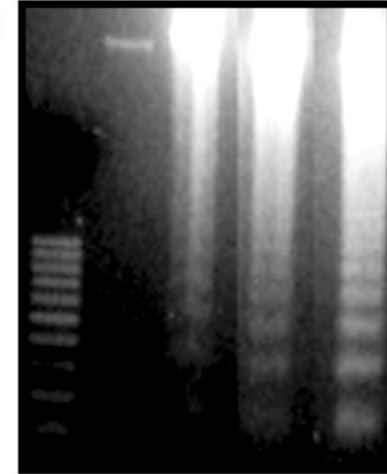
Eosin (Trypan blue)
stain of viability



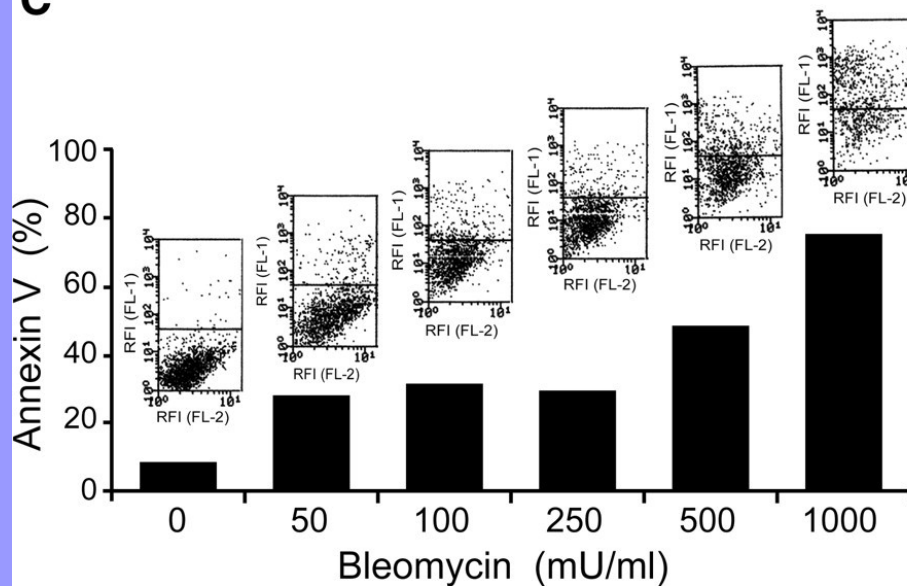
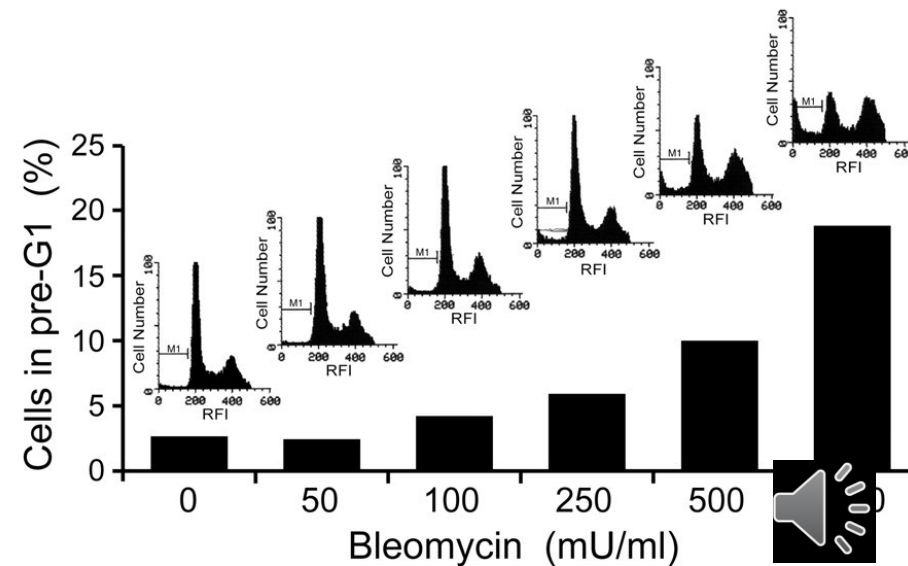
A

| BLEO mU/ml | 0 | 5 | 50 | 100 | 200 | 500 | 1000 |
|--|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|
| % viability 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 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.

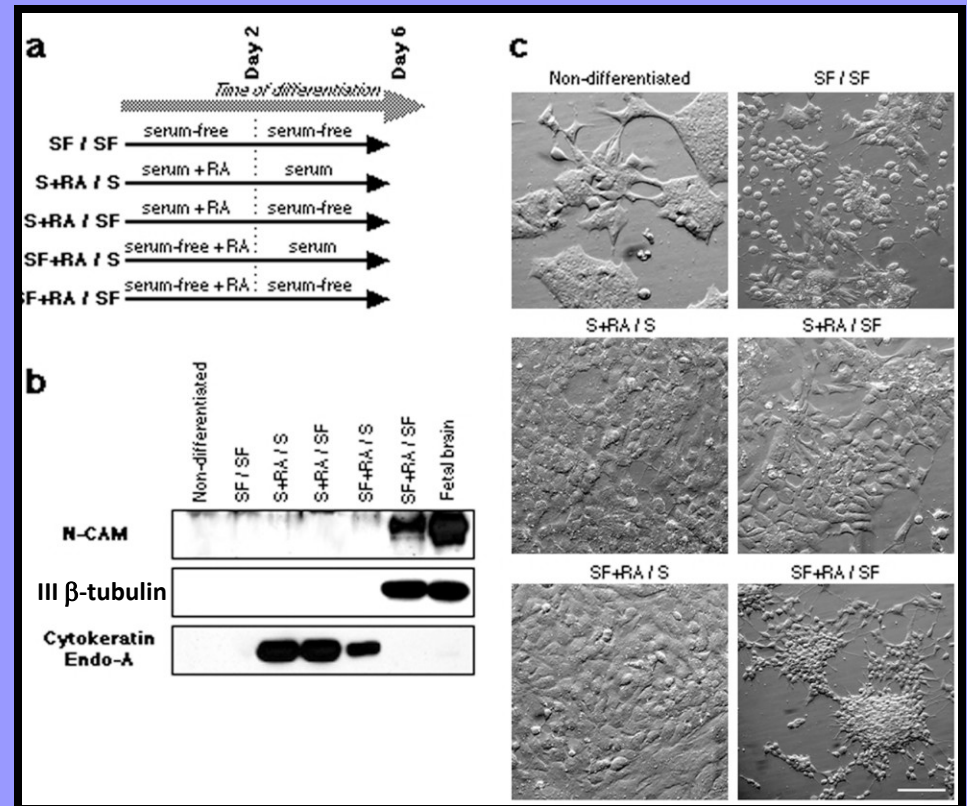
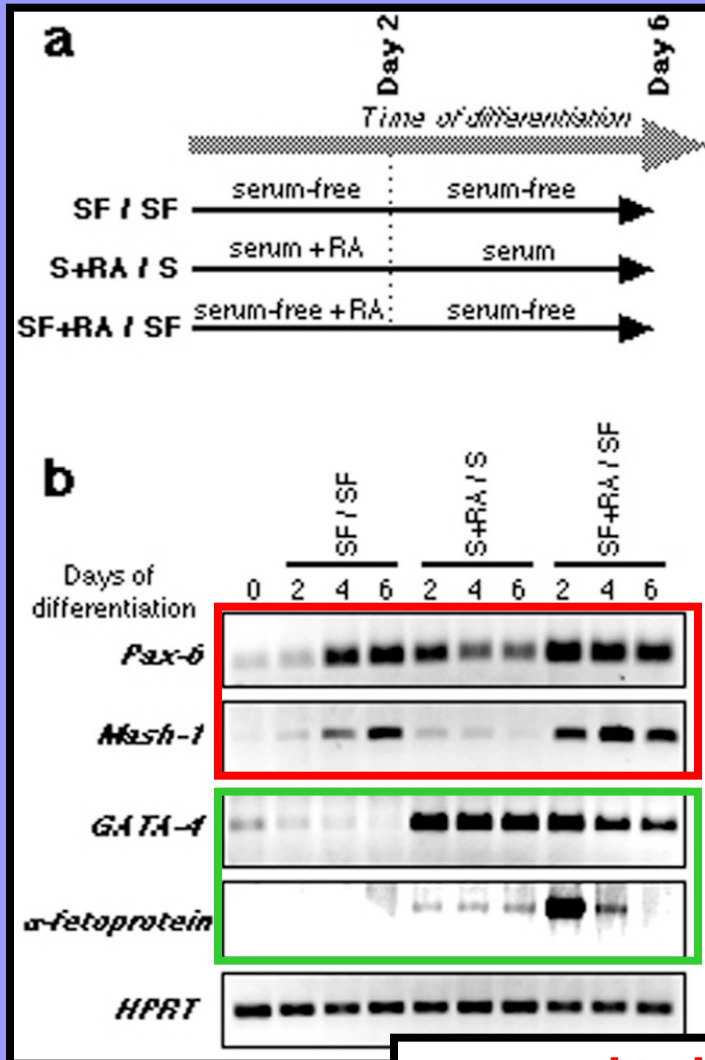
DIFERENCIACE JE PRAKTICKY VŽDY SPOJENA I SE ZMĚNOU PROLIFERAČNÍCH PARAMETRŮ, PŘÍPADNĚ I S APOPTÓZOU.

