

Buněčné kultury

doc. RNDr. Jana Horáková, Ph.D.

2.4.2024

Osnova přednášky

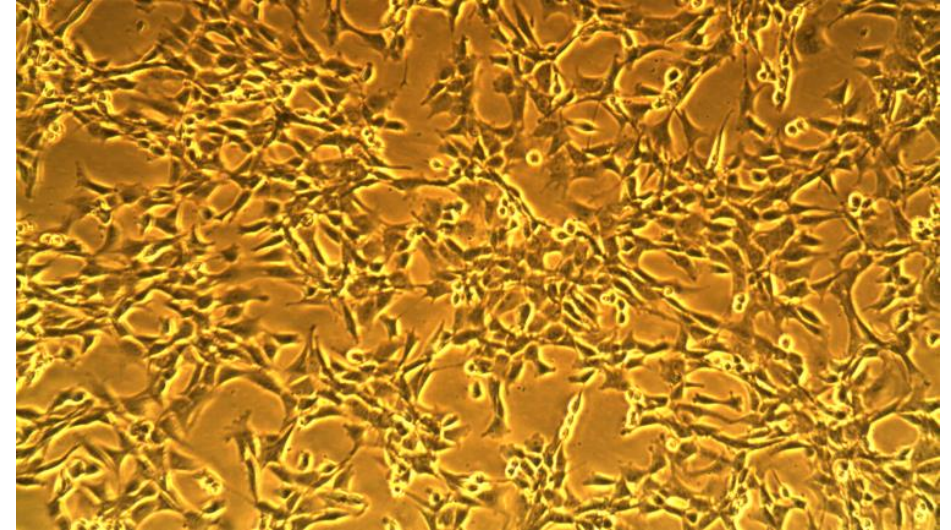
- Dělení buněčných kultur
- Kultivace buněk *in vitro*
- Měření metabolické aktivity buněk
- Testování cytotoxicity

Historie

- 50. léta 20. století
- Problém s kontaminací, s dlouhodobou kultivací
- Harry Eagle (1959) – první definované složení média pro kultivaci buněk (MEM médium)
- HeLa buňky – Henrietta Lacks – buňky karcinomu děložního čípku (1951)

Dělení buněčných kultur

- **Primární (primokultury)**
- **Sekundární (buněčné linie: HeLa, 3T3)**
- ❖ **Suspenní**
- ❖ **Adherentní**
- **Kmenové**
- **Tkáňově diferencované**



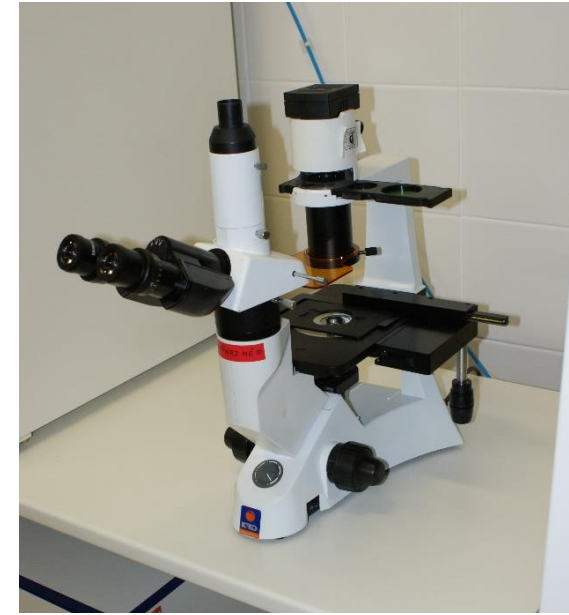
Buněčné kultury

Výhody

- Pokusy na izolovaném, dobře charakterizovaném buněčném typu
- Neomezené množství experimentů

Nevýhody

- Chybí interakce s ostatními buněčnými populacemi („tkáňový kontext“)
- Nefyziologické podmínky kultivace (umělé médium, vyšší tlak kyslíku)



Podmínky kultivace

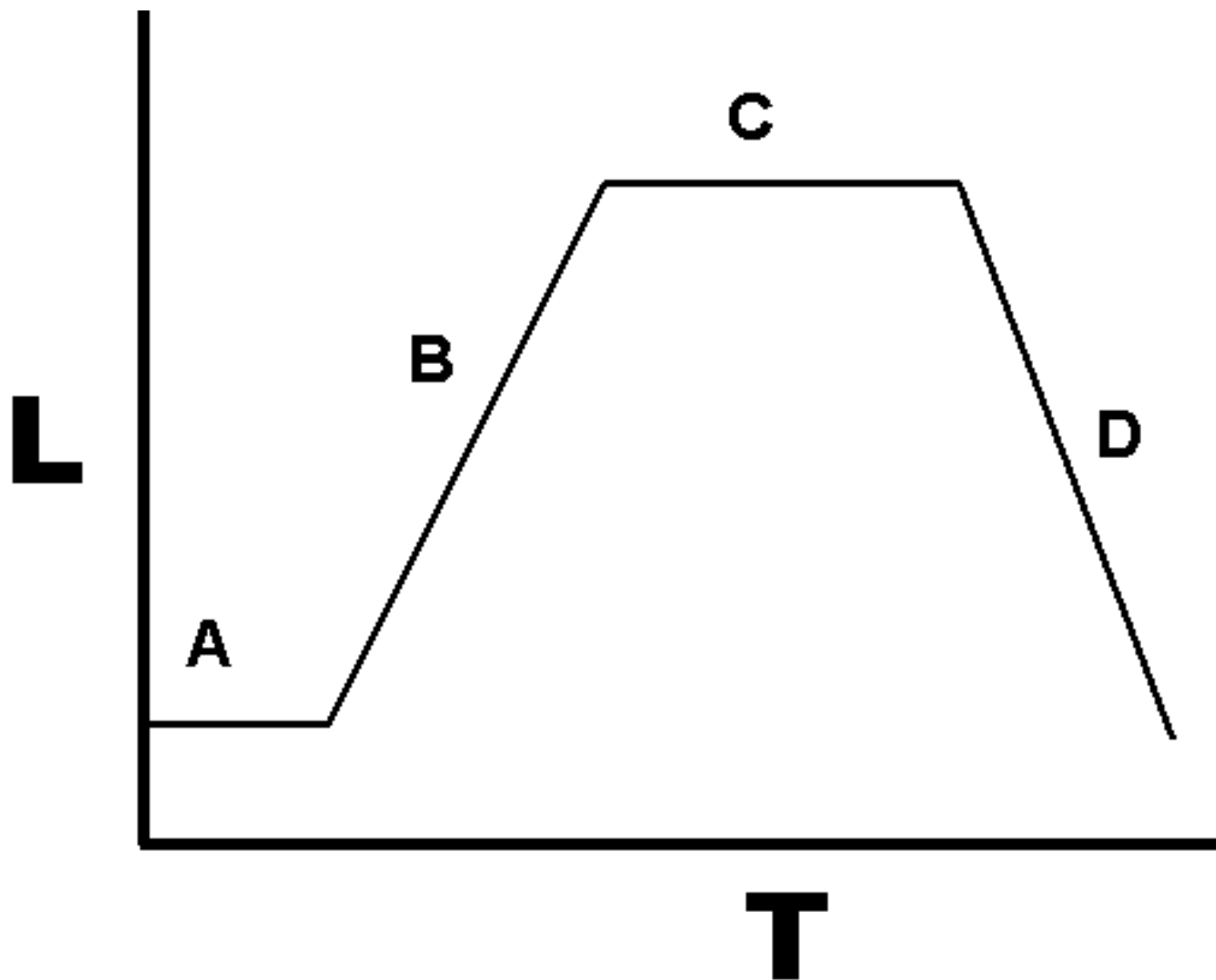
- Přísun cukrů, solí, aminokyselin, vitaminů, mastných kyselin, proteinů
- bikarbonátový pufrovací systém udržující pH v rozmezí 7,2-7,4
- 5% CO₂, 37°C
- pH indikátor: fenolová červeň - růžová barva při optimálním pH
žlutá - kyselé pH, fialová- zásadité pH
- Médium s obsahem 10% fetálního bovinního séra (FBS - proteiny, růstové faktory)
- Přídavek směsi antibiotik/antimykotik

Růst buněk v kultuře

Růstová křivka:

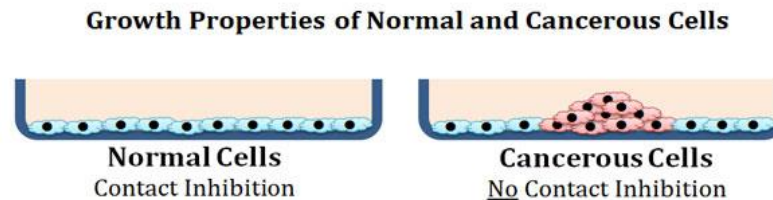
- A - **statická fáze (lag fáze)**: příprava na buněčné dělení
- B - **exponenciální (log) fáze**: intenzivní množení buněk do vyčerpání živin
- C - **stacionární fáze (plató)**: počet buněk se nemění, počátek akumulace toxických produktů
- D - **fáze odumírání**

- T (osa x)=čas
- L (osa y)=počet buněk



Růst buněk v kultuře

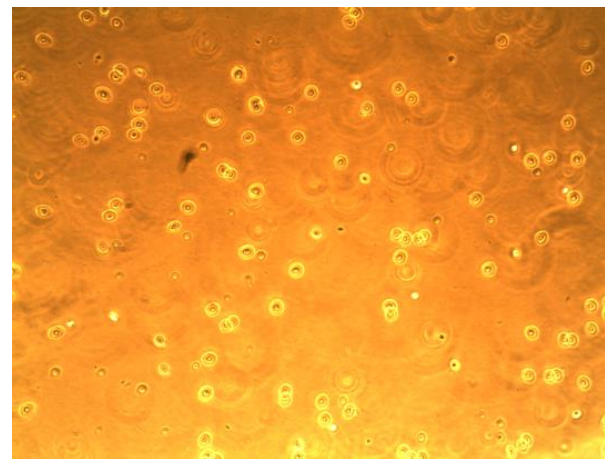
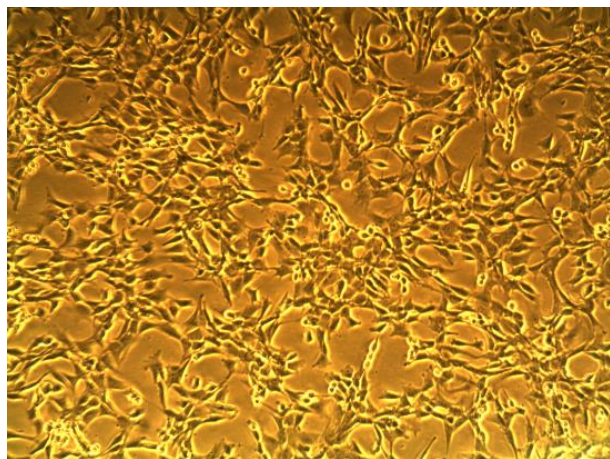
- Snaha o udržení log fáze (exponenciální nárůst počtu buněk)
- Kontaktní inhibice při dosažení konfluence
- Před dosažením plató fáze pasážování = subkultivace (naředění na takové množství, aby kultura opět rostla exponenciálně)
- Namnožení buněk pro experimenty, zamražení



