



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**
 Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 411. Ląstelės biologija

Laboratorinis darbas

Žinduolių ląstelių kultūros

Teorija

Pastaruoju metu ląstelių ir audinių kultūros tapo rutinine technologija naudojama mediciniuose tyrimuose (pvz. farmakotoksikologijoje tiriant medicininių preparatų aktyvumą ir kuriant naujas terapijos formas) ir klinikinėje praktikoje (pvz. odos ląstelių kultūros naudojamos gyvo audinio persodinimui pacientams su nudegimais; hematopoetinių kamieninių ląstelių (t.y. kraujo ląstelių pirmtakai) gebėjimas formuoti kolonijas (*angl.* Hematopoetic Progenitor Assay: Colony Forming Units) naudojamas kaulų čiulpų kokybei nustatyti prieš transplantaciją).

Ląstelių (arba audinio) kultūra suteikia galimybę išlaikyti ir auginti ląsteles (arba audinius) ne organizme, o *in vitro* (specialiose mitybinėse terpėse, suspensijoje arba prisitvirtinusias ant indo dugno). Ląstelėms augant kultūroje, jos nesuformuoja nei audinių nei organų, tačiau išlaiko joms būdingas biologines savybes. Padėjus gabalėlį audinio (vadinama audinio eksplantu) ant indo dugno ląstelės pradeda migruoti ir augti, tokiu būdu gaunama audinių kultūra.

Ląstelės gali būti auginamos buteliuose, petri lėkštelėse arba specialiai tam skirtuose plastikiniuose induose su šulinėliais (gali būti 6, 12, 24, 48, 96). Ląstelės gali augti laisvai suspensijoje arba sudaryti monosluoksnį ant indo dugno. Ląstelės, kurios proliferuoja (dauginasi) suspensijoje paprastai yra kilusios iš kraujo ląstelių (limfoidinės

arba mieloidinės ląstelės). Fibroblastai (jungiamojo audinio ląstelės) yra tipiškos ląstelės kurios auga prisitvirtinusios ant indo paviršiaus.

Mitybinėse terpėse auginant tiesiai iš audinio arba organo išskirtas ląsteles gaunama pirminė ląstelių kultūra. Paprastai audinys yra suardomas mechaniškai (homogenizatoriaus pagalba arba sukarpomais žirkklėmis) arba proteolitinių fermentų pagalba (pvz. paveikus tripsinu arba kolagenaze). Tokios ląstelės gali būti laikomos ribotą laiko tarpą (dienas, savaites), kurio metu jos gali augti, dalintis ir diferencijuotis, tačiau jos nuolat “sensta”, praranda sugebėjimą dalintis ir galiausiai miršta. Šios ląstelės, kaip ir bet kurios žinduolių ląstelės, turi ribotą potencialą dalintis, jos nėra “nemirtingos” (pvz. žmogaus fibroblastai gali būti auginami kultūroje kol jų populiacija padvigubėja 50 – 100 kartų). Netgi esant optimalioms sąlygoms aktyviai augančios žinduolių ląstelės dalinasi lėtai (paprastai ne dažniau kaip kas 20 val., gali būti 36-48 val ir dar lėčiau).

Tuo tarpu taip vadinamos “nemirtingų” ląstelių linijos turi neribotą augimo (dalinimosi) potencialą (pvz. embriono kamieninės ląstelės). Taip pat “nemirtingumą” galima pasiekti naudojant cheminius arba fizinius kancerogenus (medžiagas sukeliančias vėžį) arba virusinę infekciją. Kartais transformacija įvyksta spontaniškai. Komplementacijos analizė parodė, kad ląstelių transformacija į nemirtingas įvyksta dėl mutacijų arba/ir delecijų genuose koduojančiuose baltymus dalyvaujančius apoptozėje (pvz. p53). Taip pat nemirtingose ląstelėse būna padidėjęs telomerazės aktyvumas ir tai užtikrina neribotą ląstelių gyvavimo trukmę. Tokias ląstelės galima auginti kultūroje neribotą laiką, tereikia dalį ląstelių perkelti vis į naują indą su mitybine terpe, visos ląstelės yra vienodos, jos nesensta, tačiau dažnai praranda joms būdingas savybes. Pvz. dažnai stebimi citomorfologiniai pokyčiai (ląstelės pasidaro mažesnės, apvalesnės, padidėja branduolio/citoplazmos santylis, sumažėja ląstelių gebėjimas tvirtintis ir augti ant paviščių), padidėja chromosominis nestabilumas, pvz. padidėja heteroploidiškumas (chromosomų kiekio pakitimas) ir aneuploidiškumas (nukrypimas nuo donoro, euploido, kariotipo), ląstelės praranda audiniui būdingus baltymus-žymenis (angl. tissue-specific markers), padidėja gebėjimas formuoti auglius (angl. tumorigenicity).