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



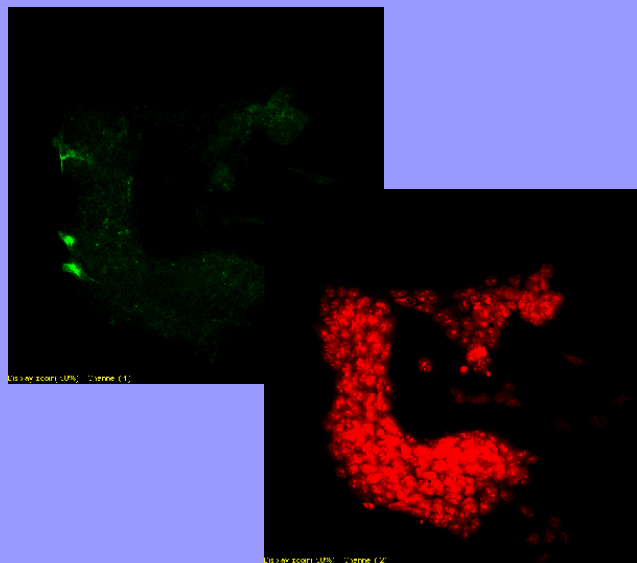
RT-PCR analýza exprese liniově specifických genů

- neuroektoderm
- entoderm



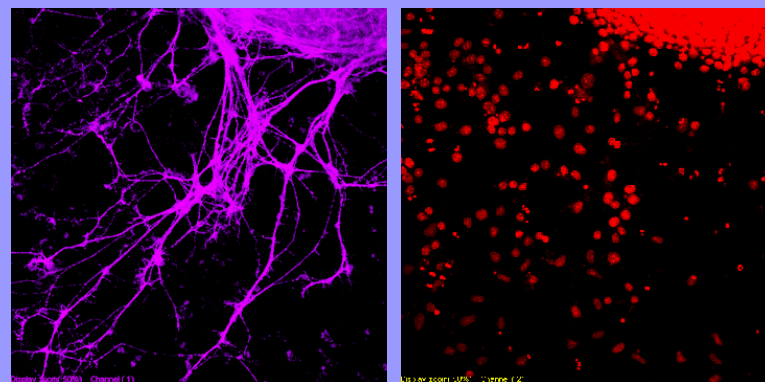
Účinek séra na RA indukovanou neurální diferenciaci EC buněk

Nediferencované buňky EC

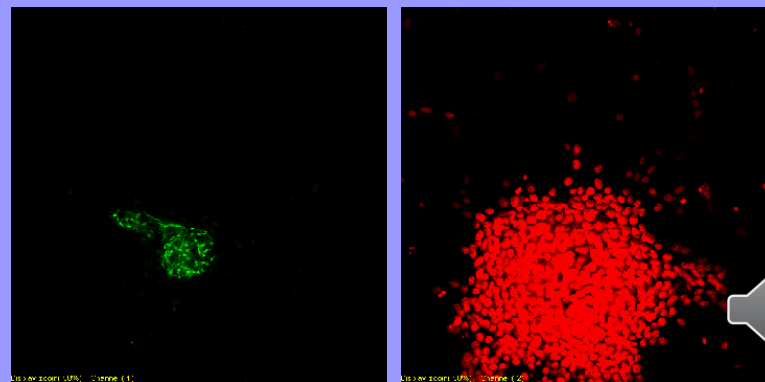
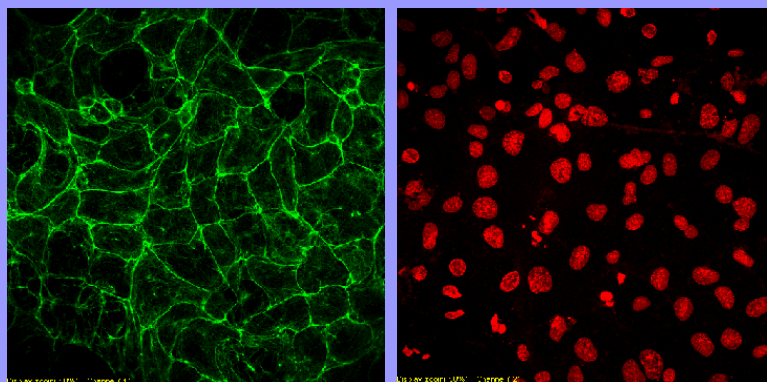


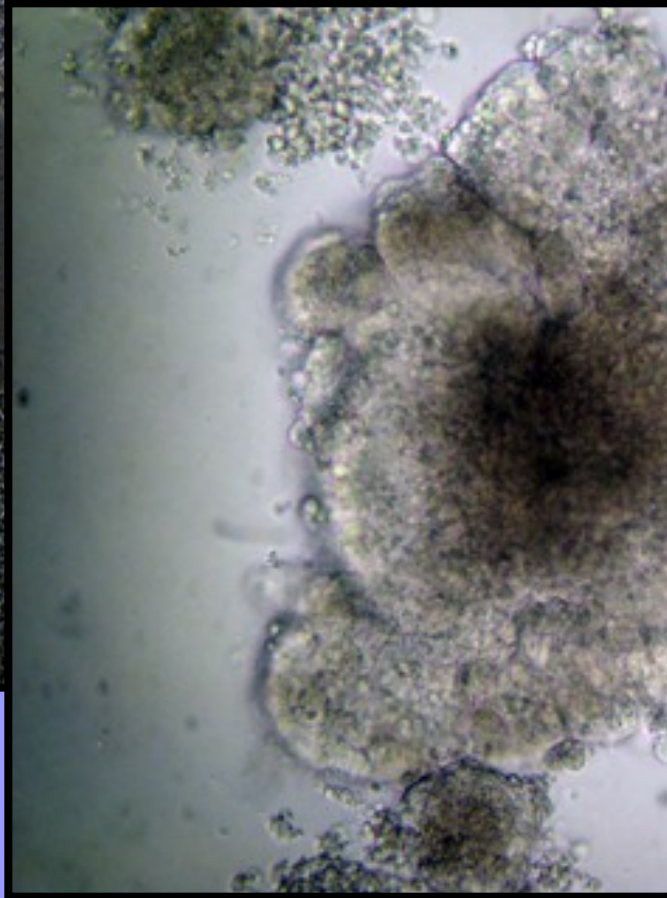
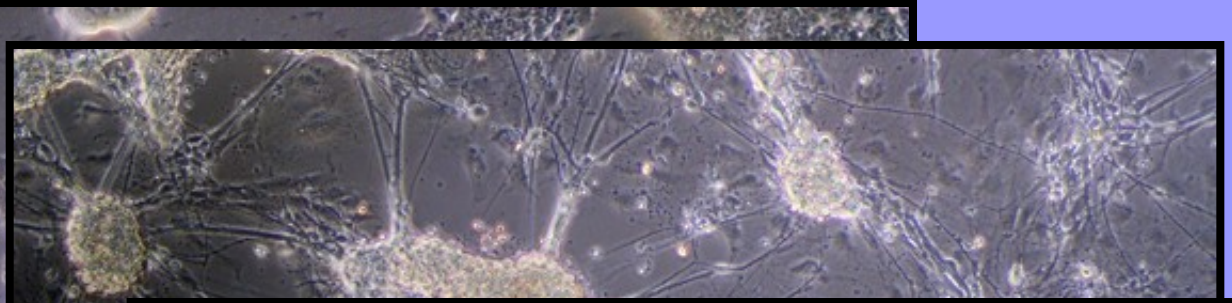
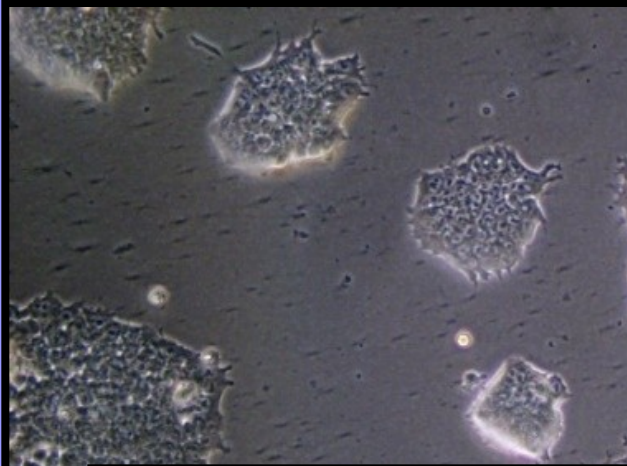
- ◆ buněčná jádra
- ◆ cytokeratin EndoA pozitivní buňky – entoderm
- ◆ N-CAM pozitivní buňky - neurony

Diferencované buňky EC monovrstva + RA - sérum



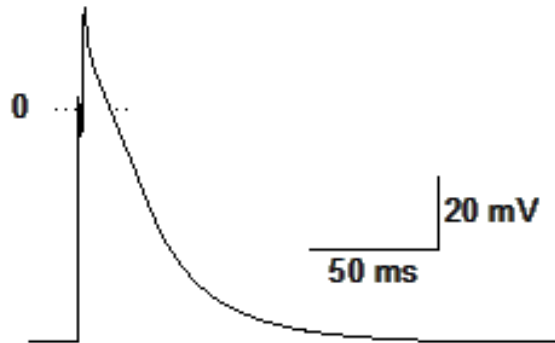
Diferencované buňky EC monovrstva + RA + sérum



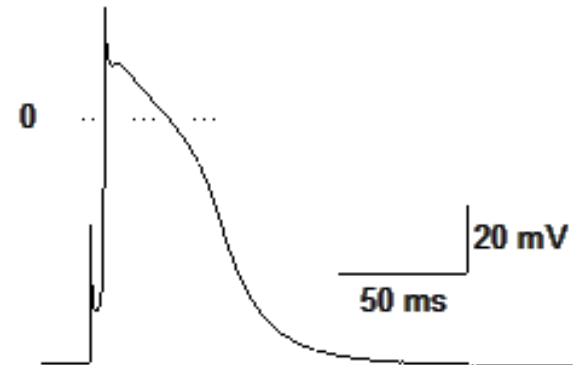


Elektrofyzilogické parametry kardiomyocytů jako součást identifikace jejich fenotypu

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)

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

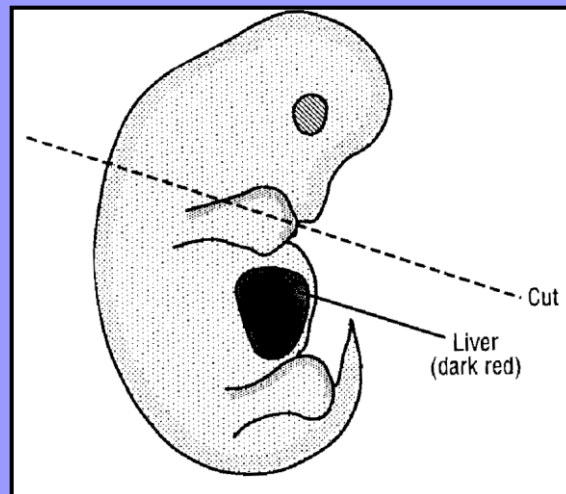


Příprava myších embryonálních fibroblastů

MEF – mouse embryonic fibroblast

PEF – primordial embryonic fibroblast

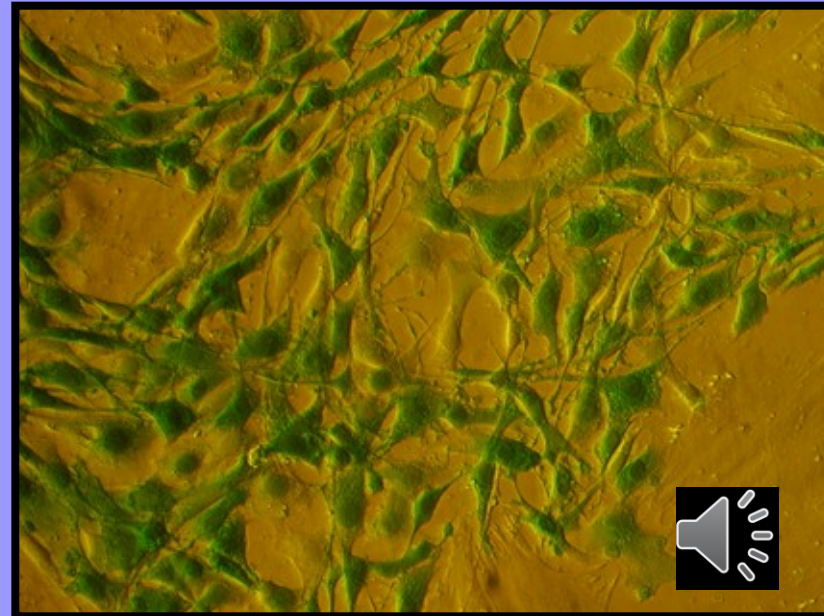
- Připravují se nejčastěji z 13.5 denních embryí (11-13.5 dpc.)
- Gravidní samice se usmrtí a vypreparuje se děloha s embryi
- Z embryí se odstraní hlava a vnitřní orgány
- Zbytek embrya se enzymaticky a mechanicky rozruší a po odstranění kompaktních zbytků, se suspenze vyseje na kultivační misku
- Rozrostlé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