Normal cells grow in a culture dish until they cover the surface as a monolayer. Cancerous cells grow in multilayered clumps and they pile up one above the other

Pasážování buněk

- Při dosažení 70-80% konfluence (souvislé vrstvy buněk) → „naředění buněk“
- Uvolnění adherentních buněk od kultivačního povrchu i od sebe navzájem, přenesení do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem
- Způsob: působení proteáz (trypsin), odstranění dvojmocných iontů (EDTA - chelatačně váže Ca^{2+} , Mg^{2+})

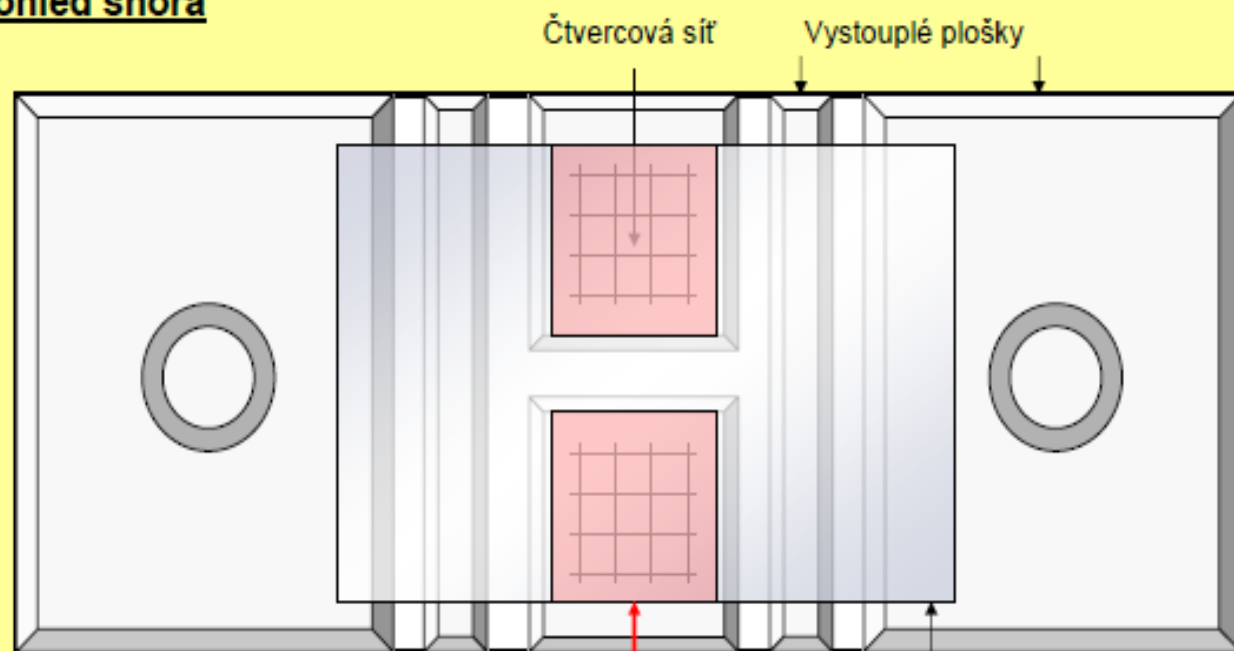


Počítání buněk

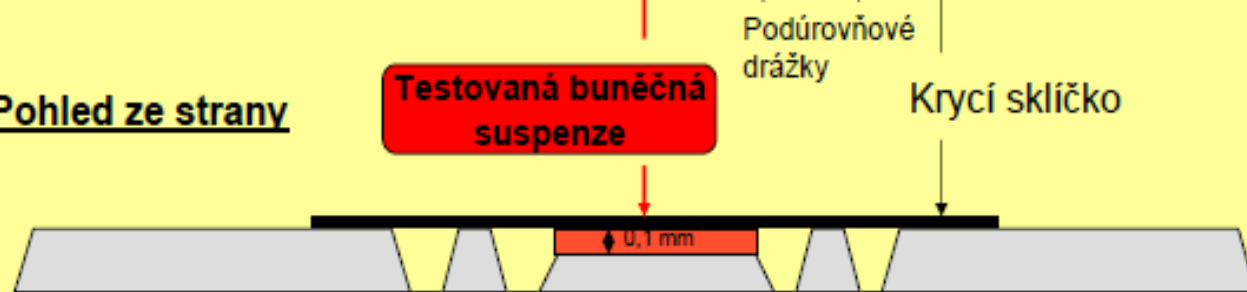
- Adherentní buňky – odhad konfluence
- V suspenzi – rychlé!!! (nepřirozené prostředí)
- Stanovení počtu buněk na 1 ml média
- Trypanová modř – rozlišení živých a mrtvých buněk → stanovení buněčné viability
 - Automatické analyzátory
 - Burkerova komůrka

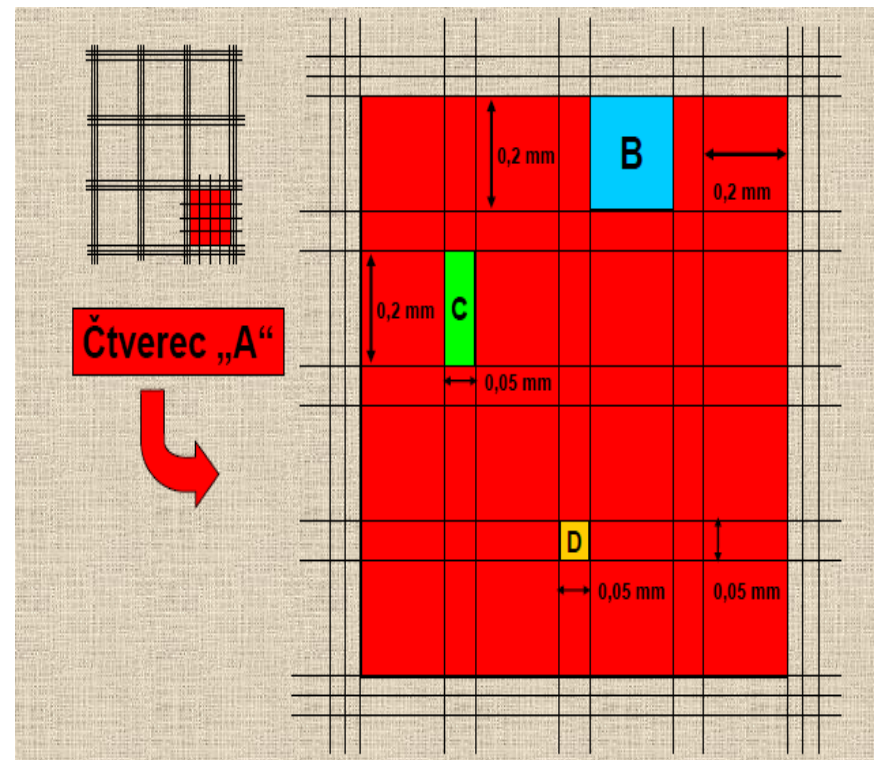
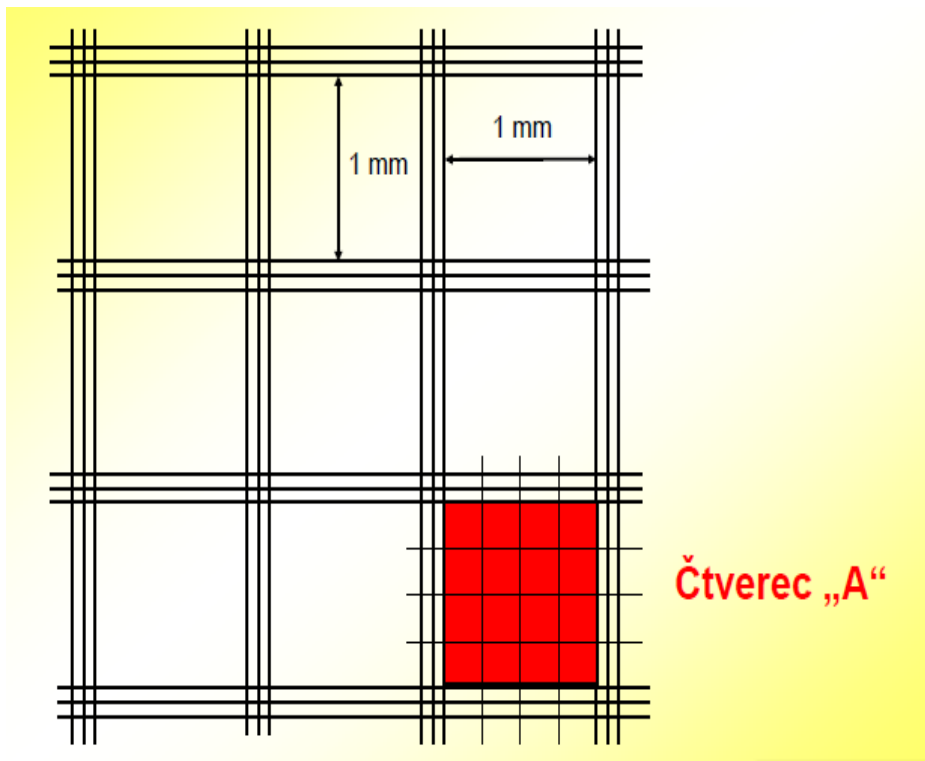
Bürkerova počítací komůrka