Tačiau nepaisant aukščiau išvardintų nemirtingų (tęstinių) ląstelių linijų trūkumų jos turi ir nemažai privalumų: i) didesnis augimo greitis leidžia užauginti didesnę ląstelių kiekį per trumpesnę laiką, ii) silpnesnė priklausomybė nuo serumo ir gebėjimas augti komercinėse terpėse palengvina šių ląstelių kultivavimą, iii) daugelis šių ląstelių gali augti suspensijoje, o tai palengvina ląstelių dauginimą (nereikia tripsino norint atskirti

ląsteles nuo indo paviršiaus, tereikia atskiesti), taip pat didėjant ląstelių skaičiui nereikia indo su vis didesniu paviršiaus plotu, bei yra galimybė pasiekti ‘stacionarią būseną’ ląstelių kultūroje.

Žinduolių ląstelės auginamos specialiose mitybinėse terpėse. Ankstyvuosiuose bandymuose auginti ląstelių kultūras buvo naudojamos mitybinės terpės į kurių sudėtį įėjo tokie komponentai kaip viščiuko serumas, plazma ir embriono ekstraktas, t.y. tiksli terpės cheminė sudėtis nebuvo žinoma. 1955 m. H. Eagle sukūrė universalią mitybinę terpę kuri iki šiol naudojama kaip pagrindinė terpė žinduolių ląstelių kultivavimui. Mitybinėje terpėje paprastai yra energijos šaltinis (gliukozė), mineralai, molekulės reikalingos biosintezei (amino rūgštys), vitaminai ir kiti priedai (glutatjonas, lipidai ir kt.), serumas (paprastai jaučio), kuris yra įvairių augimo faktorių ir hormonų šaltinis, ir buferis į kuri pridėta pH jautraus dažo. Norint išvengti bakterinės ir grybinės infekcijos į terpę paprastai pridedama antibiotikų (pvz. streptomicino, penicilino).

Lentelė 1 Ląstelių linijų pavyzdžiai.

<i>Trumpinys</i>	<i>Rūšis</i>	<i>Audinys</i>	<i>Ląstelių tipas</i>	<i>Ląstelių savybės</i>
<i>Normalios (netransformuotos)</i>				
MRC-5	Žmogus	Embriono plaučiai	Fibroblastai	Diploidai, inhibuojamos kontakto
3T3-L1	Pelė	Visas embrionas	Fibroblastoidinės	Kontakto inhibicija stimuliuoja diferenciaciją į adipocitus
BHK-21	Žiurkėnas	Inkstai	Fibroblastai	Inhibuojamos kontakto, transformuojamos poliomos virusu
<i>Transformuotos, kieti audiniai</i>				
Hep-G2	Žmogus	Hepatoma	Epitelinės	Išlaiko kai kuriuos vaistus metabolizuojančius fermentus
HeLa-S ₃	Žmogus	Gimdos kaklelio karcinoma	Epitelinės	Greitai auga, gali būti dauginamos suspensijoje
<i>Leukeminės</i>				
Jurkat E6-1	Žmogus	T ląstelės	Suspensija	Stimuliuojant forbolo esterias gamina interleukiną-2
K562	Žmogus	eritrocitai	Suspensija	Stimuliuojant natrio butiratu sintetina hemoglobina

Pagrindinė įranga reikalinga auginant ląstelių (audinių) kultūras:

1. Norint išvengti infekcijų yra svarbu, kad visi veiksmai su ląstelių kultūrom būtų atliekami sterilioje aplinkoje, t.y. specialioje traukos spintoje su laminariniu oro padavimu (angl. laminar flow cabinet) į kurią patenka tik sterilus (per specialius filtrus perfiltruotas) oras.
2. CO₂ inkubatoriuje sudaromos ląstelių augimui tinkamos aplinkos sąlygos – temperatūra, dujų sudėtis ir drėgnumas. Paprastai žinduolių ląstelės inkubuojamos

prie 37 °C, 5 – 10% atmosferinio CO₂ (kad būtų palaikomas fiziologinis pH) ir labai drėgnoje aplinkoje (95-98%).