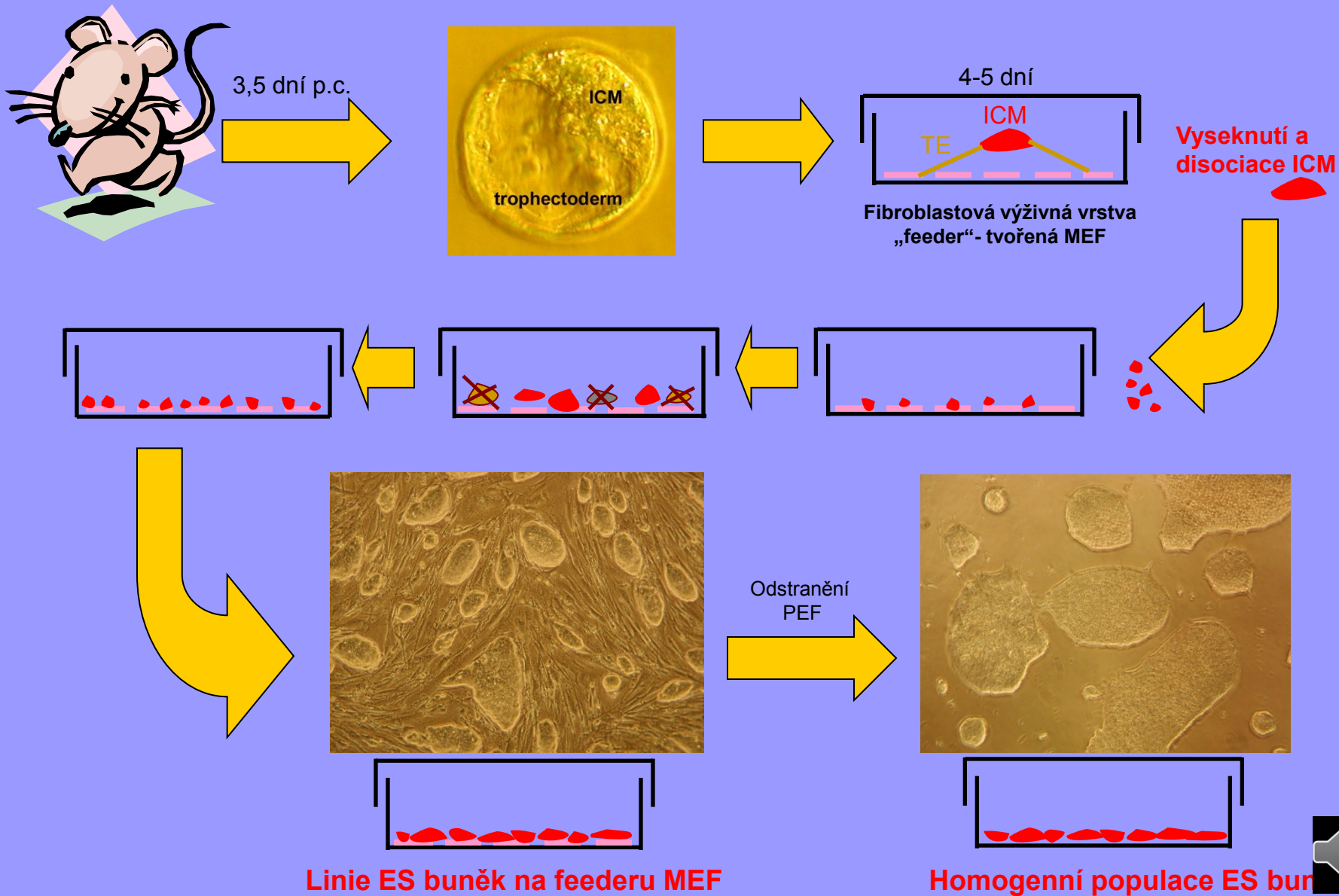
- Vypreparujeme stehenní kost, odstříhneme hlavice a propláchneme (např. injekční stříkačkou) vhodným kultivačním médiem do kutivační misky (Ize i kost navrtat a odsát (např. injekční stříkačkou) = možné autotransplantace).
- Po 24 hodinách kultivace odstraníme médium se zbylými krevními elementy opláchneme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



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 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 $\sim 2\text{-}4\text{h}$ do mrazícího boxu (-20°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.



Přeprava buněk

- V zamraženém stavu v tekutém N_2 (v termosce, dálková, lokální přeprava)
- V zamraženém stavu v isolačním boxu se suchým ledem (CO_2)
(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

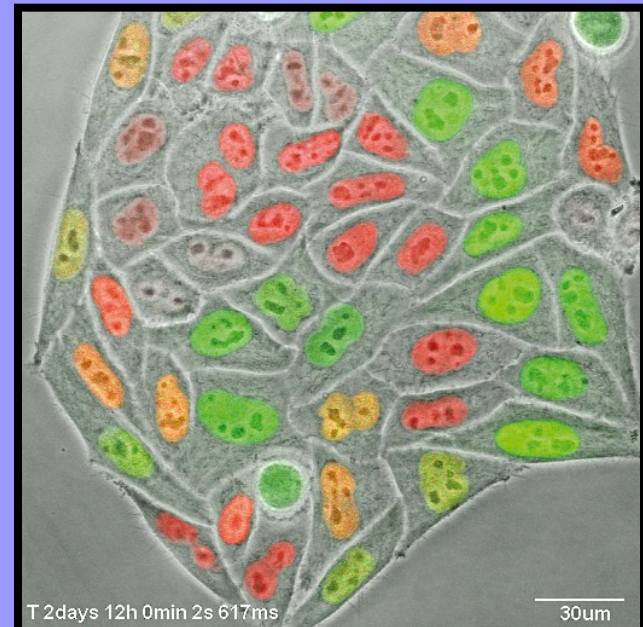
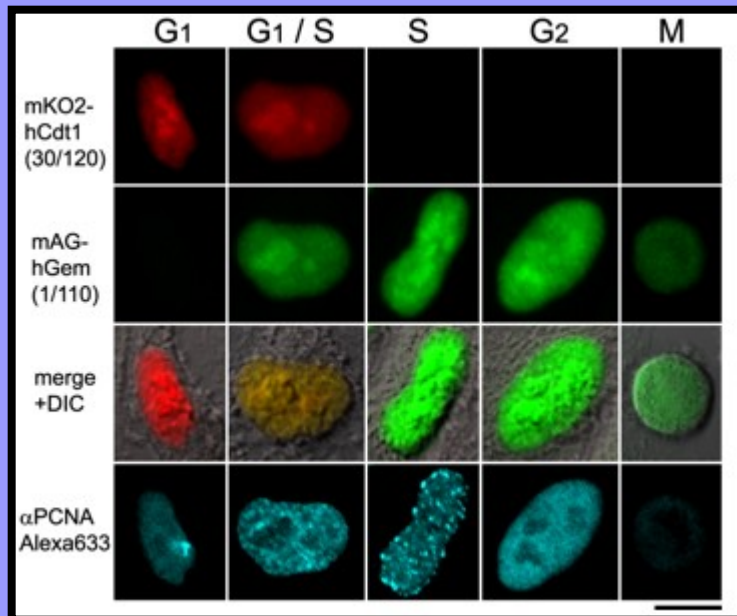
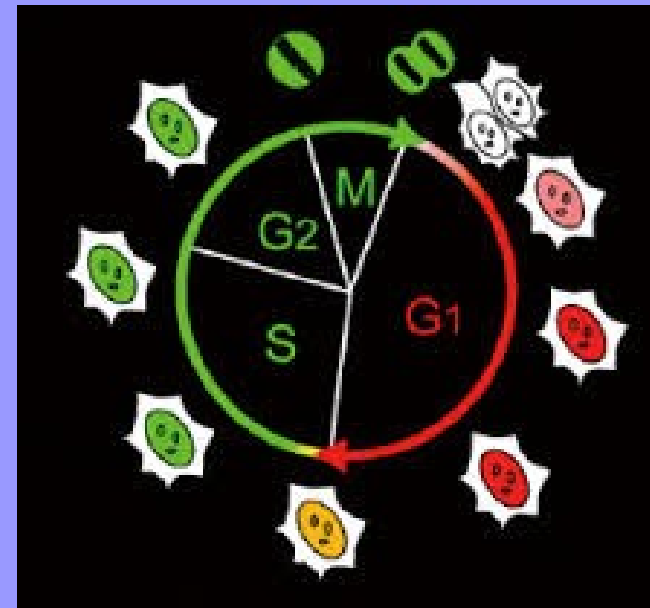
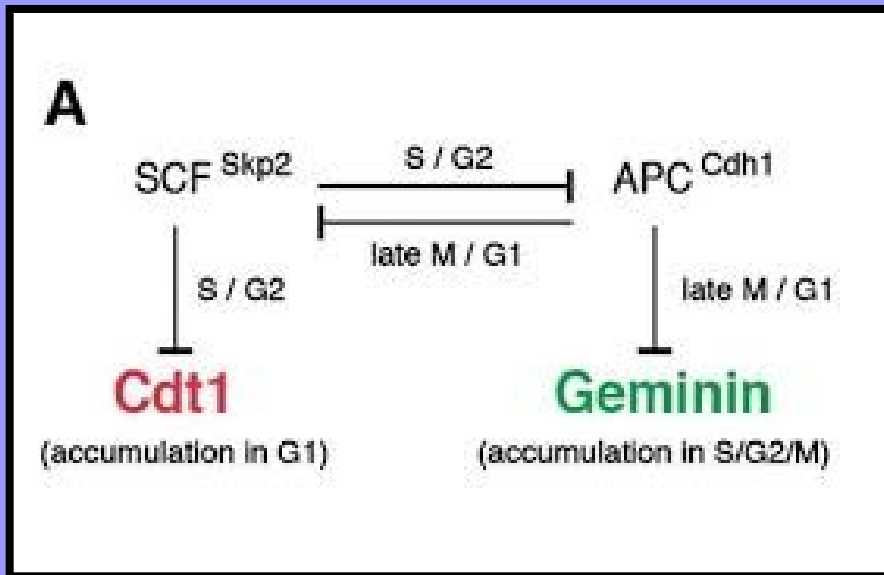
Chemické metody