1. Pohled shora






2. Pohled ze strany

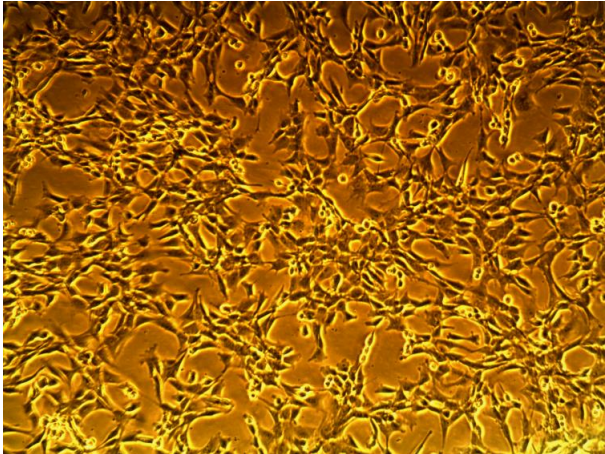




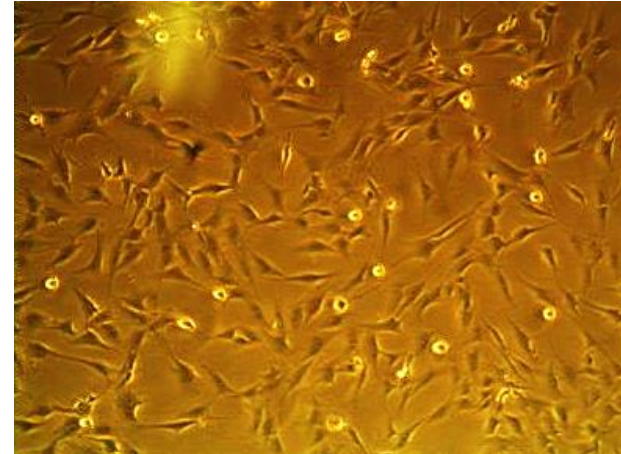
Rozměry Bürkerovy počítací komůrky

	rozměry (mm)	plocha (mm ²)	objem (mm ³)
 větší čtverec	0,2 x 0,2	$0,04 = \frac{1}{25}$	$0,004 = \frac{1}{250}$
 obdélník	0,05 x 0,2	$0,01 = \frac{1}{100}$	$0,001 = \frac{1}{1000}$
 menší čtverec	0,05 x 0,05	$0,0025 = \frac{1}{400}$	$0,00025 = \frac{1}{4000}$

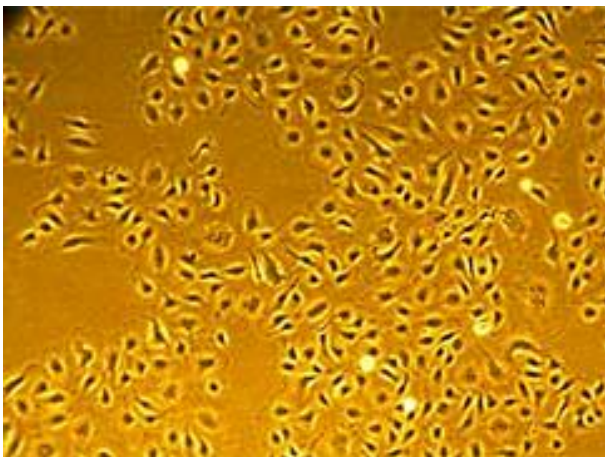
Příklady buněčných kultur



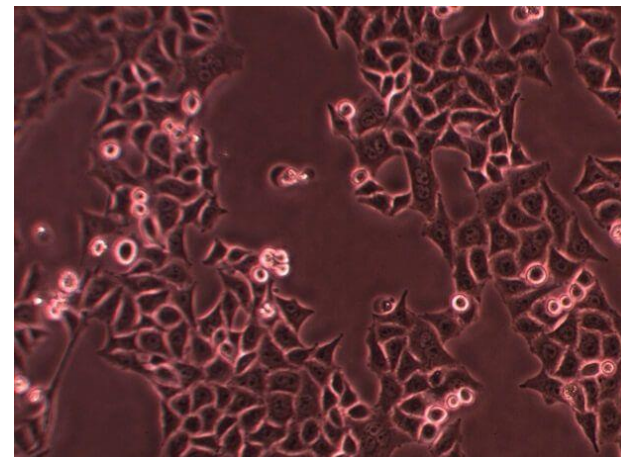
3T3 myší fibroblasty



MG 63 osteoblasty



Lidské endoteliální
buňky (HUVEC)



HeLa buňky

<https://www.youtube.com/watch?v=22IGbAVWhro>

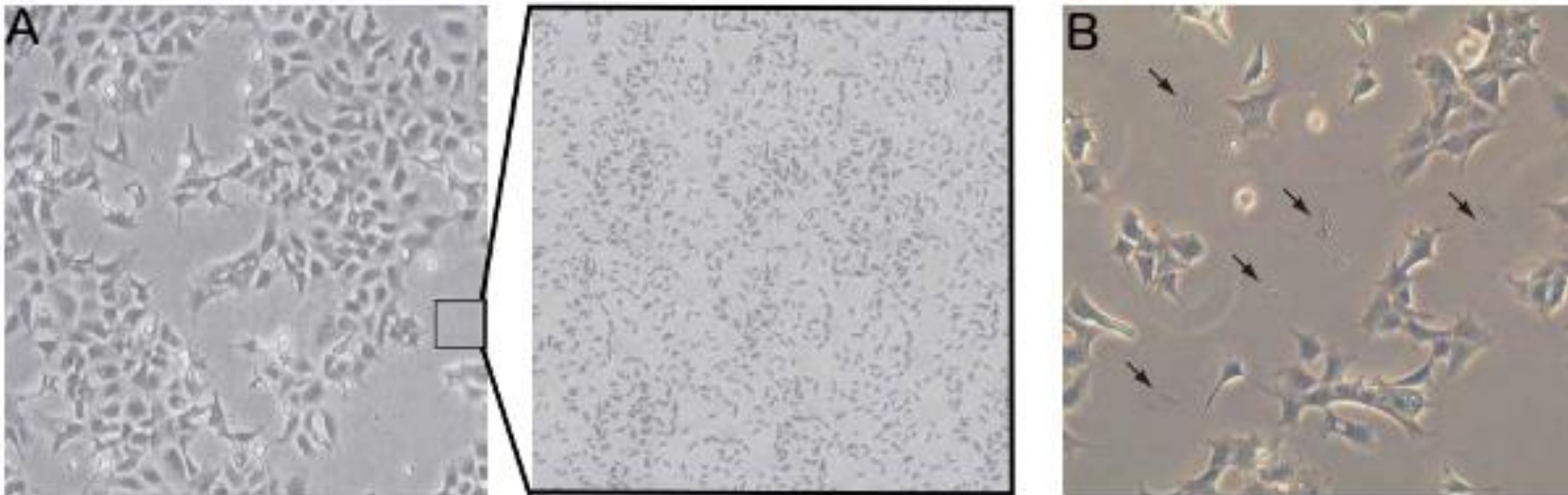
Uchovávání buněk

- Možnost dlouhodobého uchovávání v hlubokomrazícím boxu (-80°C) nebo v parách kapalného dusíku (-196°C)
- Přidání kryoprotektiv (DMSO, glycerol) – zabránění poškození krystaly vody při zmrazování buněk
- Záloha při kontaminaci, načasování pokusů



Kontaminace buněčných kultur

- **Bakterie** (přidávání antibiotik do kultivačních médií) – viditelné v mikroskopu
- **Mykoplasmata** – intracelulární parazité (nezjistitelné při mikroskopické kontrole), pravidelné testování na přítomnost mykoplasmat
- **Plísně, kvasinky** (přídavek antimykotik) – mikroskopie
- **Viry** – vzácně, obtížná detekce



Kontaminace bakteriální (A), kvasinková (B).

Opatření při kontaminaci

- Zpomalení proliferace, změna vlastností buněk
- Likvidace kultury
- Asanace laboratoře a inkubátoru
- Příprava nových kultivačních médií
- Obnovení kultury ze zmražené zálohy

Metabolické testy
Testování cytotoxicity

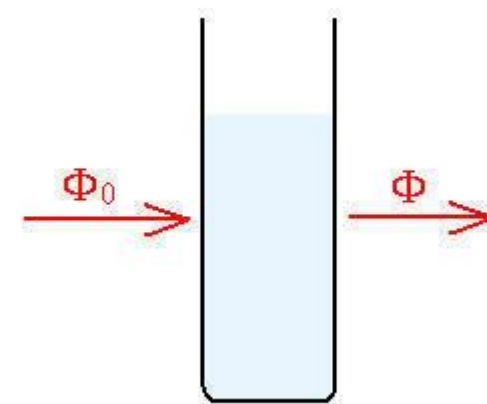
Spektrofotometrie

- Využití elektromagnetického záření (UV < 190 nm, VIS 190-780 nm) – průchod vzorkem
- Chromofor = látka absorbující elmag záření (část molekuly – např. aromatická jádra)
- Kvantifikace látek / buněk z rovnice kalibrační přímky



Spektrofotometrie

- Nejčastěji jsou metabolické testy založené na barevné reakci
 - Vyhodnocení probíhá na základě měření absorbance:
 - bezrozměrná veličina udávající, kolik světla bylo pohlceno měřeným vzorkem
 - Lambert-Beerův zákon
 - $A = \epsilon lc$
- A – absorbance
 ϵ – molární absorpční koeficient
l – délka absorbující vrstvy
c – koncentrace látky v roztoku



Metabolické testy

- Společně s mikroskopickými metodami patří mezi základní testy při *in vitro* buněčném testování
- Kvantifikace různých metabolických aspektů buněk
- Obecný postup: inkubace buněk s určitým substrátem → metabolizace buňkami → přeměna na detekovatelný produkt → detekce (nejčastěji fotometrie)
- Na trhu mnoho testů (MTT, WST - cck-8)
- Využití:
 - 1) stanovení cytotoxicity roztoků, pevných látek
 - 2) sledování míry proliferace buněk na biomateriálech