3. Inversinis mikroskopas gyvų ląstelių stebejimui (inversinis mikroskopas yra šviesinio mikroskopo atmaina kuriame šviesos šaltinis ir kondensorius yra virš, o objektyvo lęšiai yra po objektiniu stakleliu).

Praktinė dalis I: Žmogaus endotelinų ląstelių išskyrimas iš virkštelės venos ir jų kultivavimas.

Įranga ir priemonės:

1-3 virkštelės (palaikytos 4-7 dienas prie + 4 °C), traukos spinta su laminariniu oro padavimu, CO₂ inkubatorius, inversinis mikroskopas, sterlios pirštinės, sterlios žirkklės, sterlios kaniulės su guminiiais vamzdeliais (dvi vienai virkštelei), du sterilūs spaustukai, sterilus vaškuotas siūlas, sterilus skalpelis, termostatas (H₂O vonia) 37 °C, sterilūs švirkštai (20 ml), sterilūs filtrai-antgaliai (0.22 μm), centrifuginiai mėgintuvėliai, centrifūga, plastikinis indas su 6 šulinėliais ląstelių auginimui.

Reagentai:

0.9 % NaCl

Terpė M199, be priedų, sterili

Terpė M199 ląstelių kultivavimui su priedais, sterili:

2 mM glutamino

10 % žmogaus serumo

10 % naujagimio jaučio serumo

50 μg/ml endotelinų ląstelių augimo faktoriaus

5 U/ml heparino

100 U/ml penicilino ir 100 μg/ml streptomicino

0.05 % kolagenazė, tipas I (ištirpinti terpėje M199, inkubuoti 30 min, 37 °C ir perfiltuoti per 0.22 μm filtrą)

virkštelės buferis, sterilus (sudėtis: 137 mM NaCl, 4 mM KCl, 11 mM gliukozės, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicilino ir 100 μg/ml streptomicino, pH 7.4 prie 37° C)

1 % želatinos tirpalas, sterilus

0.1 % tripsino tirpalas, sterilus

Darbo eiga:

1. Paruoškite 6 ($\times 10 \text{ cm}^2$) šulinėlių indą ląstelių išsėjimui (po 2 šulinėlius kiekvienai virkštelei). Į kiekvieną šulinėlį pridėkite po 0.5 ml 1 % želatinos (37 °C) taip, kad pasidengtų visas šulinėlio dugnas, ir indelį palikite CO₂ inkubatoriuje 30 min, 37 °C.
2. Paruoškite indą su ~200 ml 0.9 % NaCl ir palikite termostate prie 37 °C, kad sušiltų.
3. Kiekvienai virkštelei steriliuose užsukamuose buteliukuose paruoškite: 15 ml virkštelės buferio, 15 ml M199 terpės be priedų, 15 ml kolagenazės tirpalo ir palikite termostate prie 37 °C, kad sušiltų.
4. Traukos spintoje su laminariniu oro padavimu išsidėliokite visas priemones reikalingas endotolinių ląstelių izoliavimui. Taip pat patieskite sterilią servetėlę ant kurios padėsite virkštelę. Užsidėkite sterilias pirštines.
5. Nupilkite virkštelės buferį ir paguldykite virkštelę ant servetėlės.
6. Nuvalykite virkštelę servetėle sudrėkinta 70 % etanoliu. Patikrinkite ar nėra skylių.
7. Nupjakite virkštelės galus (~1-3 cm) ir atsargiai, kad nepažeistumėt kraujagyslės sienelių, įstumkite kaniules į veną. Kaniules pririškite steriliu vaškuotu siūlu.
8. Į sterilų švirkštą pritraukite 15 ml šilto cord buffer ir sušvirkškite į vieną kaniulę.
9. Į sterilų švirkštą pritraukite 15 ml šiltos perfiltruotos kolagenazės ir sušvirkškite į tą pačią kaniulę. Stenkitės, kad į veną nepatektų oro.
10. Vamzdelius ant kaniulių galų užspauskite spaustuku, perkeltkite virkštelę į 0.9 % NaCl vonelę (37 °C) ir inkubuokite 20 min.
11. Atsargiai, prilaikydami ranka, išimkite virkštelę iš vonelės ir paguldykite ant servetėlės. Švelniai patapšnokite ir pamaigykite virkštelę iš visų pusių.
12. Į sterilų švirkštą pritraukite 15 ml šiltos M199 terpės be priedų. Atidarykite spaustuką, vieną kaniulės vamzdelį įdėkite į švarų sterilų indelį, o į kitą sušvirkškite M199 terpę.
13. Dar kartą pamaigykite virkštelę. Į švirkštą pritraukite oro ir sušvirkškite į kaniulę.
14. Cetrifuguokite ląstelių suspensiją 1200 aps/min (300 g), 5 min, 4 °C.
15. Atsargiai nusiurbkite supernatantą.
16. Pridėkite 4 ml sterilios M199 terpės su priedais. Suspenduokite ląsteles.
17. Iš inkubatoriaus išimkite iš anksto paruoštą 6 šulinėlių indelį su želatina. Nusiurbkite želatiną.
18. Į kiekvieną šulinėlį pridėkite po 2 ml ląstelių suspensijos. Indelį padėkite į CO₂ inkubatorių.