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

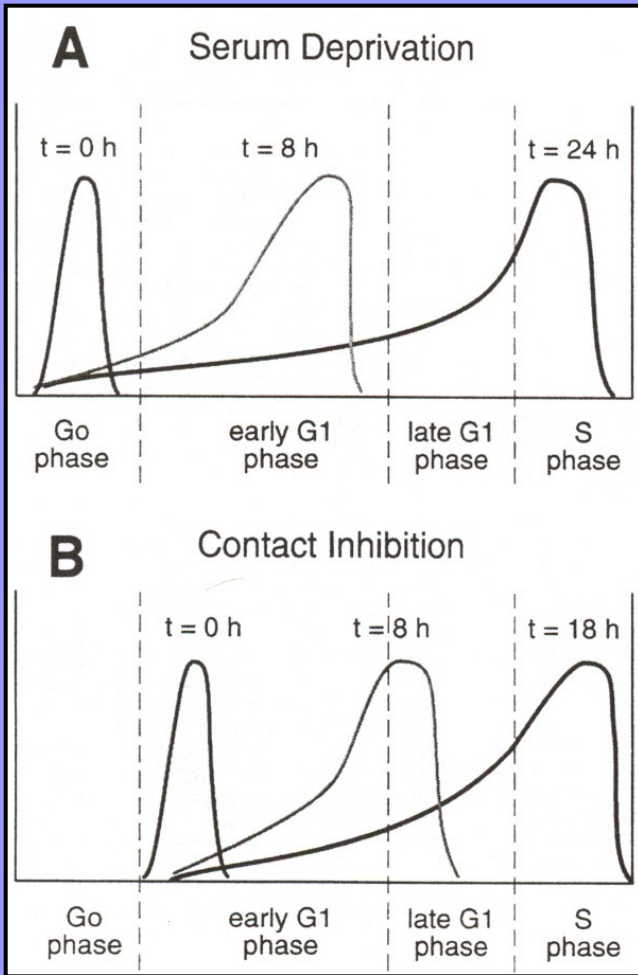


Fucci system

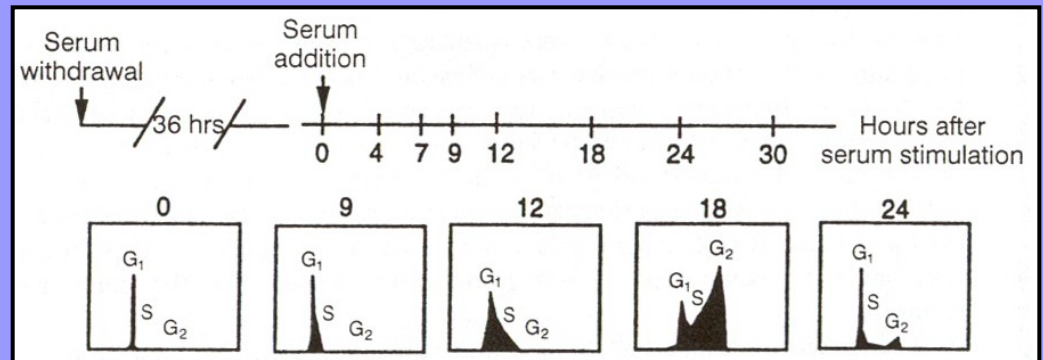
(fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator; Sakue-Sawano et al., 2008)



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

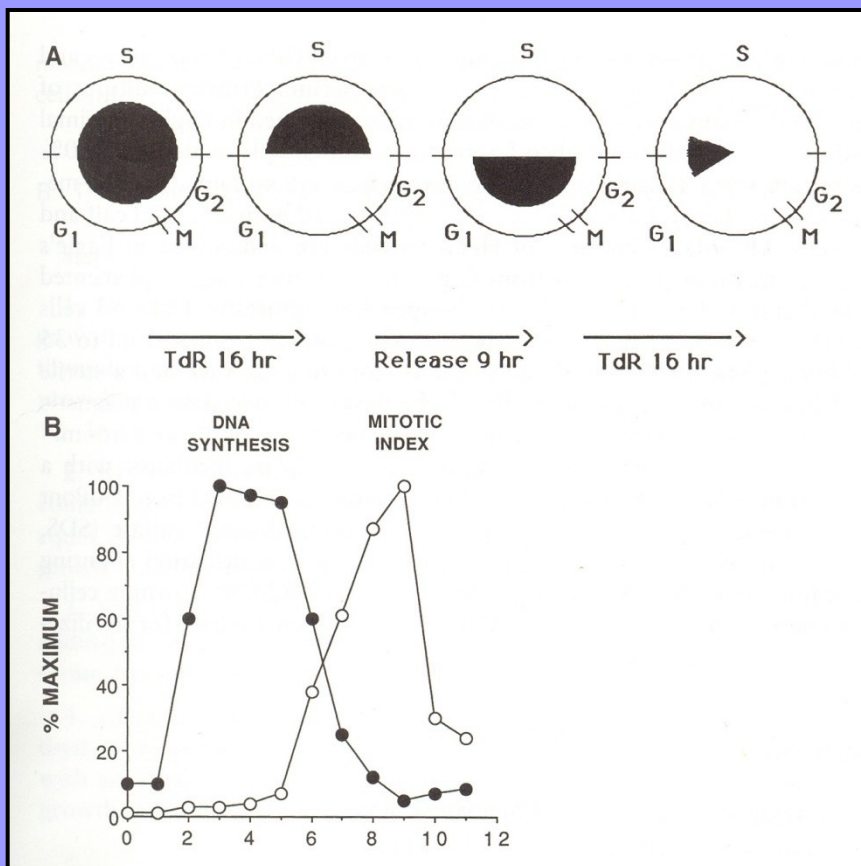


Příklad rozjezdu buněk synchronizovaných deprivací sérem
myší fibroblasty linie NIH/3T3



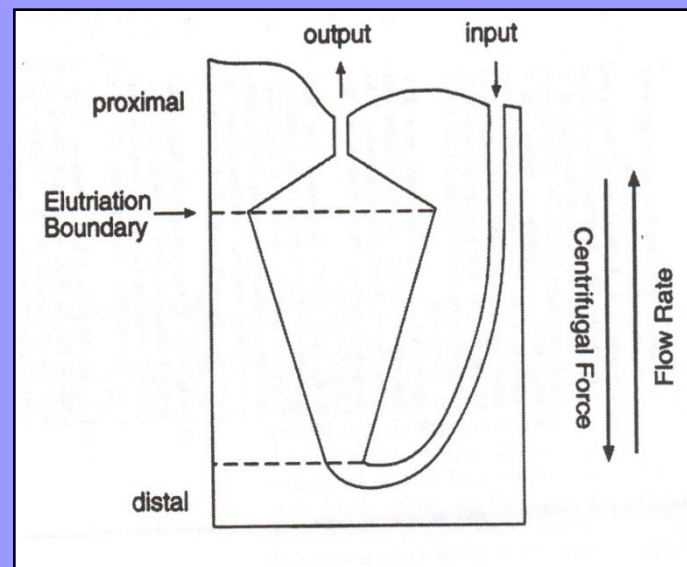
Princip dvojitého bloku přídávkem nadbytku thymidinu

- 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

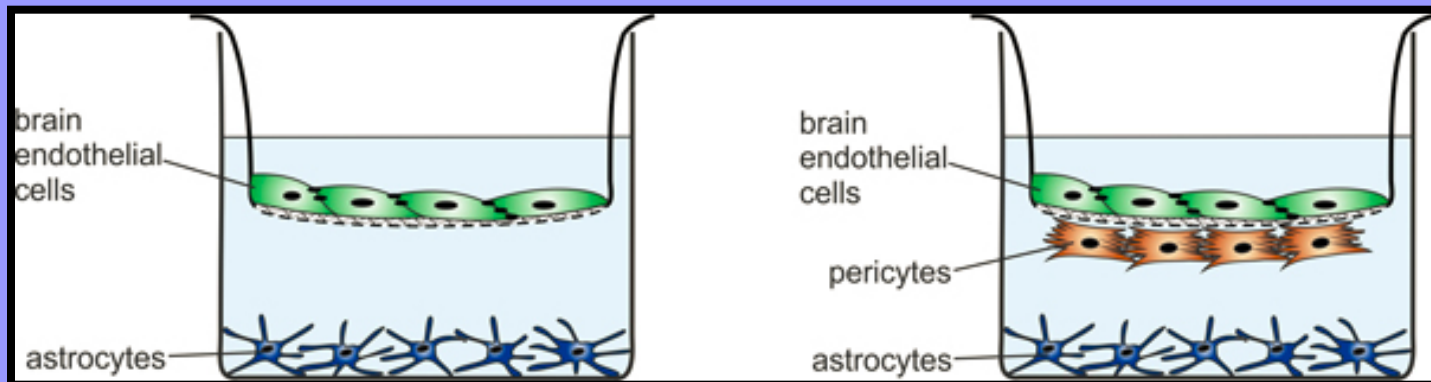
- Produkce růstových faktorů s parakrinním účinkem
- Vhodné mechanické vlastnosti podkladu atd.