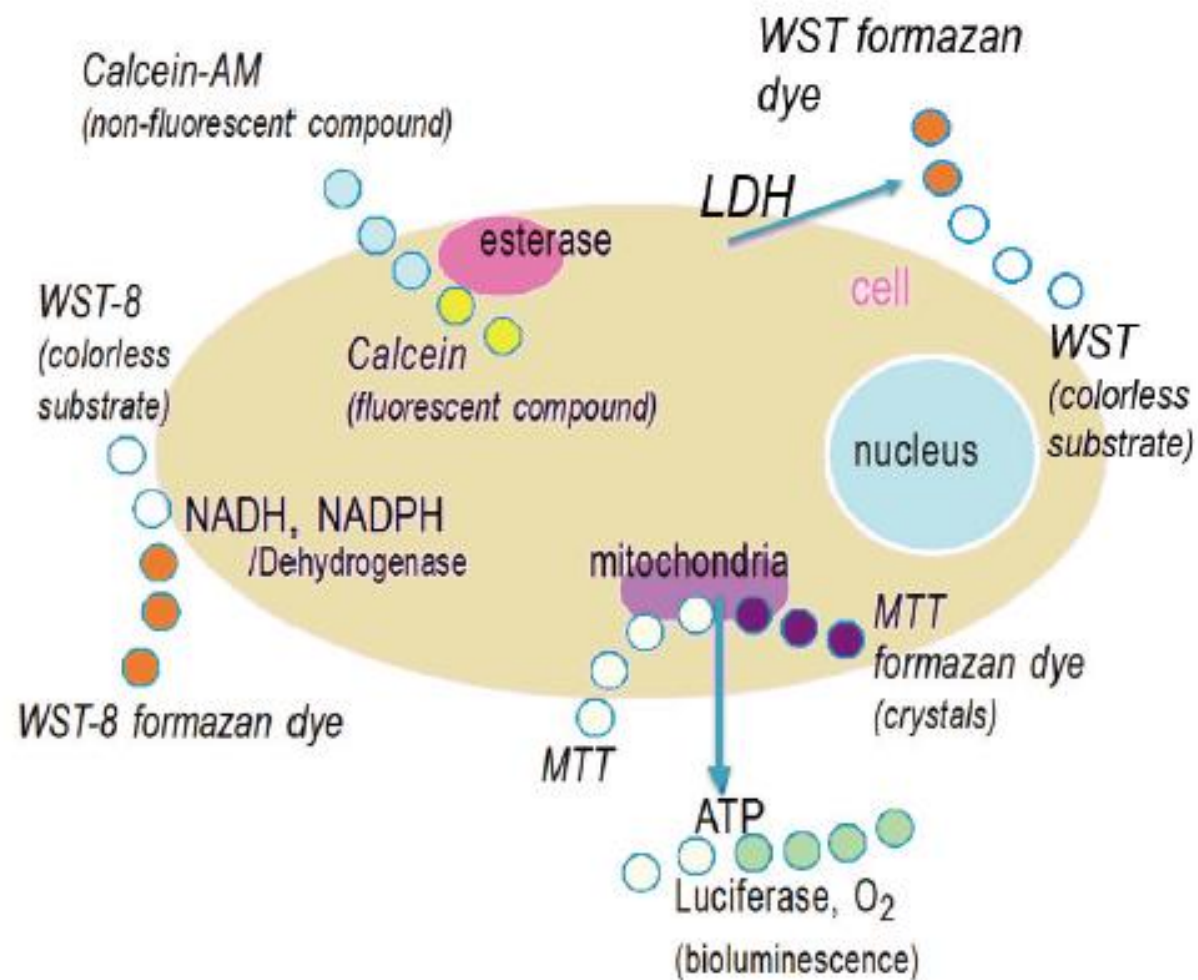
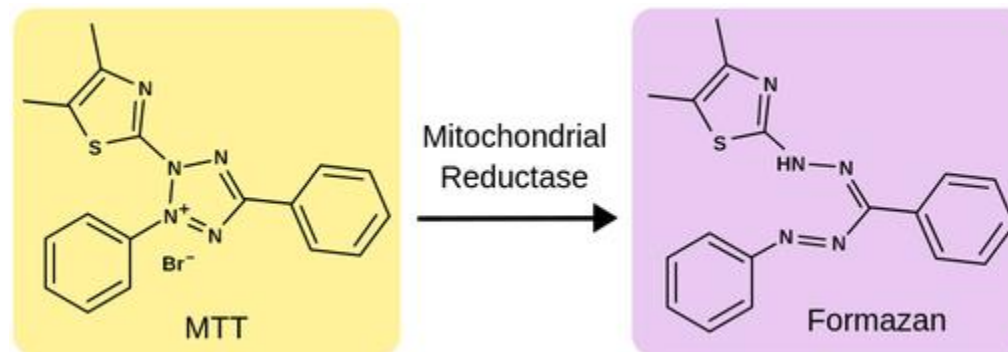


Fig.1 Cell Viability Assays

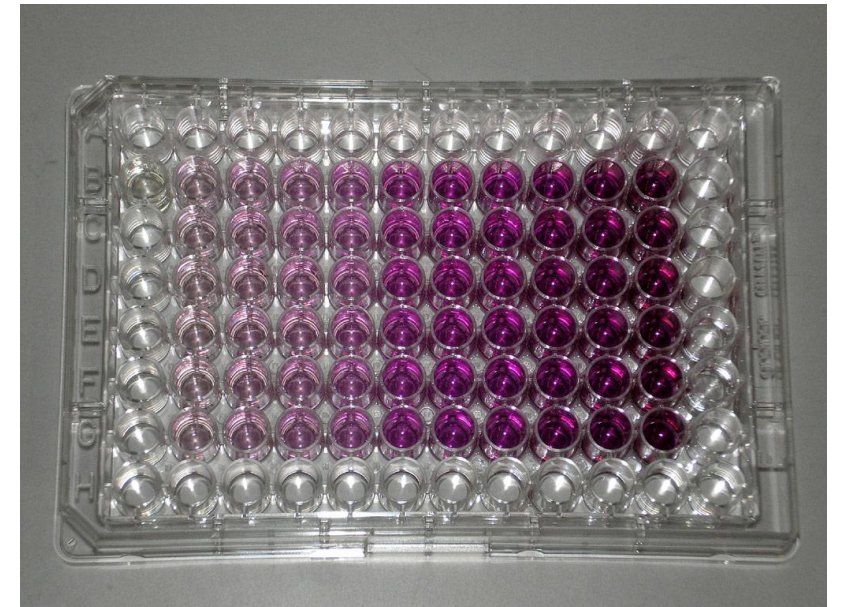
MTT test

- https://www.youtube.com/watch?v=8k8NtmpaP_U
- Žlutý roztok MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) – interakce s mitochondriálními enzymy → přeměna na fialový formazan



Provedení MTT testu

- Nasazení buněk do 96jamkové mikrotitrační destičky → adheze a adaptace v novém prostředí 24 hodin
- Přidání substrátu (MTT)
- Inkubace 2-4 hodiny (pozorování vzniku fialových krystalů)
- Opatrné odsátí média (zdroj chyb!!!) → rozpuštění fialových krystalů pomocí okyseleného isopropanolu
- Měření absorbance při 570 nm a 650 nm (referenční vlnová délka)



Dostupné z:

https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay#/media/File:MTT_Plate.jpg

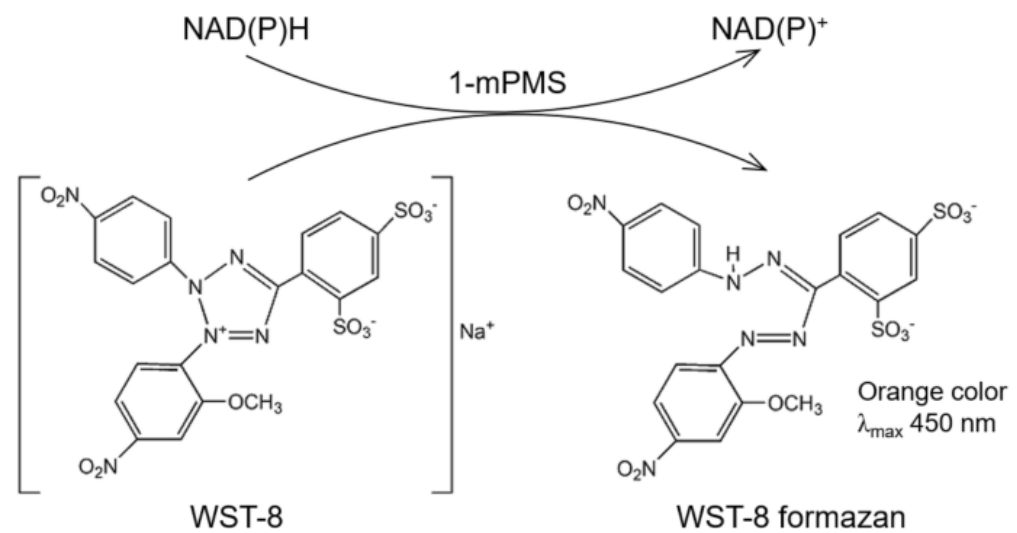
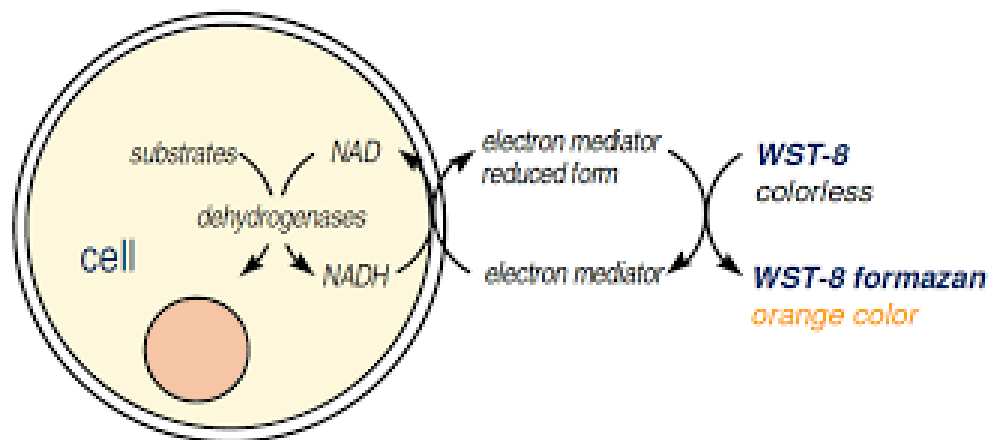
22.8.2022

WST testy

- WST = Water soluble tetrazolium salt
- Používá se bezbarvý substrát, produktem je vodorozpustný detekovatelný (barevný) produkt
- větší senzitivita → závisí na aktivitě všech dehydrogenáz - NAD(H), NADP(H)
- Např. cck-8 (Cell Counting Kit): kratší inkubace (1-2 hodiny) → měření absorbance při 450 nm

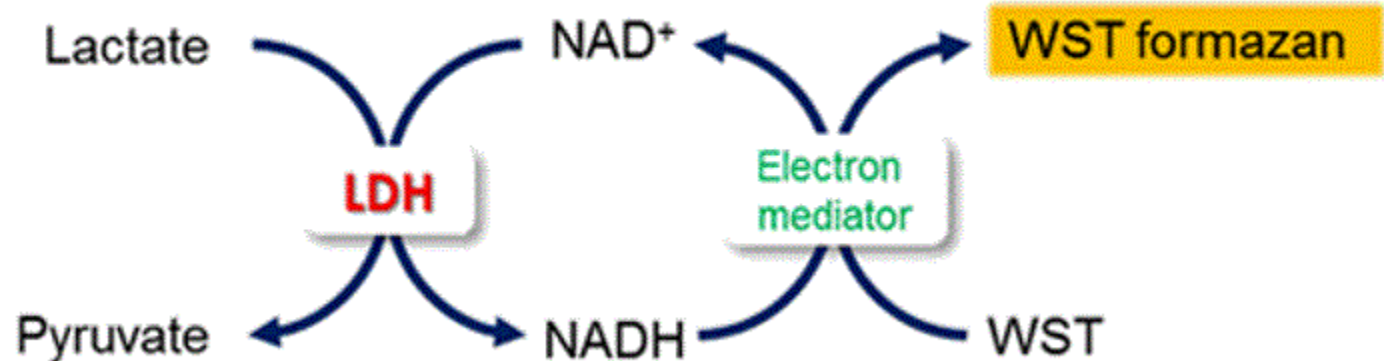
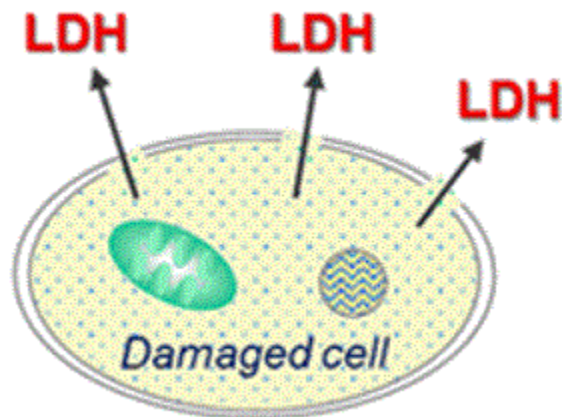