19. Po 24 valandų nusiurbkite terpę, pridėkite 2 ml M199 terpės be priedų ląstelių praplovimui. Nusiurbkite ją ir pridėkite 1.5 ml M199 terpės su priedais.
20. Naudodamiesi inversiniu mikroskopu įvertinkite ląstelių kiekį. Gražinkite indelį į CO₂ inkubatorių.
21. Toliau ląstelių augimas stebimas kiekvieną dieną, o kultivavimo terpė (M199 su priedais) keičiama kas 2 dienas.
22. Kai endotelių ląstelių monosluoksnis padengia visą indo paviršių jos nustoja dalintis, ir turi būti perkiamos į indą su didesniu dugno paviršiaus plotu.
23. Pirmiausiai paruoškite 6 ($\times 10 \text{ cm}^2$) šulinėlių indą ląstelių išsėjimui (po 2 šulinėlius kiekvienai virkštelei). Į kiekvieną šulinėlį pridėkite po 0.5 ml 1 % želatinos (37 °C) taip, kad pasidengtų visas šulinėlio dugnas, ir indelį palikite CO₂ inkubatoriuje 30 min, 37 °C.
24. Nusiurbkite seną terpę ir pridėkite 2 ml M199 terpės be priedų ląstelių praplovimui.
25. Nusiurbkite terpę ir pridėkite 0.5 ml 0.1 % tripsino (kambario temperatūros). Patapšnokite indelį. Naudodamiesi inversiniu mikroskopu patikrinkite ar visos ląstelės atsiskyrė nuo dugno.
26. Į kiekvieną šulinėlį pridėkite po 4 ml M199 terpės su priedais (to pakanka, kad tripsinas būtų inaktyvuojamas).
27. Iš inkubatoriaus išimkite iš anksto paruoštą 6 šulinėlių indelį su 1 % želatina. Nusiurbkite želatina.
28. Į šulinėlį pridėkite po 1.5 ml ląstelių suspensijos (toku būdu ląstelės yra atskiedžiamos 1:3). Indelį padėkite į CO₂ inkubatorių.

Praktinė dalis II: Ląstelių gyvybingumo įverinimas.

Teorija

Auginant ląstelių kultūras dažnai yra svarbu įvertinti kiek ląstelių išgyvena ir kiek mišta (pvz. inicijuojant ląstelių kultūrą svarbu, kad ne mažiau kaip 90 % ląstelių yra gyvybingos). Vienas iš ląstelių gyvybingumo įvertinimo kriterijų yra ląstelės membranos vientisumas. Gyvybingos ląstelės turi nepažeistas membranas ir todėl jose nesikaupia gyvybingumo įvertinimui naudojami dažai tuo tarpu jie kaupiasi ląstelėse su stipriai pažeistom membranom. Vienas iš gyvybingumo įvertinimui naudojamų dažų yra eozinas. Jis nudažo ląstelės baltymus raudonai. Taip pat gali būti naudojamas

eritrocinas B (100 mg/100 ml PBS, pH 7.2-7.4) arba tripano mėlis. Gyvybingumas gali būti nustatomas naudojantis mikroskopu arba hemocitometru.

Įranga ir priemonės:

1 ml pipetės, pipetėlių antgaliai, mėgintuvėliai, šviesinis mikroskopas, objektiniai ir dengiamieji stikleliai.