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



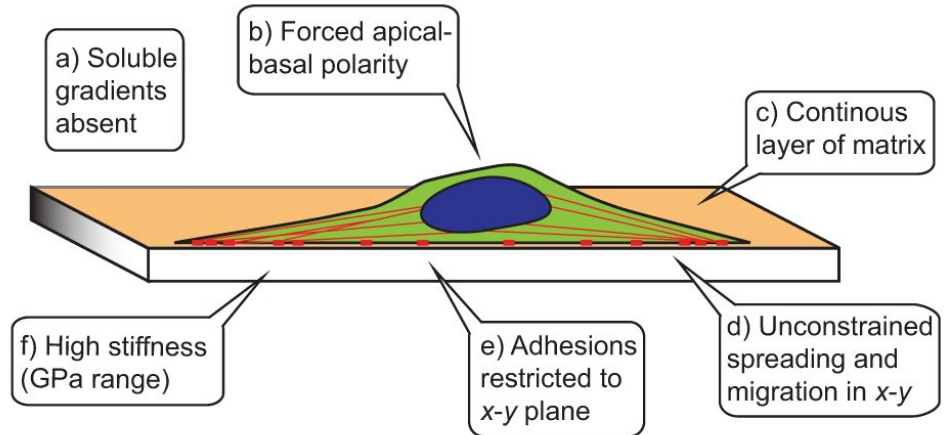
3-D kultivace

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

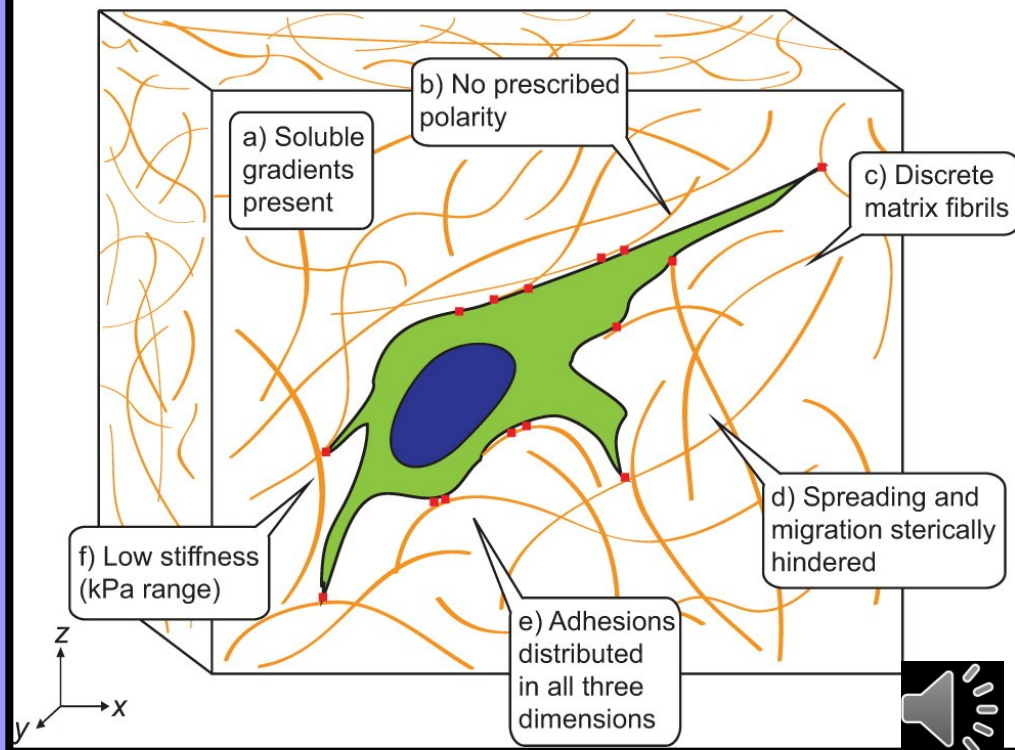
Difúzní koeficienty (cm^2 / s) pro O_2 a CO_2 pro různé biologické materiály

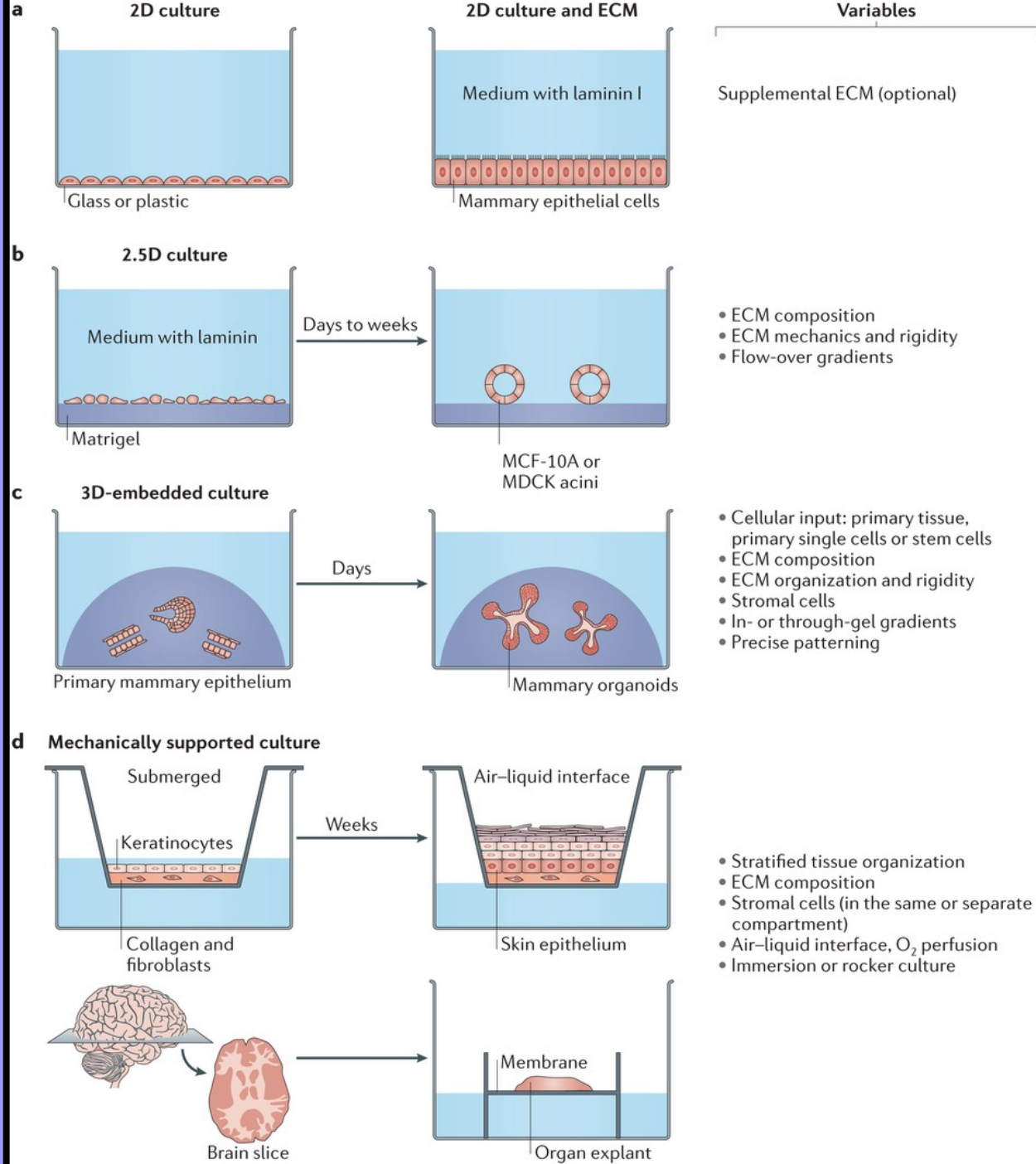
| | O_2 | CO_2 |
|--|-----------------------|---------------------|
| vzduch (0°C) | 0,178 | 0,139 |
| (20°C) | 0,20 | |
| voda (20°C) | 20×10^{-6} | 18×10^{-6} |
| (37°C) | 33×10^{-6} | |
| lidské plíce (37°C) | 23×10^{-6} | |
| svaly (20°C) | 14×10^{-6} | |
| kůže mloka (25°C) | 14×10^{-6} | |
| pojivová tkáň (20°C) | 12×10^{-6} | |
| rosol žabího vajíčka (20°C) | $10,2 \times 10^{-6}$ | |
| obal žraločího vajíčka (15°C) | $3,0 \times 10^{-6}$ | |
| kůže úhoře (14°C) | $2,4 \times 10^{-6}$ | |
| obal lososí jikry ($5-15^\circ\text{C}$) | $1,8 \times 10^{-6}$ | |
| Chitin (20°C) | $0,7 \times 10^{-6}$ | |

Collagen-coated glass (2D)



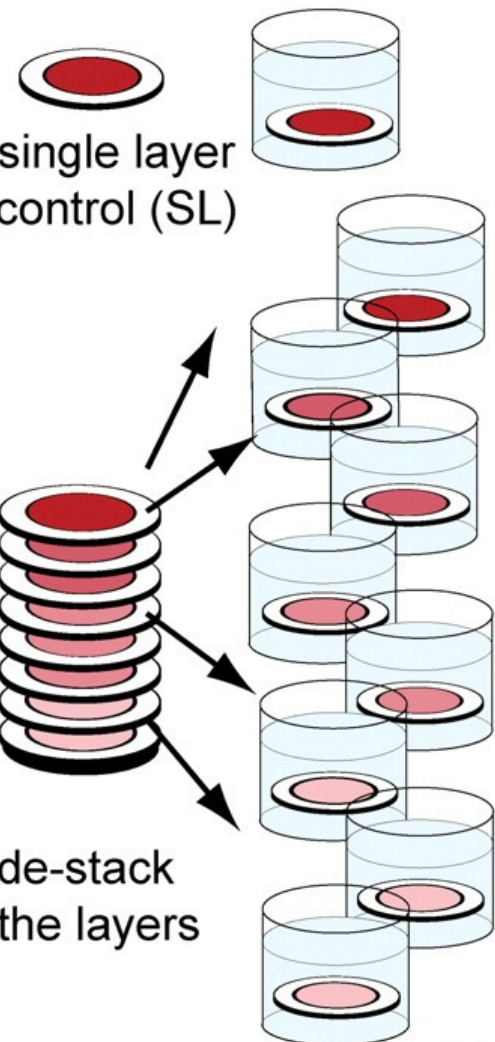
Collagen gel (3D)



