

Práce s buněčnými kulturami ve sterilních podmínkách - [BK]

(Kateřina Slaninová, Denisa Lizoňová)

1. Úvod

Makrofágy jsou bílé krvinky imunitního systému, které pohlcují patogeny, buněčné zbytky a cizorodé látky, včetně částic, které vniknou do těla různými způsoby (inhalačně, orálně, intravenózně atd.). Tento proces zvaný fagocytóza, chrání tělo před infekcemi a je jedním z hlavních mechanismů eliminace farmaceutických nano- a mikročástic. Studium interakce částic léčiva s imunitními buňkami je předmětem studia mnoha preklinických *in vitro* studií.

V této úloze se studenti seznámí se základy práce s buněčnými kulturami. Budou při tom využívat buněčné linie RAW 264.7 a J774A.1, obě tyto linie byly izolované z myši a jsou rakovinného původu, přesto si zachovávají typické vlastnosti makrofágů, jako je schopnost fagocytózy, syntéza lysozomu („trávicí vakuola“) nebo produkce cytokinů (signalizační molekuly při imunitní odpovědi organismu). Studenti se naučí základy sterilní práce v laminárním boxu a počítání buněk.

Na tuto úlohu navazuje úloha Fagocytóza mikročástic makrofágy (F). Makrofágy napěstované v této úloze budou použity pro vytvoření mikroskopických preparátů pro sledování fagocytózy fluorescenčních mikročástic (Phrodo-zymosan a glukonové částice) makrofágy pomocí mikroskopie a obrazové analýzy.

2. Teorie

V biomedicínském výzkumu představují buněčné linie makrofágů, jako jsou J774A.1 nebo RAW 264.7, nepostradatelné *in vitro* modely pro studium imunitních odpovědí, zánětu a interakcí s cizorodými částicemi. Tyto linie jsou odvozeny z myších nádorů (sarkomů či leukémií), což jim propůjčuje schopnost neomezeného dělení (imortalizaci) při zachování klíčových vlastností přirozených makrofágů, zejména schopnost fagocytózy, adheze k povrchům, a produkce signálních molekul – cytokinů.

Makrofágy jsou specializované buňky imunitního systému, které plní roli „strážců“ – vyhledávají, pohlcují a odstraňují částice, které identifikují jako cizí nebo nebezpečné. Z pohledu vývoje nanomateriálů jsou tyto buňky zásadní, neboť jsou to právě makrofágy, které nejčastěji eliminují nanočástice z krevního oběhu, čímž ovlivňují jejich biodistribuci a terapeutickou účinnost.

Základním mechanismem interakce makrofágů s okolím je fagocytóza, proces aktivního pohlcování částic větších než 0,5 μm . Tento děj začíná rozpoznáním objektu pomocí receptorů na povrchu buňky. V reálném prostředí jsou částice často obklopeny proteiny z okolního media, čímž vzniká tzv. biologická korona, která určuje, jak rychle a efektivně bude částice makrofágem pohlcena. Po navázání částice dojde k přestavbě buněčného cytoskeletu, vytvoření výběžků (pseudopodia) a uzavření částice do vnitřního váčku – fagosomu. Ten

následně spline s lysozomem, organelou obsahující agresivní hydrolytické enzymy a kyselé pH, kde dochází k pokusu o rozklad pohlceného materiálu.

Úspěšná kultivace savčích buněk je kriticky závislá na udržení sterilního prostředí. Na rozdíl od bakterií rostou živočišné buňky pomalu a postrádají ochranou buněčnou stěnu, což je činí extrémně náchylnými ke kontaminaci mikroorganismy (bakteriemi, kvasinkami, plísněmi). Živočišné buňky jsou v porovnání s bakteriemi extrémně citlivé a zranitelné. Zatímco bakteriální buňka se rozdělí každých 20 minut, makrofágové potřebují k dělení 15 až 24 hodin. Jakkoliv jediná spóra plísně nebo bakterie, která vnikne do kultivačního média, se v něm pomnoží mnohem rychleji než buňky a během 24-48 hodin celou kulturu znehodnotí (spotřebuje živiny a změní pH). Aseptická technika je soubor návyků, které tomuto vniku brání.

1. Laminární box (Biohazard Box/MSB)

- Na přední straně boxu (kde jsou ruce operátora) vzniká vzduchová clona. Nikdy ji nenarušujte prudkými pohyby, které by mohly „vsunout“ nesterilní vzduch z místnosti dovnitř.
- Box se zapíná 15-20 minut předem, aby se ustálilo proudění a vyčistil vnitřní prostor. Plocha se sterilizuje UV zářením (pokud v boxu nikdo nepracuje!) a otírá 70% ethanolem.

2. Osobní hygiena a ochranné pomůcky

Hlavním zdrojem kontaminace je člověk (šupinky kůže, mikroorganismy na dechu a vlasech).

- Plášť musí být čistý, vyhrazený pouze pro práci s buňkami.
- **Rukavice** jsou nezbytné. Pravidelně si je v průběhu práce v boxu přestříkávejte 70% ethanolem (zejména po doteku čehokoliv vně boxu).
- V boxu se nemluví, nekašle a nekýchá, aby se omezil vznik aerosolů směřujících k vzorkům.