<https://www.youtube.com/watch?v=VHXbya6y4qg>



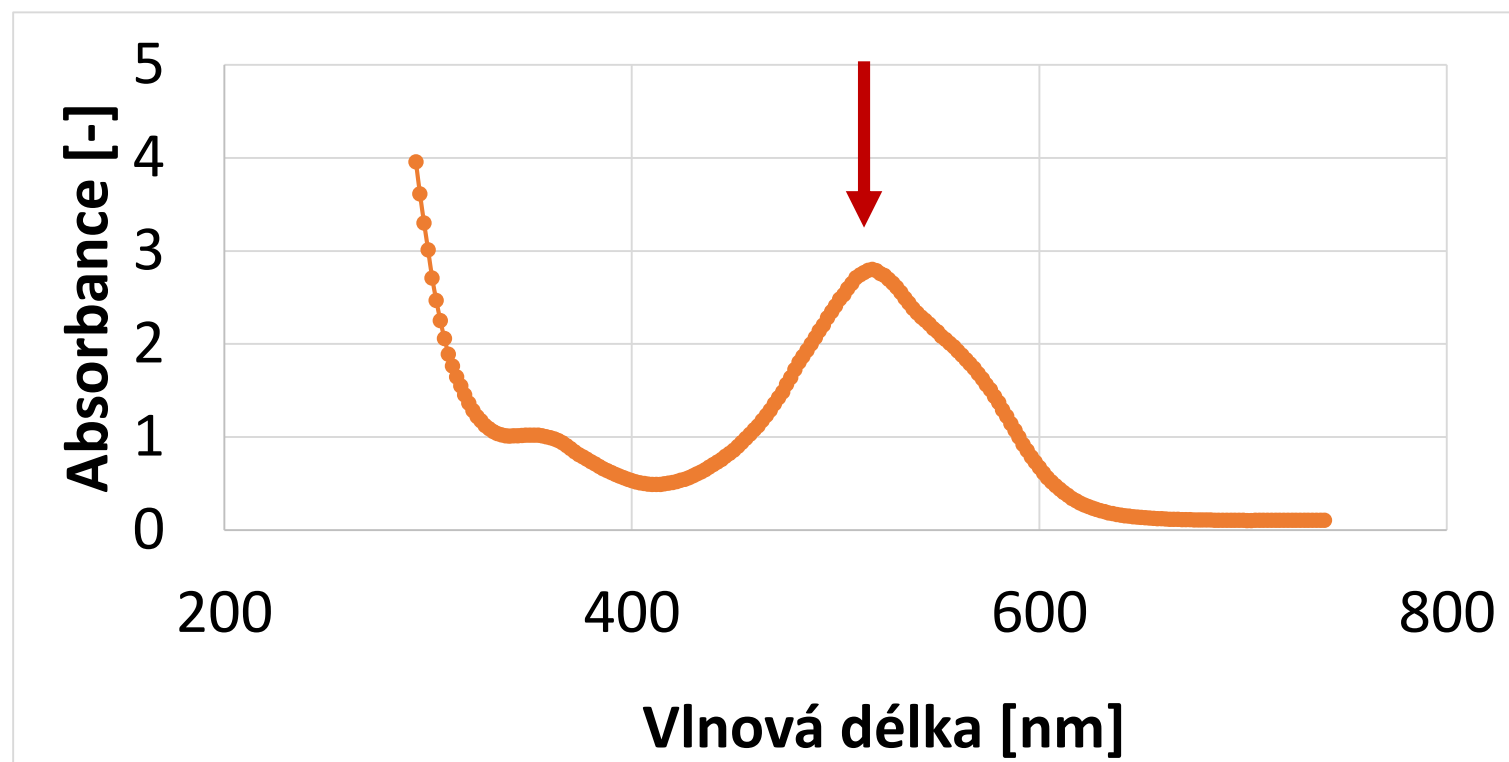
LDH assay

- Laktát dehydrogenáza = oxidoredukční enzym katalyzující přeměnu laktátu na pyruvát, výskyt v cytoplazmě buněk → při poškození cytoplazmatické membrány uvolnění do okolí
- Měření uvolněného LDH = míra cytotoxicity
- Kit obsahující WST → žluté zbarvení roztoku → absorbance



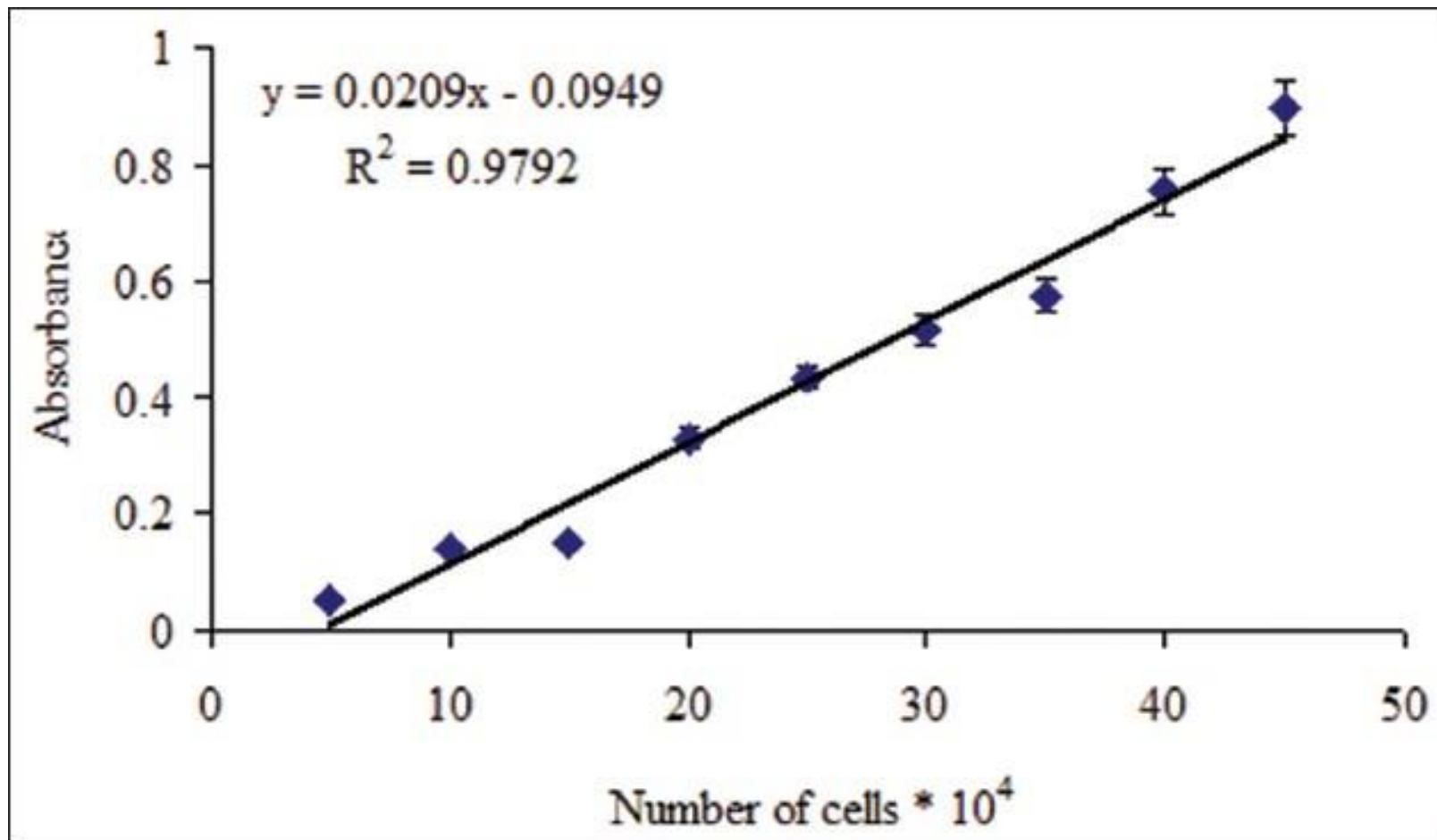
Provedení měření

1) Nalezení vhodné vlnové délky proměřením celého spektra (pokud není již známa např. od dodavatele kitu)