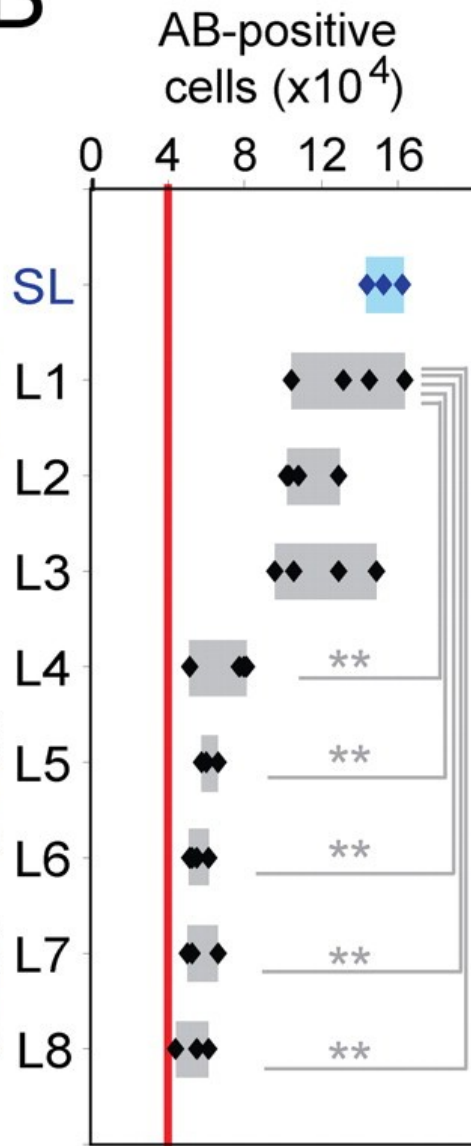


Kultivace na propustných a porézních materiálech

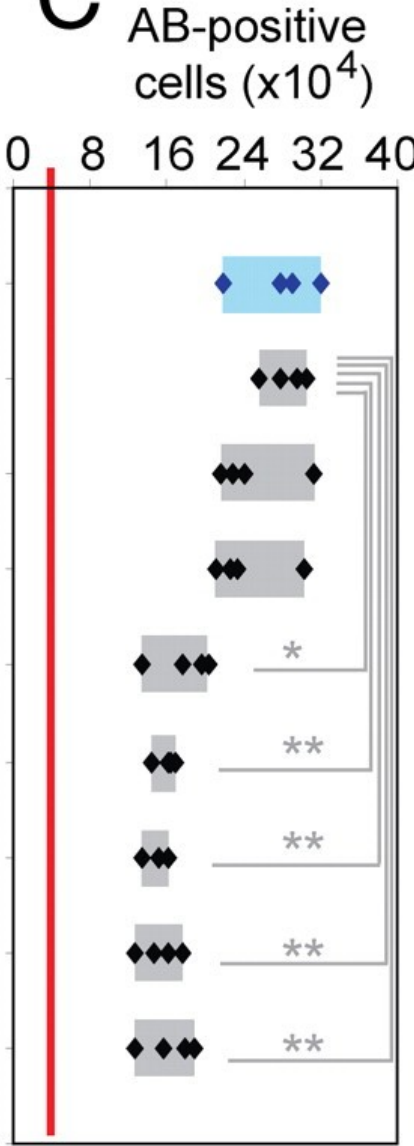
A



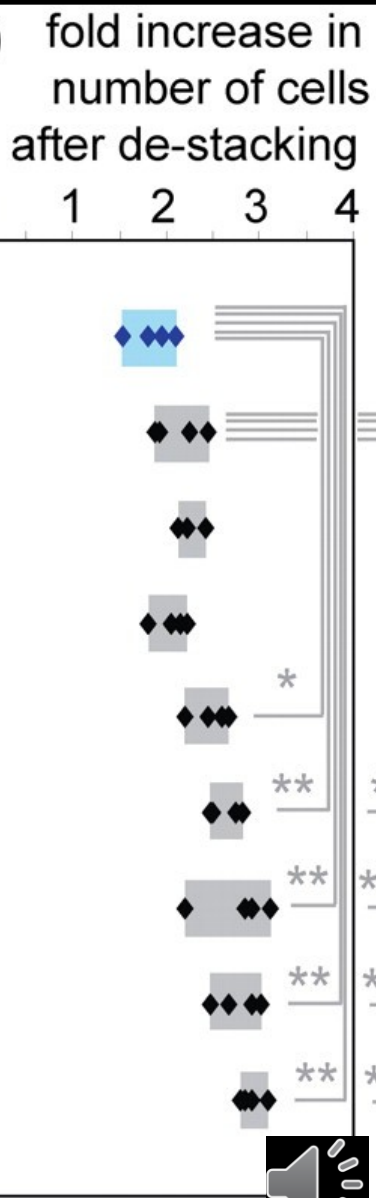
B



C



D



4 h after de-stacking and 4 days later



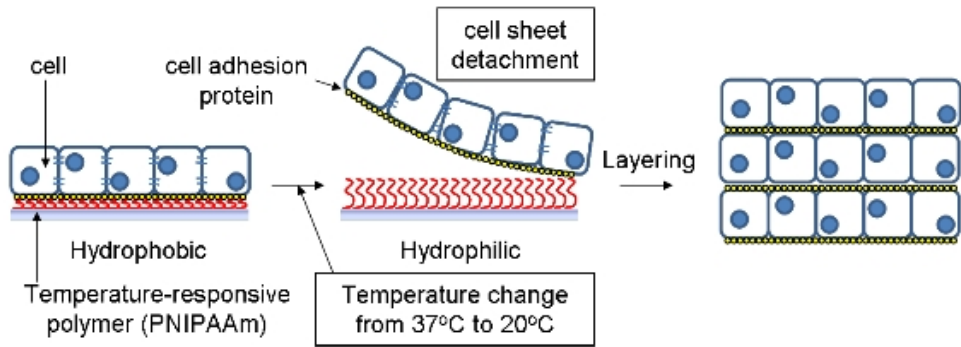
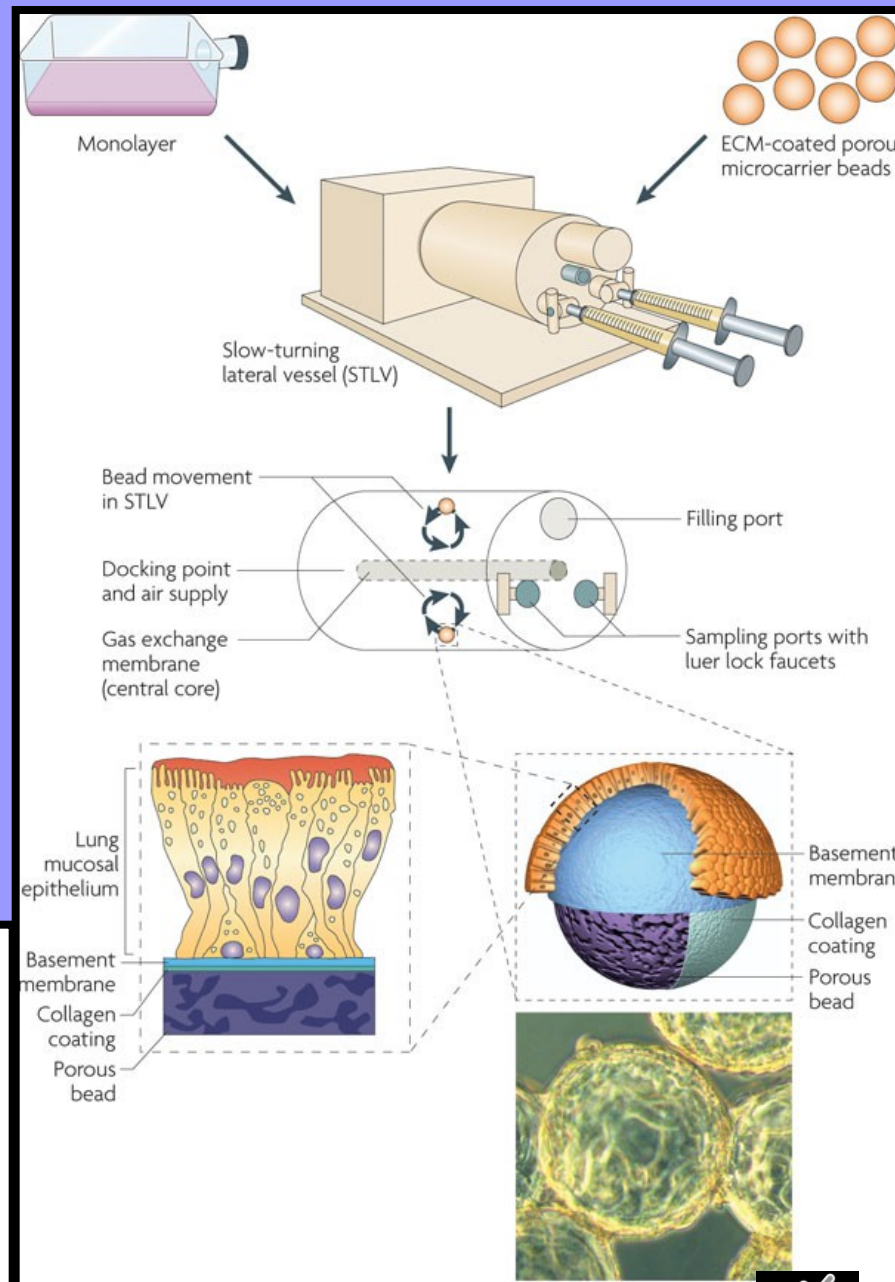
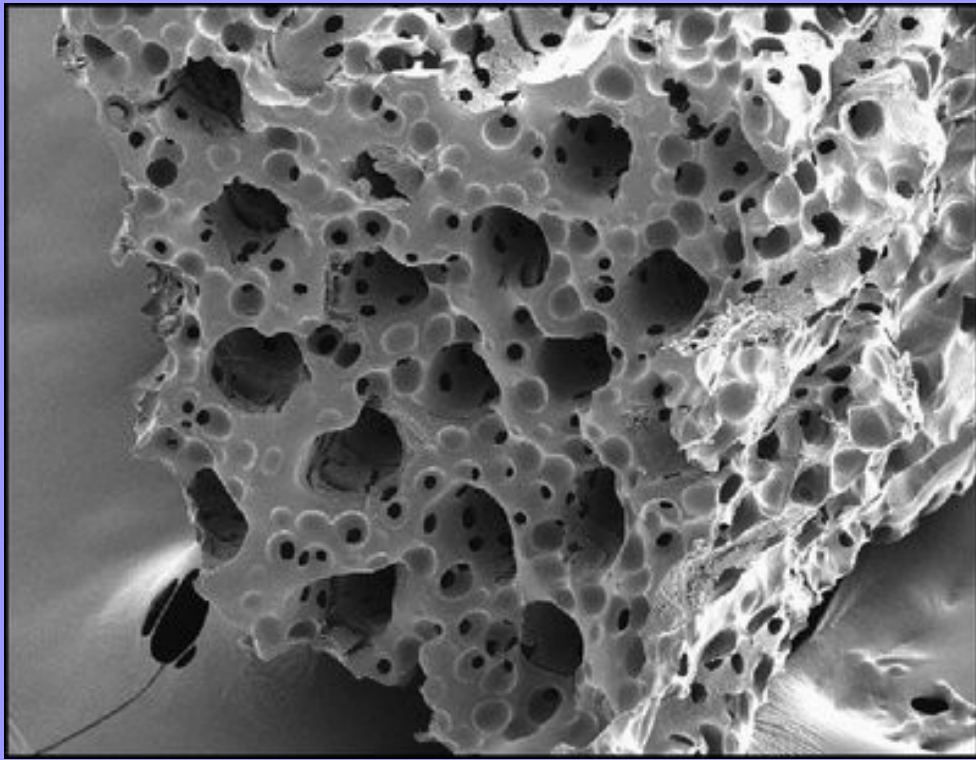
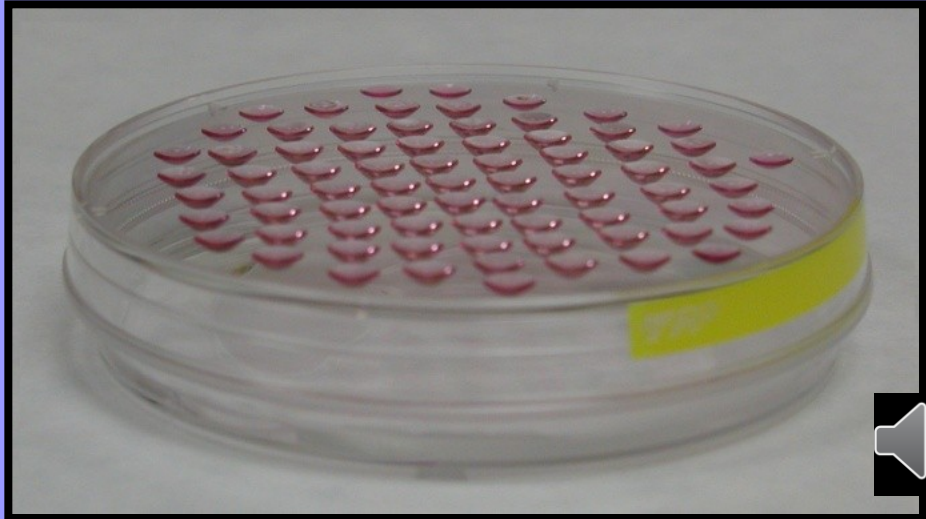