3. Pravidlo „vše sterilní dovnitř, vše špinavé ven“

- Každá láhev, stojánek nebo krabička s pipetami musí být před vložením do boxu důkladně postříkána a **otřena 70% ethanolem**. Ethanol ničí vegetativní formy bakterií a obalené viry tím, že narušuje jejich membrány.
- Pracovní plochu si rozdělte na „čistou zónu“ (sterilní spotřební materiál) a „špinavou zónu“ (nádoby na odpad, použité pipety). **Nikdy nekřížte ruce nad otevřenými miskami!**

4. Manipulace se vzorky

- Nad otevřenou lahví nebo destičkou nesmí být nikdy ruka nebo nesterilní předmět. Kontaminace padá shora dolů. Pokud musíte nad něčím pracovat, držte předmět v mírném náklonu.
- Víčka lahví se drží v ruce (mezi prsty) vnitřní stranou dolů, nebo se pokládají na plochu. Nikdy se nedotýkejte hrdla láhve ani vnitřní strany víčka.
- Používejte pouze sterilní, jednorázové plastové pipety nebo špičky s filtrem. Pipeta se nesmí dotknout ničeho jiného než sterilního média a vnitřku láhve. Pokud zavádíte o okraj, pipetu okamžitě vyhoďte.

Většina linií makrofágů patří mezi adherentní buňky, což znamená, že ke svému růstu vyžadují pevný povrch, na který se ukotvují pomocí specifických proteinů. V laboratorních podmínkách rostou tyto buňky v kultivačních lahvích v živném médiu, které obsahuje esenciální aminokyseliny, vitamíny, glukózu a je obohaceno o fetální telecí sérum (Fetal Bovine Serum-FBS) jako zdroj růstových faktorů. Stabilní pH média je udržováno pomocí hydrogenuhličitanového pufru a atmosféry s 5 % CO_2 v inkubátoru při 37 °C.

Při dosažení určité hustoty pokrytí povrch (tzv. konfluence; obvykle 80-90 %), je nutné buňky přenést do nové nádoby (proces zvaný pasážování). Protože makrofágy přilnou k plastu velmi silně, používá se k jejich uvolnění mechanické seškrabávání (cell scraper (Obrázek 1)). Tímto procesem získáme buněčnou suspenzi, kterou je nutné před dalším použitím standardizovat.



Obrázek 1. Kultivační láhev (nalevo) a cell scraper (napravo).

Kvantifikace buněk v suspenzi se provádí pomocí hemocytometru (Bürkerovy komůrky), co je speciálně kalibrované sklíčko s mikroskopickou mřížkou definující přesný objem. Současně se provádí test viability (životnosti) pomocí tropanové modři. Toto barvivo selektivně vstupuje pouze do buněk s poškozenou membránou (mrtvých), zatímco živé buňky zůstávají čiré. Přesný výpočet a koncentrace buněk a jejich následné nasazení (seeding) na mikrotitrační destičky v požadované hustotě je kritickým krokem pro reprodukovatelnost experimentů. Pro studium fagocytózy je cílem dosáhnout subkonfluentní vrstvy, která v navazujících úlohách umožní jasnou mikroskopickou analýzu a kvantifikaci pohlcených fluorescenčních částic pomocí obrazové analýzy.

3. Cíl práce

Seznámíme se základy práce v laminárním boxu za sterilních podmínek a naučíme se počítat buňky.

4. Popis zařízení

Laminární box

Laminární box (Obrázek 2) je laboratorní zařízení určené k vytvoření sterilního pracovního prostředí při manipulaci s biologickým nebo chemickým materiálem citlivým na kontaminaci. Pracuje na principu laminárního (rovnoběžného) proudění vzduchu, které zajišťuje, že

filtrovaný vzduch proudí jedním směrem konstantní rychlostí a vytlačuje nečistoty a mikroorganismy z pracovního prostoru.

Vzduch je nasáván ventilátorem, veden přes HEPA filtr (High Efficiency Particulate Air) a vypouštěn do pracovního prostoru jako čistý, sterilní proud vzduchu. HEPA filtr zachytí $\geq 99,97\%$ částic o velikosti $\geq 0,3\ \mu\text{m}$ (bakterie, spory, prach). Podle proudění dělíme horizontální a vertikální laminární boxy. V horizontálním boxu proudí vzduch zezadu směrem k obsluze, ve vertikálním boxu proudí vzduch shora dolů (častější v biologických laboratořích).



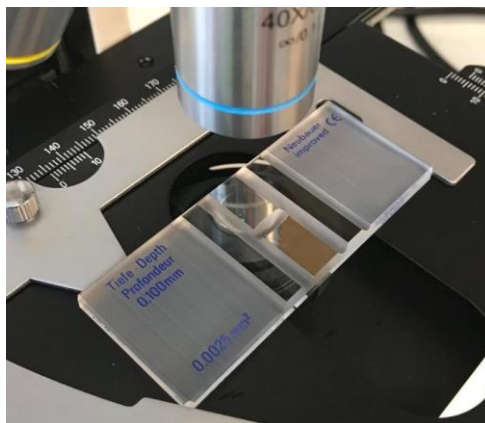
Obrázek 2. Bio II Advance Plus Laminární box a diagram proudění vzduchu [4].