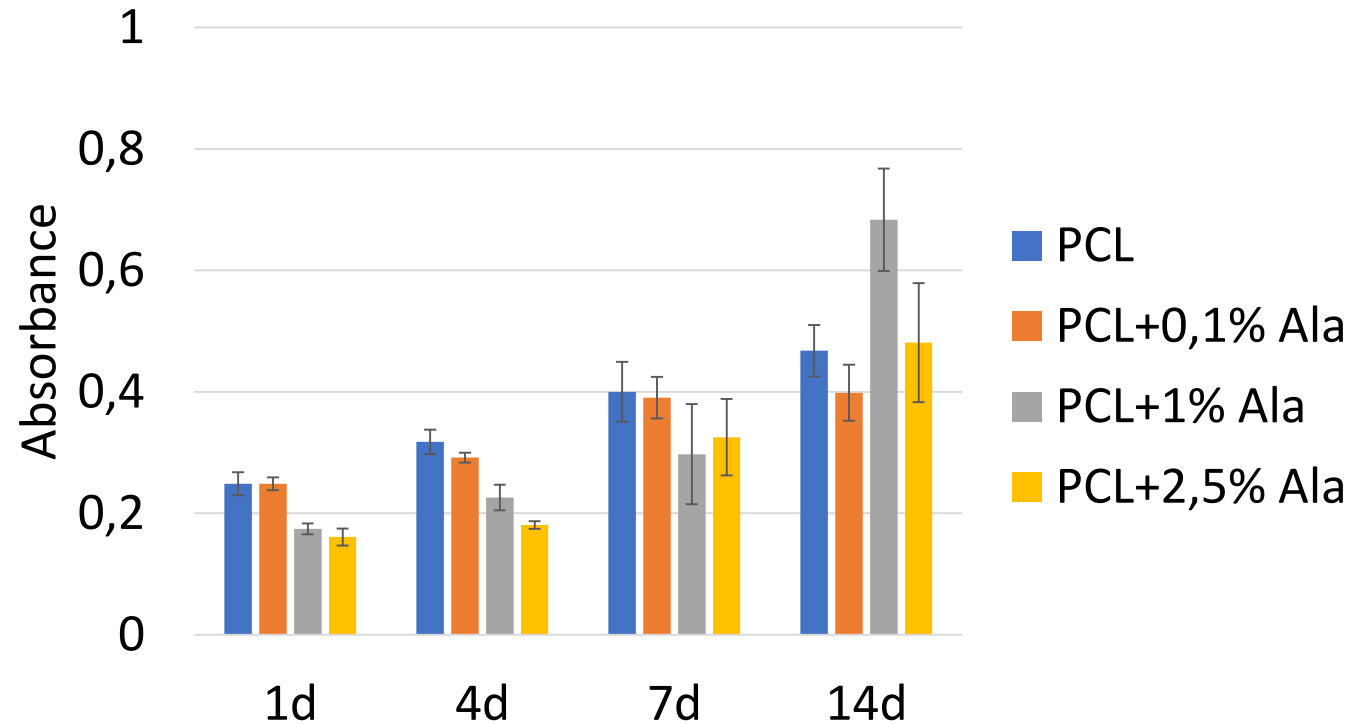
2) Proměření **kalibrační přímky** (alespoň 5 bodů, více opakování),
zobrazení korelačního koeficientu, rovnice přímky

➤ ověření lineární závislosti (u větších koncentrací cca ≥ 1 nutné ředění
roztoku)



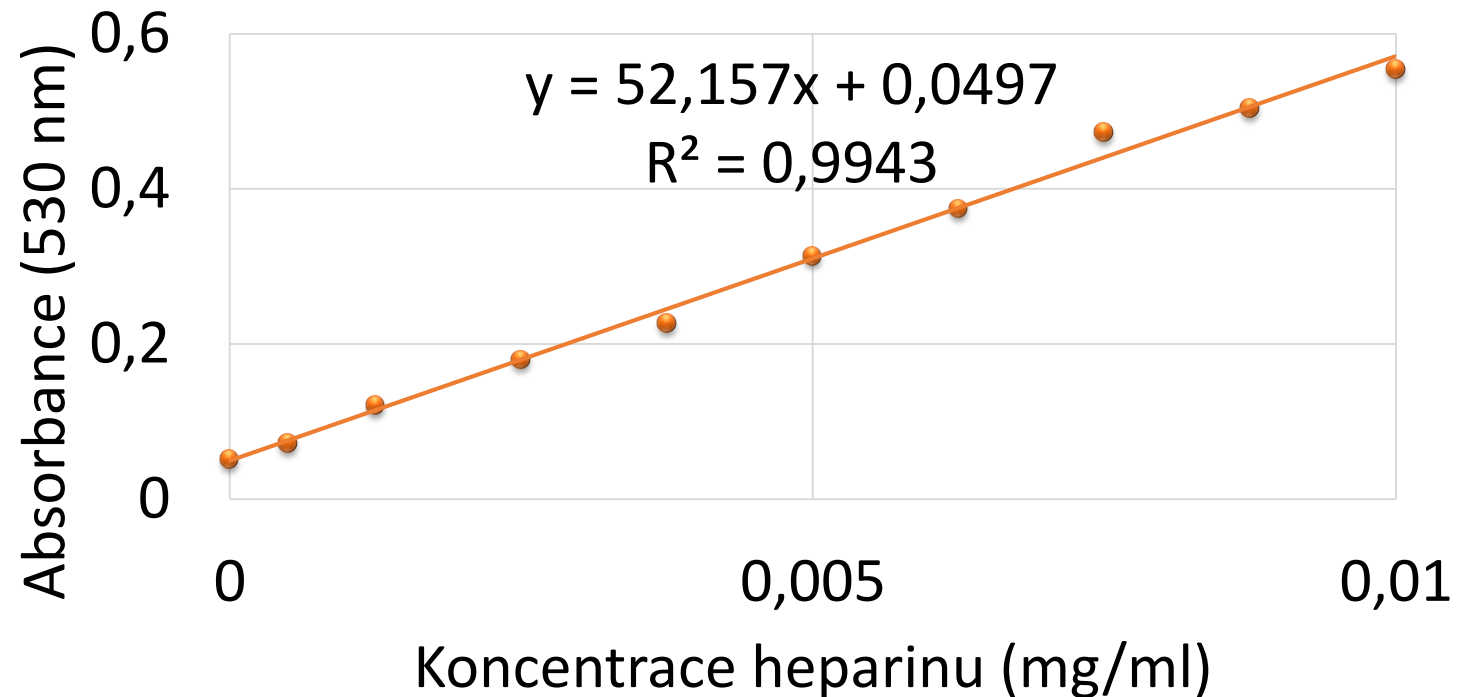
3) Proměření vzorků neznámé koncentrace buněk

- u metabolické aktivity buněk se výsledek udává jako naměřená absorbance (porovnání s kontrolami, mezi testovanými vzorky)
- neprovádí se přepočet na množství buněk (nepřesné)



Spektrofotometrie využitelná i pro měření uvolňování aktivních látek

3) Proměření vzorků neznámé koncentrace látky z naměřené hodnoty absorbance ($A = y$), výpočet z rovnice kalibrační přímky



Testování cytotoxicity

- Neexistuje přesný návod – záleží na konečném použití / zamýšlené aplikaci
- Buněčné linie / primární buněčné kultury
- Sterilizace a „zacházení“ s materiálem mohou silně ovlivnit výsledky testování
- Podmínky testování (složení extrakčního média, doba inkubace, statická / dynamická inkubace, koncentrace testovaného materiálu)
- Interpretace výsledků!!!

Testování cytotoxicity

- Navrhněte způsob testování cytotoxicity roztoku (např. antibiotika)
- Navrhněte způsob testování cytotoxicity pevné látky (např. nanovláknenného materiálu s obsahem antibiotik)

ISO 10993-5

- **Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Zkouška na cytotoxicitu in vitro**

3 kategorie zkoušek: extrakt/přímý styk/nepřímý styk

→ posouzení poškození buněk morfologickými prostředky

→ měření poškození buněk

→ měření růstu buněk

→ měření specifických aspektů buněčného metabolismu

Cytotoxicita extraktů

- Použití u pevných materiálů (tkáňové nosiče) → ponoření do extrakčního média
- Funkcionalizované materiály – uvolnění aktivní látky do extrakčního média!!!
- Důležitá správná příprava extraktů – extrakční činidlo (kompletní médium / médium bez séra / pufr / olivový olej), doba extrakce, podmínky extrakce (teplota, statická / dynamická extrakce – shaker), koncentrace (plocha / váha materiálu na 1 ml extrakčního média pro porovnání výsledků)

Testování cytotoxicity

- **Pozitivní kontrola** – materiál vyvolávající reprodukovatelnou cytotoxickou odezvu (PUR, fenol, Triton X-100)
- **Slepý vzorek** – extrakční činidlo bez vzorku (kultivační médium se sérem / bez séra, fyziologický roztok)
- **Negativní kontrola** – materiál, který nevyvolává cytotoxickou odezvu (HMWPE)
- Podmínky extrakce dle povahy a účelu použití testovaného materiálu (24 h, 37°C)

Testování cytotoxicity pomocí MTT testu

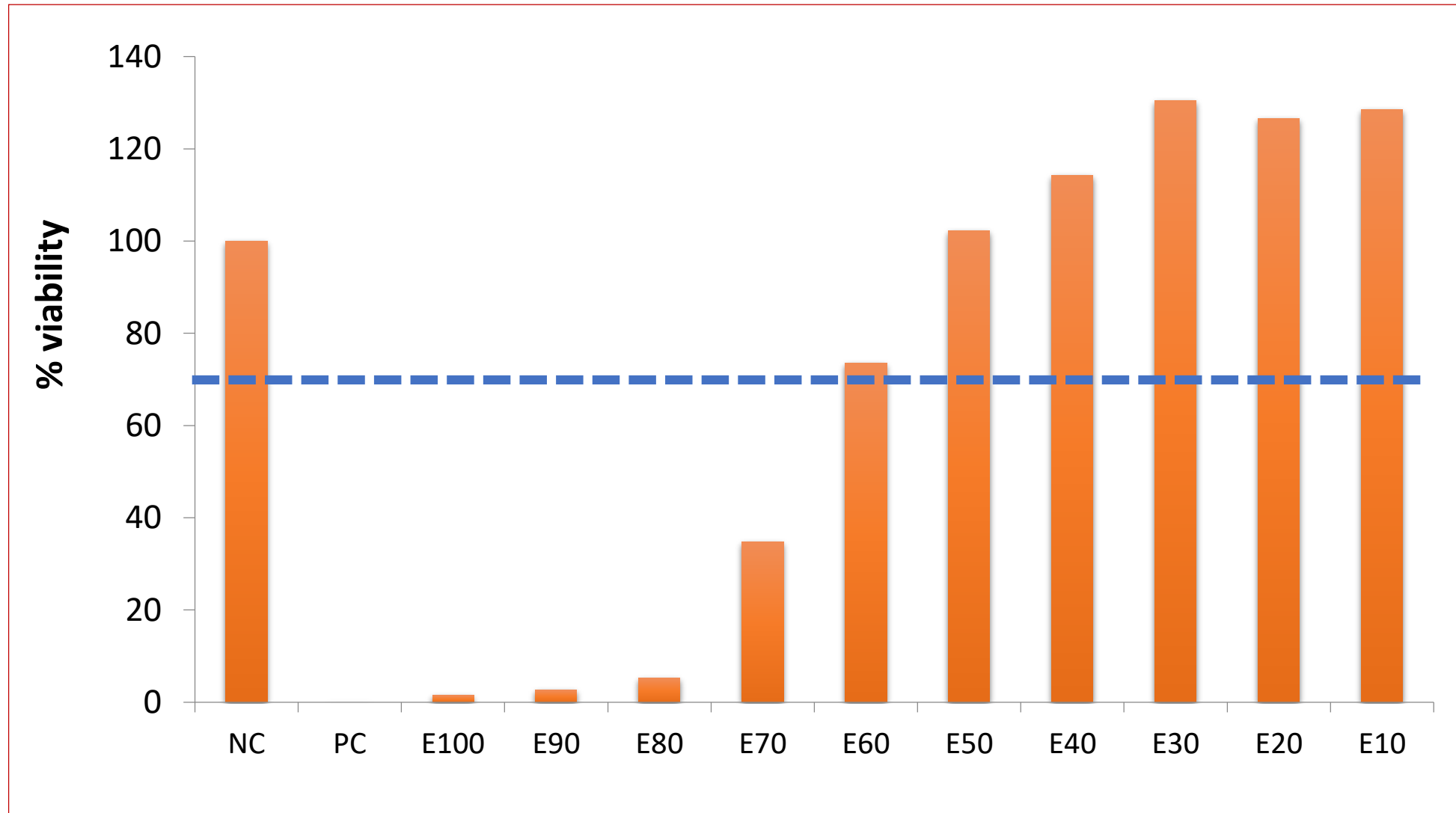
1. den: nasazení buněk do 96-jamkových destiček (1×10^4 buněk/jamku) → inkubace 24 hodin
2. den: mikroskopická kontrola buněk, odsátí kultivačního média – přidání extraktů/koncentrační řady testované látky (alespoň 4 koncentrace, pozitivní, negativní kontroly, médium – slepý vzorek)
3. den: mikroskopická kontrola buněk, odsátí média/extraktů → přidání 50 μ l MTT – 2h inkubace → odsátí, přidání 100 μ l IPA → měření při 570 a 650 nm