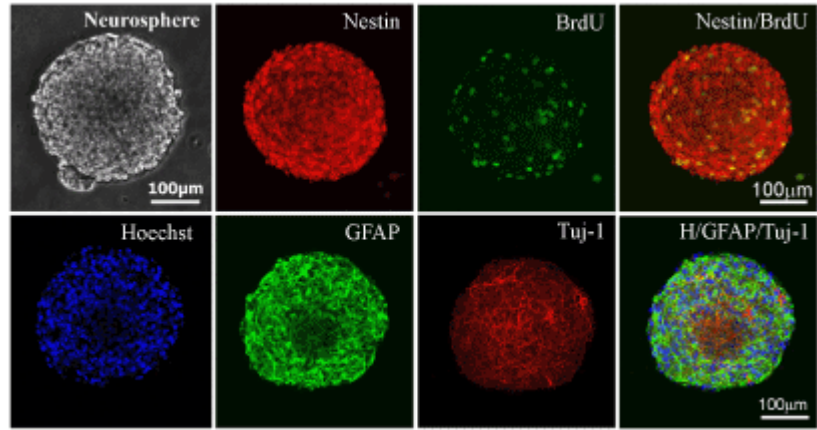
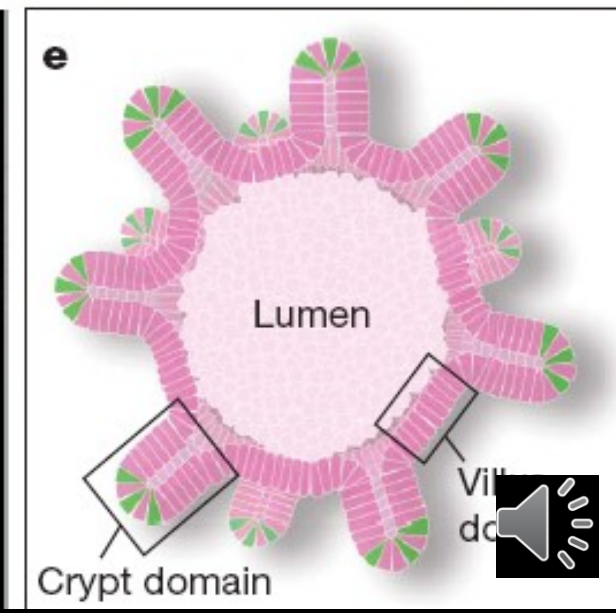
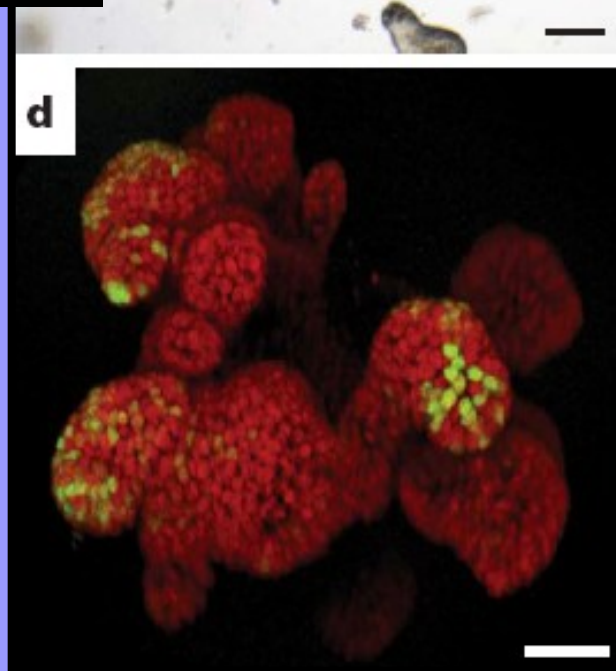
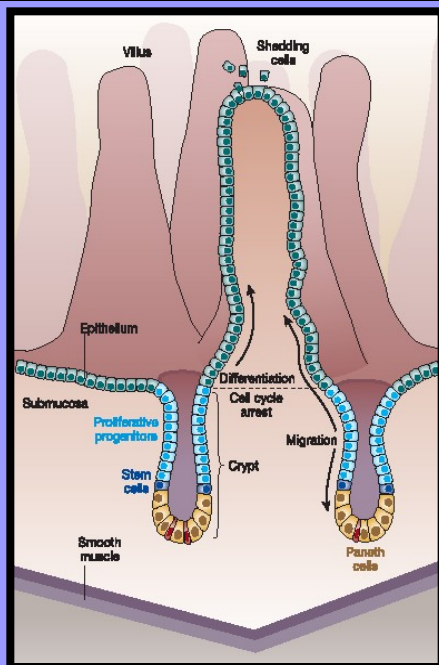
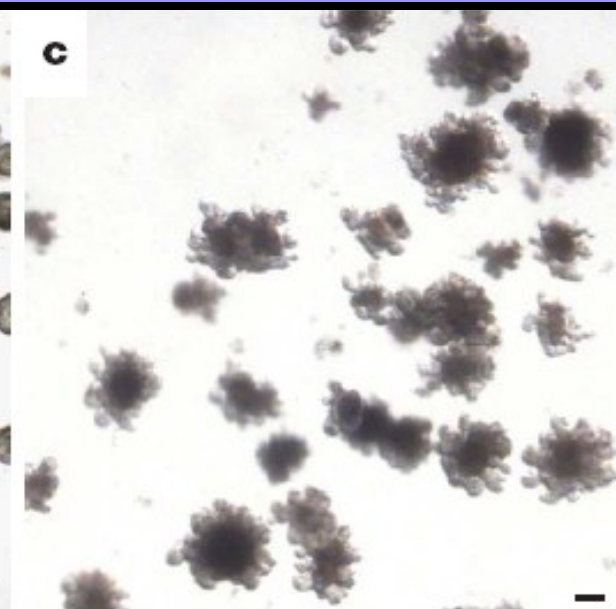
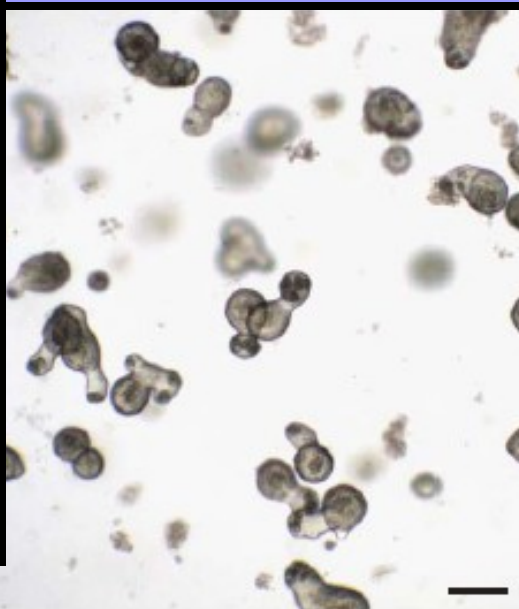
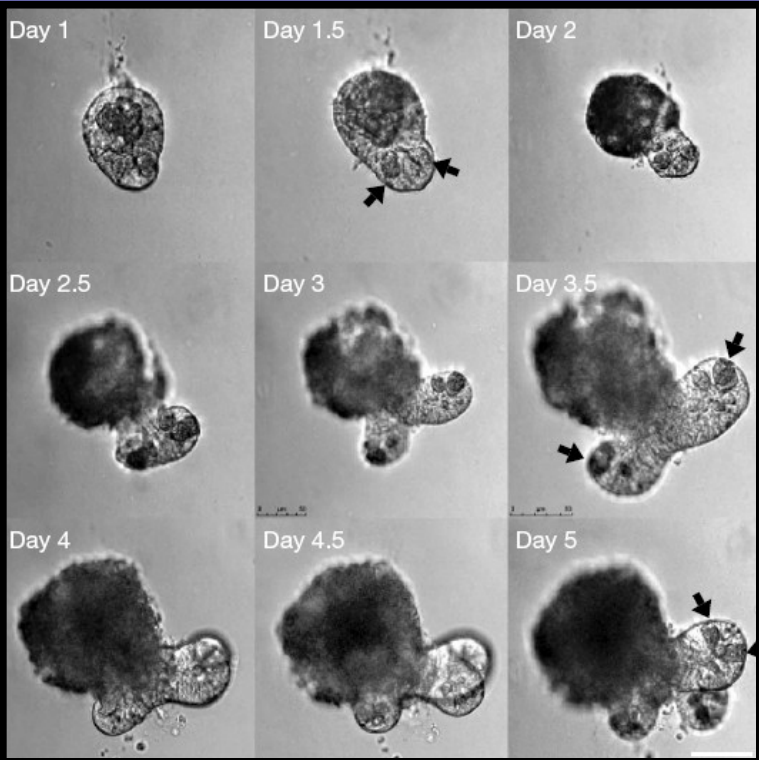


Figure 1b: Cell sheet engineering-- using temperature-responsive polymer.