Reagentai:

2 % eozino tirpalas PBS (fosfatu užbuferintas fiziologinis tirpalas: 1 mM NaH₂PO₄, 9 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, pH 7.0 – 7.4)

Ląstelių suspensija

Darbo eiga:

1. Į mėgintuvėlį pridėkite 200 μl ląstelių suspensijos ir 10 μl 2 % eozino tirpalo. Švelniai, tačiau gerai išmaišykite. Palikite mėgintuvėlį 5 min kambario temperatūroje.
2. Po 5 min užlašinkite ląstelių suspensijos su eozinu ant objekcinio stiklelio ir uždenkite dengiamuoju stikleliu.
3. Apžiūrėkite ląsteles per mikroskopą. Negyvos ląstelės bus nusidažiusios raudonai. Naudodamiesi 100 - 200 × padidiniu (nepamirškite, kad bendras padidinimas paskaičiuojamas padauginus objektyvinio ir okuliarinio lęšio padidinimus) suskaičiuokite kiek yra ląstelių iš viso ir kiek nusidažusių raudonai (suskaičiuokite mažiausiai 200 ląstelių).
4. Paskaičiuokite procentais kiek jūsų tiriamame pavyzdyje yra gyvybingų ir kiek negyvibingų ląstelių.

Praktinė dalis III: Ląstelių morfologijos įverinimas.

Teorija

Paprastai prisitvirtinę prie paviršiaus auga fibroblastai (jungiamojo audinio ląstelės), kraujagyslių endotelinės ir lygiojo raumens ląstelės. Šios ląstelės paprastai būna pailgos, verpstės formos. Monocitai, vienos iš kraujo ląstelių, taip pat tvirtinasi prie indo paviršiaus. Ląstelės kilusios iš kitų kraujo ląstelių tipų (pvz. limfoidinės arba mieloidinės) proliferuoja suspensijoje ir paprastai būna apvalios.

Ląstelės tvirtinasi prie paviršių ekstraląstelinių baltymų (adhezijos molekulių, angl. adhesion molecules) pagalba. Prisitvirtinusios ląstelės gali būti atskirtos nuo indo paviršiaus veikiant mechaniniais (specialiais gremžtukais) arba cheminiais veiksniais (EDTA arba proteazėmis, pvz. tripsinu). EDTA cheluoja terpėje esantį kalcį, ko pasekoje adhezijos molekulės yra internalizuojamos ir ląstelė įgauna sferinę formą. Tą patį rezultatą galima pasiekti ląsteles veikiant tripsinu (adhezijos molekulės yra suskaldomos). Naudojant tripsiną ar kitas proteazes yra svarbu, kad ląstelės nebūtų veikiamos fermentu per ilgai, nes kitaip bus pažeista pati ląstelė.

Įranga ir priemonės:

1 ml pipetės, pipečių antgaliai, mėgintuvėliai, šviesinis, inversinis mikroskopas, objektiniai ir dengiamieji stikleliai.

Reagentai:

0.1 % tripsino + 2 mM EDTA tirpalas PBS (fosfatu užbuferintas fiziologinis tirpalas)

1 % jaučio serumo albuminas

Dviejų tipų ląstelių kultūros: augančios prisitvirtinusios prie paviršiaus ir augančios suspensijoje.

Darbo eiga:

1. Pirmiausiai įvertinkite suspensijoje augančių ląstelių morfologiją. Užlašinkite ląstelių suspensijos ant objekcinio stiklelio ir uždenkite dengiamuoju stikleliu. Apžiūrėkite ląsteles per mikroskopą. Schematiškai pavaizduokite ląstelių formą.
2. Toliau įvertinkite ląstelių augančių prisitvirtinusių prie paviršiaus morfologiją. Padėkite indelį su ląstelėmis po mikroskopu ir naudodamiesi 10× didinačiu objektyvu suraskite ląsteles. Schematiškai pavaizduokite ląstelių formą.
3. Nusiurbkite terpę ir pridėkite 0.5 ml tripsino/EDTA tirpalo (kambario temperatūros). Sekančias 5 min stebėkite tripsino/EDTA poveikį ląstelėms per mikroskopą. Schematiškai pavaizduokite ką matote. Po 5 min pridėkite 0.5 ml 1 % jaučio serumo albumino tirpalo. Stebėkite albumino poveikį per mikroskopą. Kodėl pridėjus albumino tripsino poveikis ląstelėms susilpnėja?