Analýza dat: Viabilita (%) = $100 \text{ OD}_{570e} / \text{OD}_{570b}$

OD_{570e} – střední hodnota změřené absorbance extraktů

OD_{570b} – střední hodnota změřené absorbance slepých vzorků

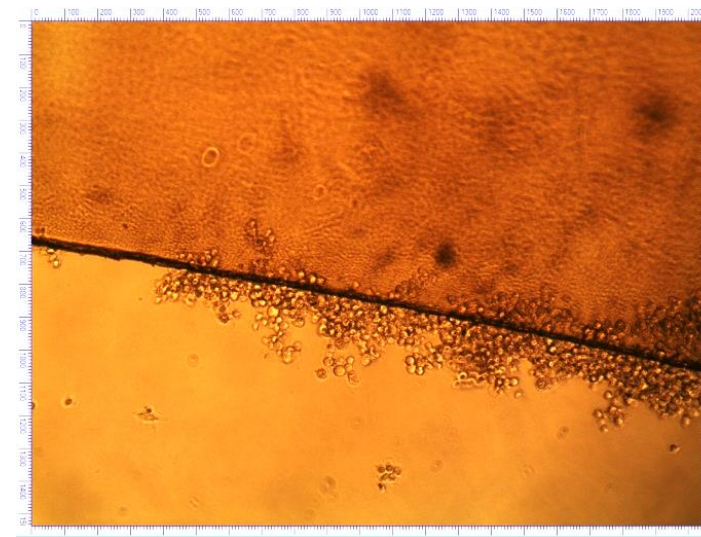
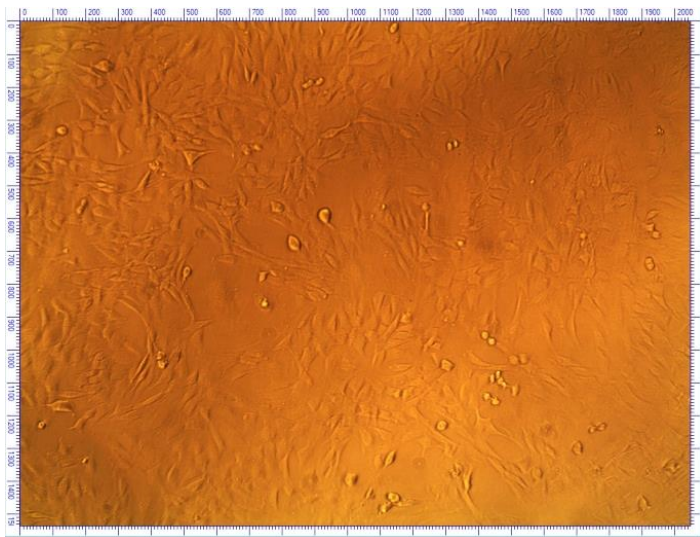
Stanovení cytotoxické koncentrace extraktu



Stanovení cytotoxicity přímým stykem

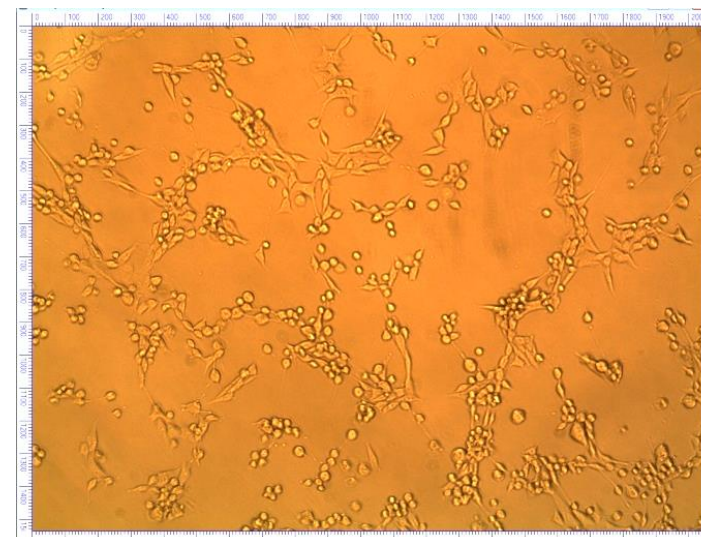
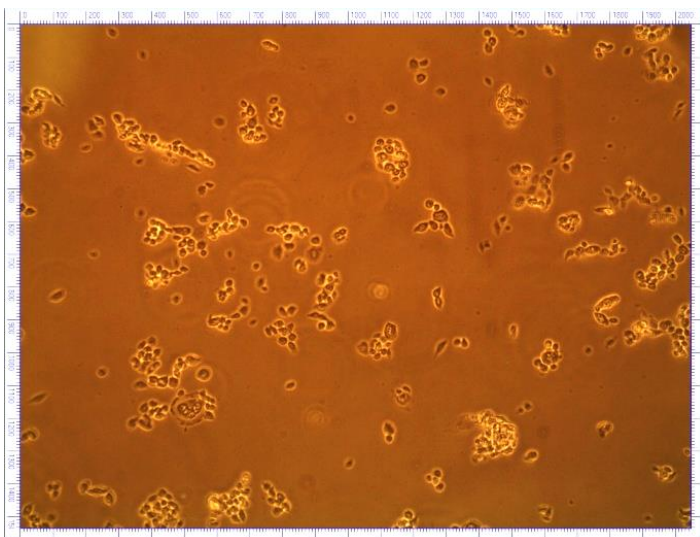
- vložení testovaného materiálu do kultivační jamky s buňkami → sledování morfologie buněk v blízkosti zkoumaného materiálu = Zkouška přímým kontaktem
- Vhodné pouze pro materiály, které adherují ke dnu kultivační jamky
- Materiál by měl pokrývat 1/10 celkové plochy jamky → využití 12ti / 6ti jamkových destiček / Petriho misek
- Stanovení kombinací mikroskopických technik a metabolických testů (snížení viability o plochu pokrytou materiálem)

NC



Rozhraní
testované
folie –
mrtvé buňky

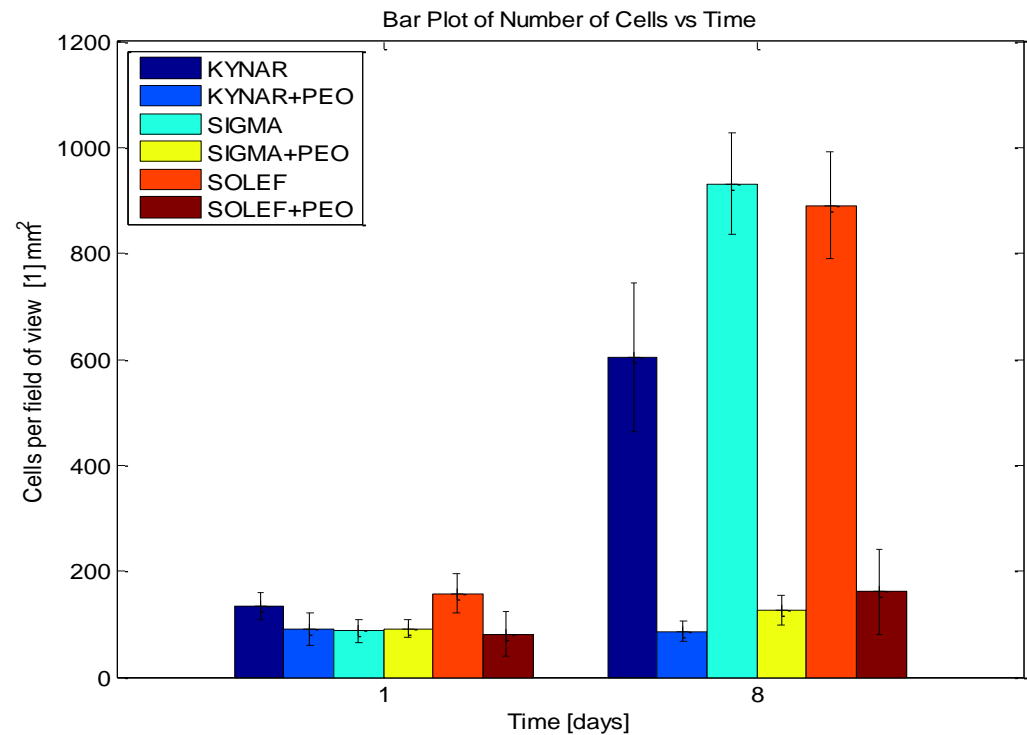
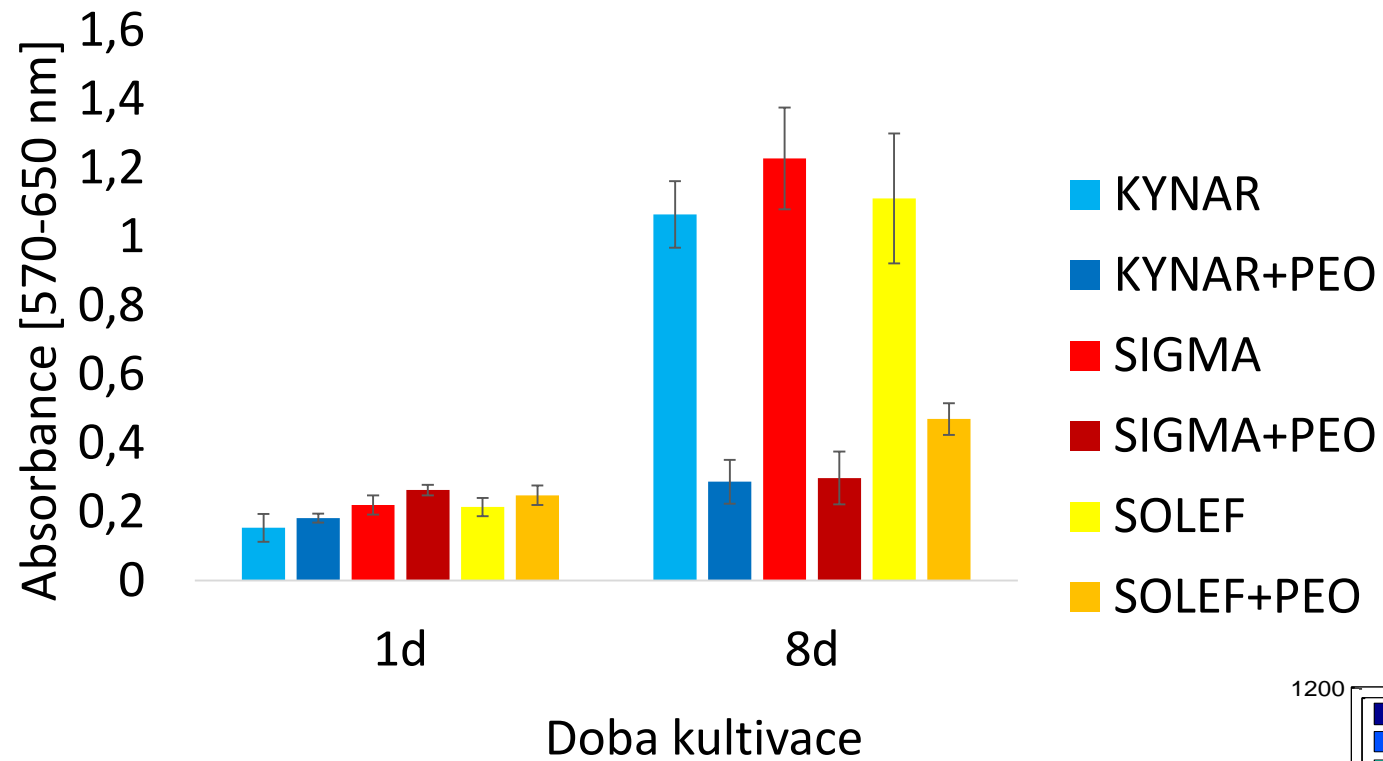
PC
Triton X-100