Sféroidy & Organoidy

neurosféry
mamosféry
embryoidní tělíska





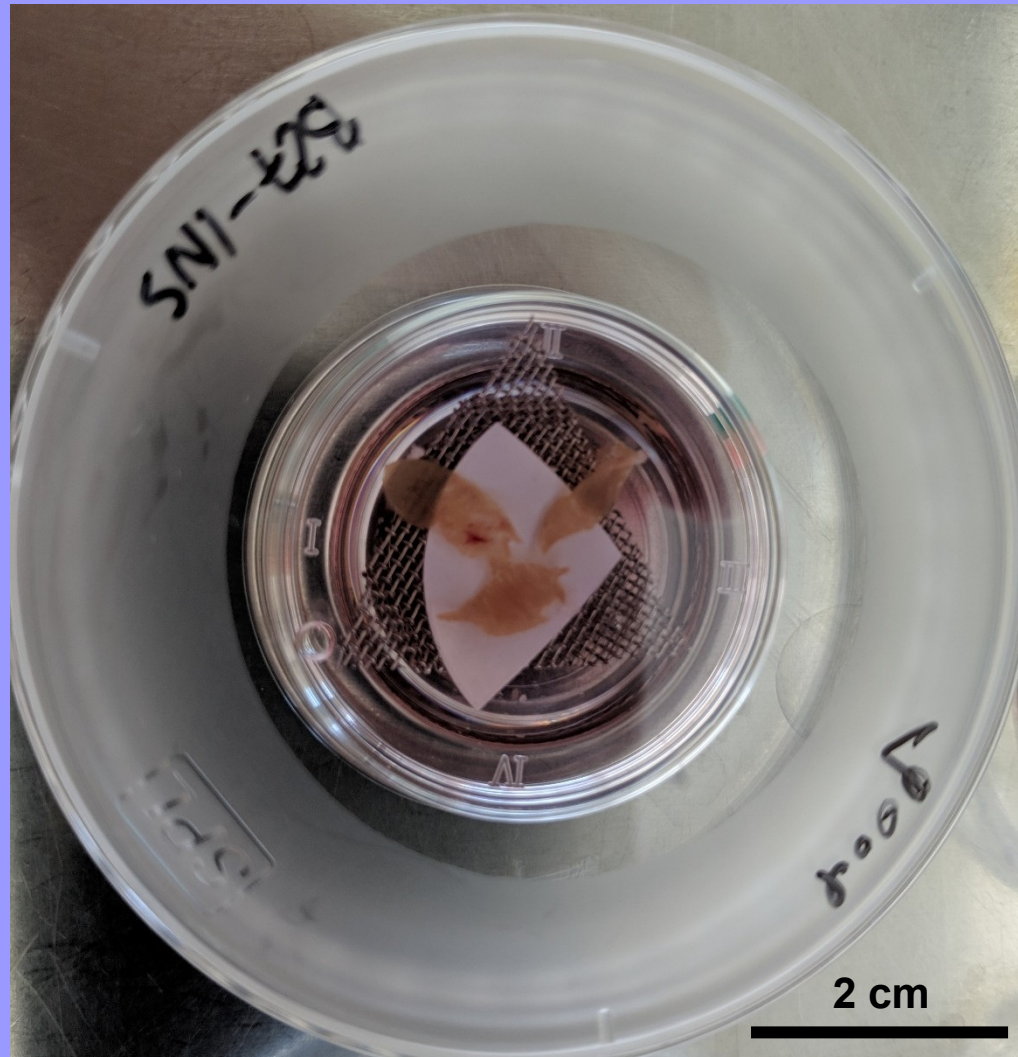
Tkáňové řezy - na pomezí kultivace buněk a tkání/orgánů

Vlastnosti (výhody x nevýhody)

- Dospělé, zdravé buňky, podobné buněčným primokulturám
- Žádné nebo omezené schopnosti expanze
- Zachování kontaktů mezi buňkami jako v tkáni
- Morfologie buněk jako v tkáni
- Částečné zachování 3D struktury tkáně (limit pro difúzi O₂, tloušťka řezu – max 300μm)
- Studie více odpovídají studiím na tkáních než jak je tomu u buněčných liniích
- Velmi omezená dostupnost lidských vzorků, ale lepší jak pro tkáně/orgány
- Výrazně jednodušší kultivace než tkání/orgánů
-atd.



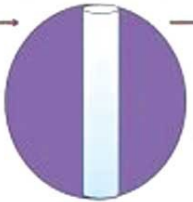
- **Kultivace na mřížce** = přísun média/živin z obou stran řezu
- **Nízký sloupec media nad vzorkem** = dostatečný přísun O₂
- **Vysoký sloupec média pod vzorkem (mřížkou)** = dostatečná pufrační kapacita pro pH a zplodiny metabolismu + dostatek substrátů pro metabolismus



Resection specimen of breast cancer



2-5 mm



Slicing

Thickness:
200 μ M;

Speed:
0.03 mm/s



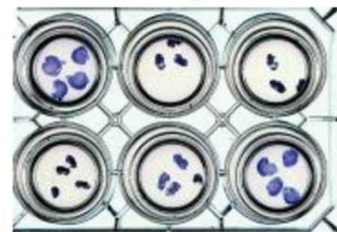
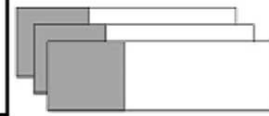
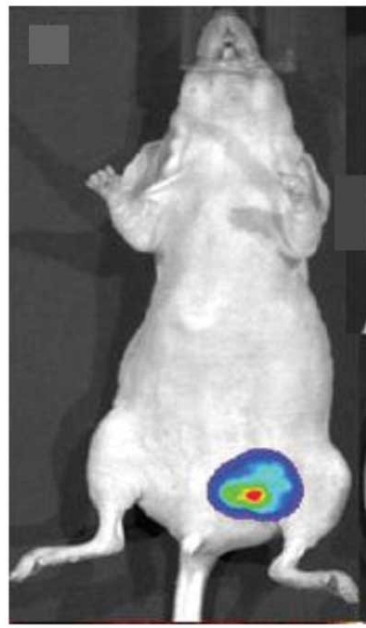
Leica Vibratome VT1200S



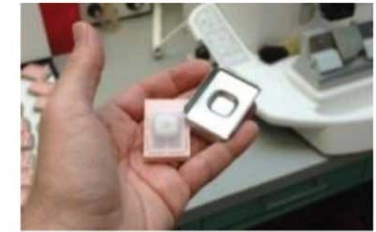
Compound treatment



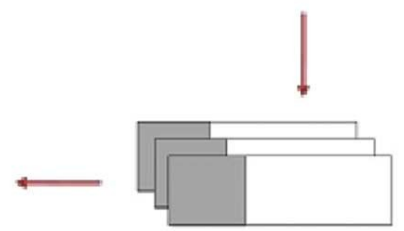
Cell culture 24-72 h



MTT assay



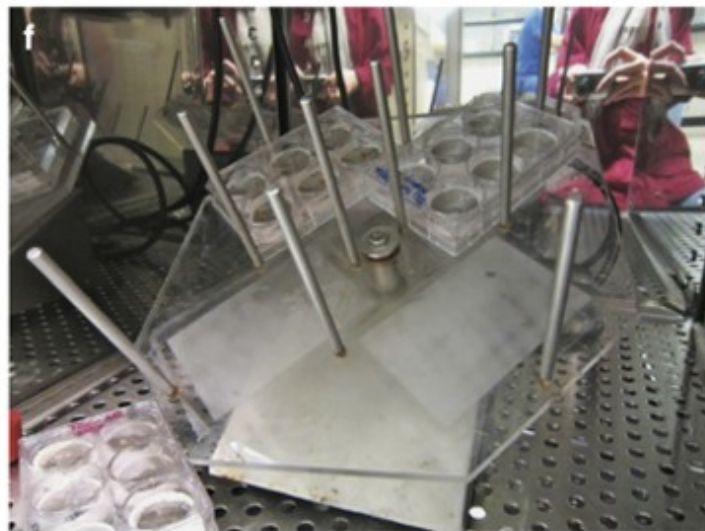
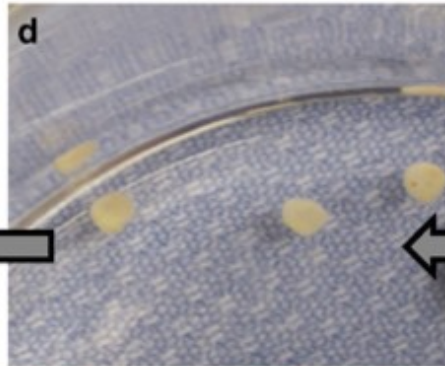
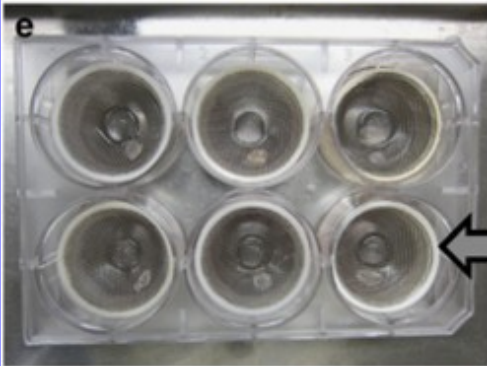
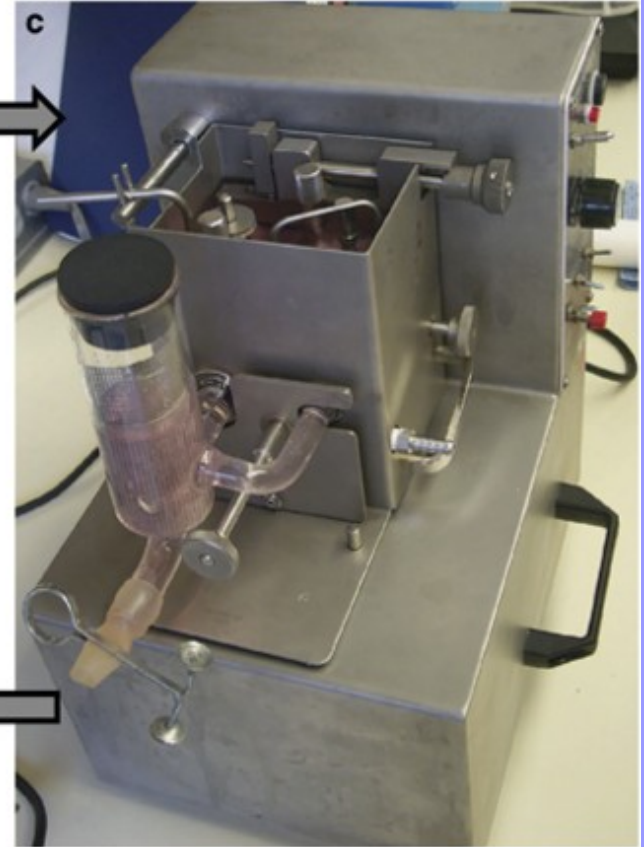
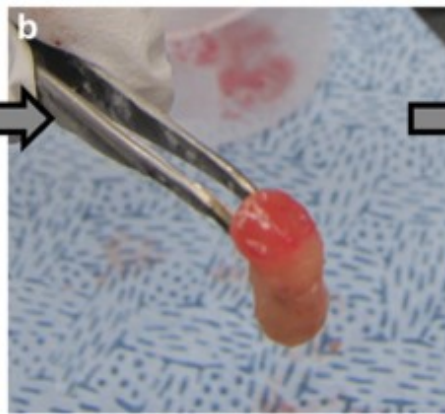
Paraffin embedding



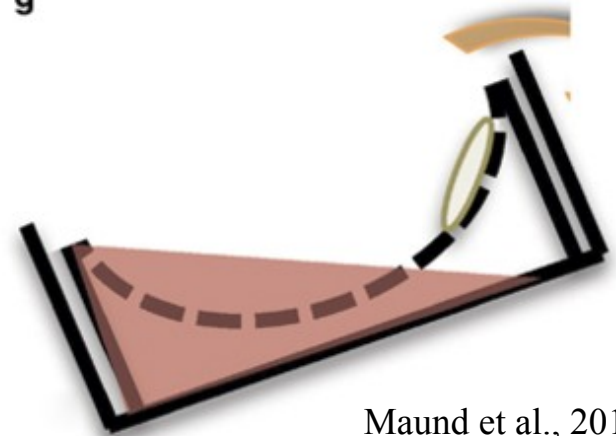
H/E and IHC staining

Vesci, et al., 2015





g



Přístroje pro tkáňové řezy

Krumdieck tissue slicer



Vibratome