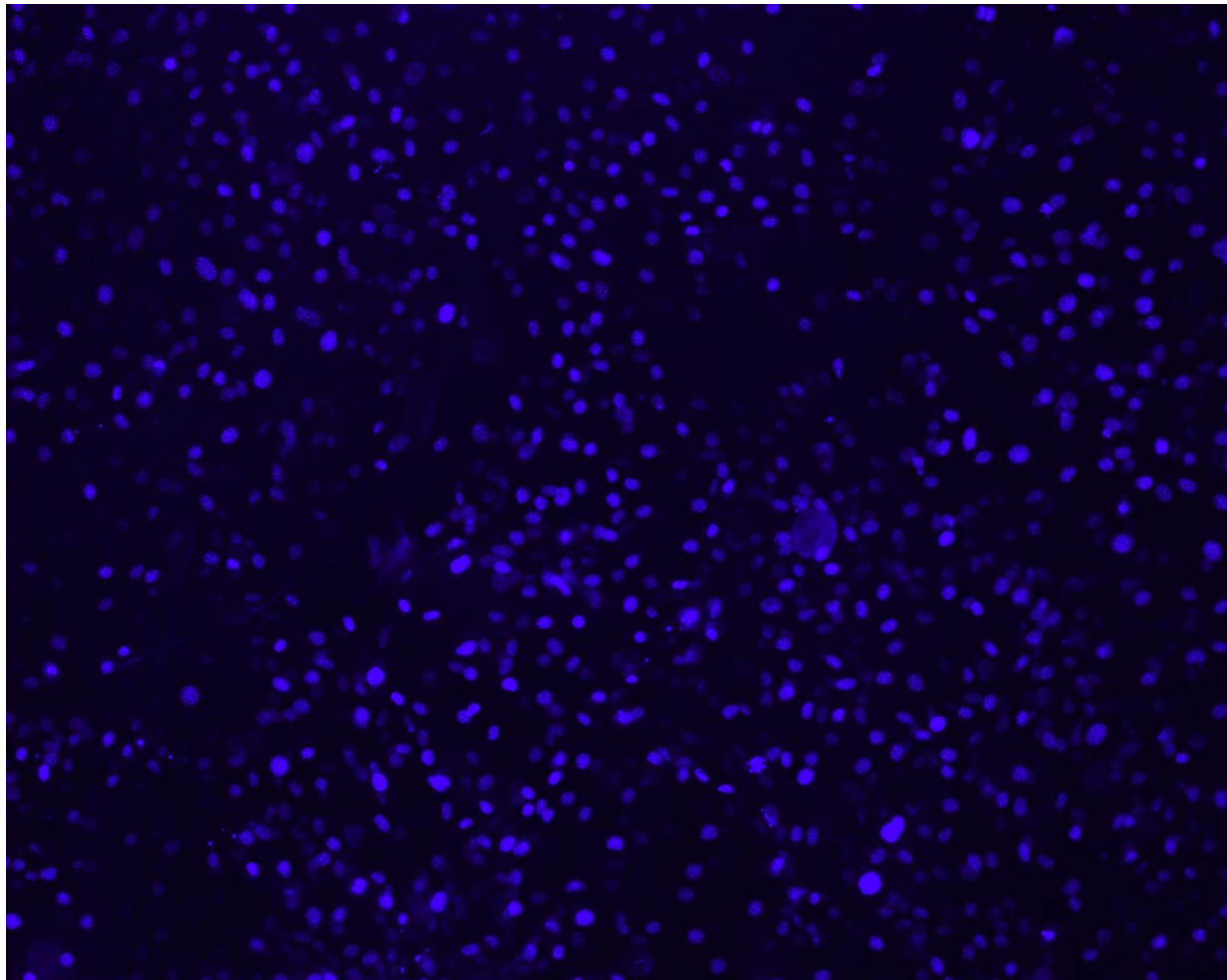


Okolí
testované
folie –
mrtvé + živé
buňky

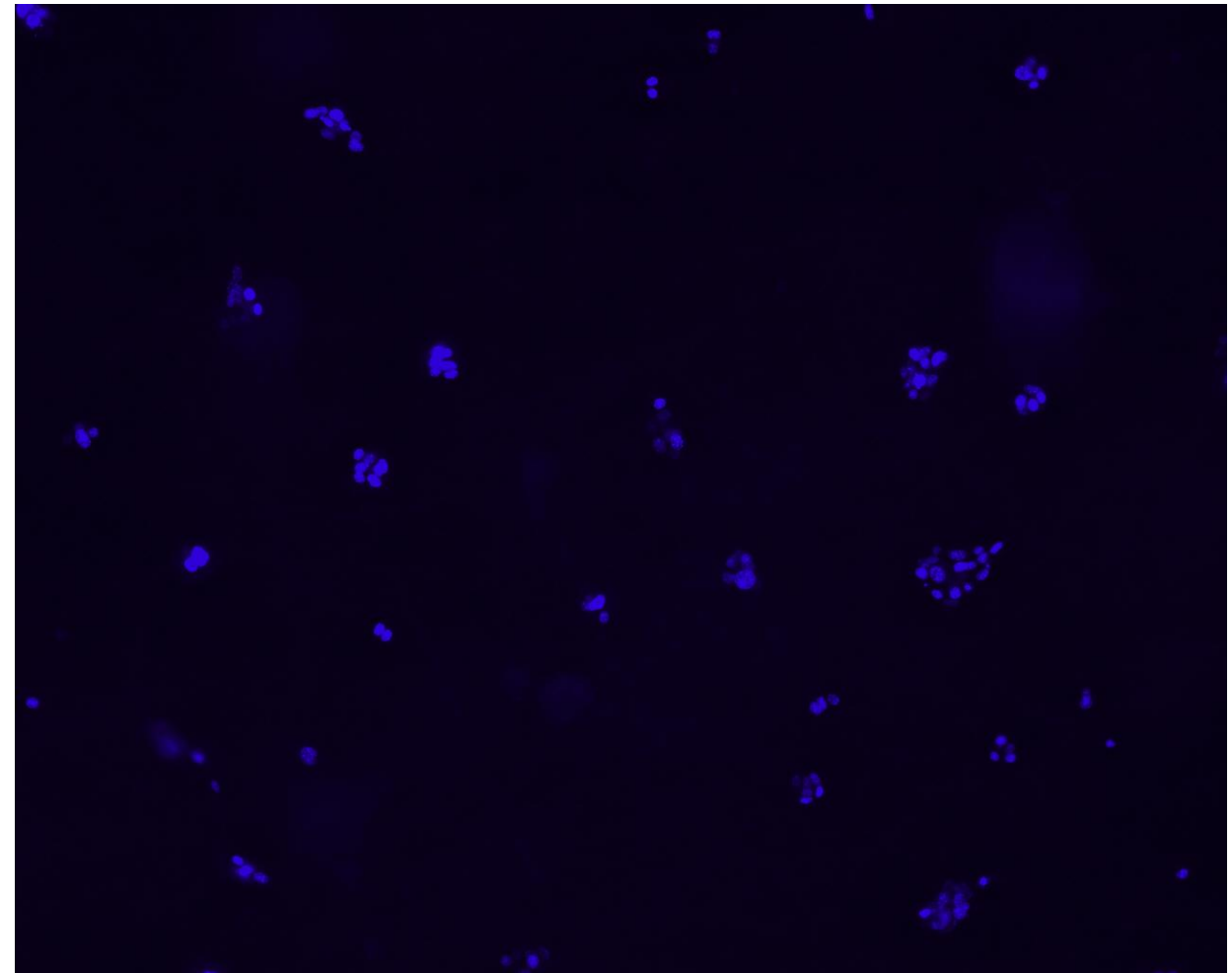
Testování proliferace buněk na materiálech

- Využití mikroskopických technik + metabolických testů
- Optimalizace pokusu: počet nasazených buněk, testovací dny a jejich počet, počet opakování pro každou metodu, celková doba testování, frekvence výměny média
- Postup: sterilizace materiálu (– upevnění do držáků) – aplikace buněčné suspenze





PVDF 8. den



PVDF+PEO 8. den

Opakování = zkouškové otázky

- Dělení buněčných kultur
- Kultivace buněk *in vitro*
- Počítání buněk
- Metabolické testy
- Testování cytotoxicity