Laminární box slouží k aseptické práci s buněčnými kulturami, přípravě kultivačních médií, manipulaci se sterilními nástroji a roztoky a ochraně vzorku před kontaminací z okolního prostředí. Klasický laminární box nechrání obsluhu, pouze vzorek. Pro práci s potenciálně infekčním materiálem se používá biologický bezpečnostní box (BSC).

Zásady správného používání:

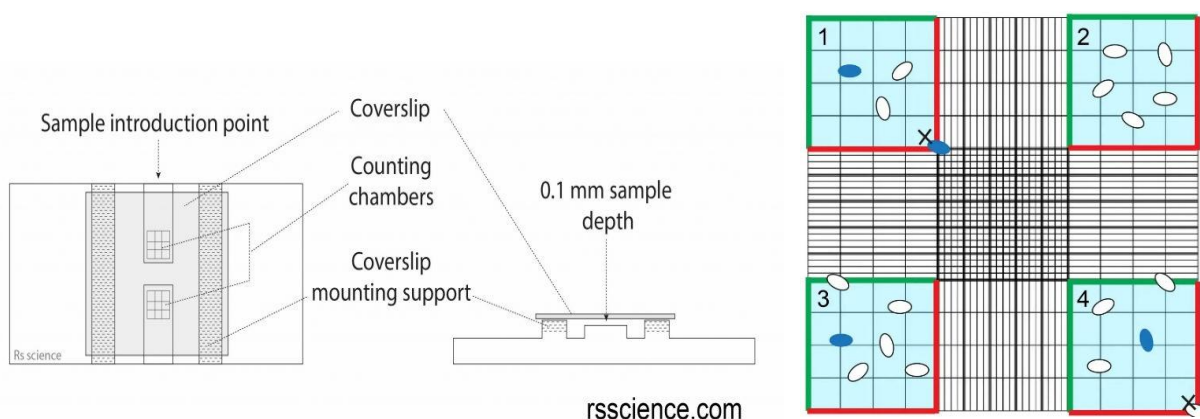
- Před prací se pracovní plocha dezinfikuje (např. 70% etanolem).
- Box se nechá před zahájením práce několik minut v chodu, aby se stabilizovalo proudění.
- Práce se provádí bez zbytečných pohybů, které by narušily laminární proudění.
- Do boxu se vkládají pouze nezbytné pomůcky

Hemocytometr



Obrázek 3. Hemocytometr

Hemocytometr (Obrázek 3) je laboratorní měřicí komůrka určená k počítání buněk v suspenzi a ke stanovení jejich koncentrace a životaschopnosti. Hemocytometr je tvořen silným sklíčkem se zapuštěnou mřížkou a přesně definovanou hloubkou komůrky (0,1 mm) po přikrytí krycím sklíčkem. Mřížka má známou plochu, což umožňuje výpočet objemu, ve kterém se buňky počítají (Obrázek 4).



Obrázek 4. Jak použít hemocytometr k počítání buněk [3].

Použití hemocytometru:

1. Buněčná suspenze se důkladně promíchá.
2. Suspenze se smíchá s trypanovou modří (obvykle v poměru 1:1).
3. Na hemocytometr se položí krycí sklíčko.
4. Malé množství suspenze se nasaje kapilárně do komůrky.
5. Buňky se pozorují pod světelným mikroskopem (obvykle 10x nebo 20x objektiv).

Trypanová modř je vitální barvivo používané ke stanovení životaschopnosti buněk. Živé buňky mají neporušenou buněčnou membránu, barvivo do nich nevstupuje a buňky jsou tak bezbarvé. Mrtvé buňky mají poškozenou membránu, barvivo proniká dovnitř a buňky jsou modře zbarvené. Trypanovou modří lze zároveň stanovit celkový počet buněk, počet životaschopných buněk a procento viability.

Pravidla počítání buněk:

- Počítají se buňky ve vybraných čtvercích mřížky.
- Buňky dotýkající se horní a levé hranice se započítávají.

- Buňky dotýkající se dolní a pravé hranice se nezapočítávají.
- Zvlášť se počítají živé (bezbarvé) a mrtvé (modré) buňky.

Výpočet koncentrace buněk:

Vzorec

$$\text{koncentrace buněk} \left(\frac{\text{buňky}}{\text{ml}} \right) = \text{průměrný počet buněk} \times \text{ředění} \times 10^4$$

Proč 10^4 ? Přepočet objemu jednoho čtverce hemocytometru na 1 ml:

$$\text{objem čtverce: } 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$$

$$1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$$

$$\frac{1000 \text{ mm}^3}{0,1 \text{ mm}^3} = 10^4$$

5. Postup práce

Základy sterilní práce v laminárním boxu

V této části práce se seznámíme se sterilní prací v laminárním boxu, naučíme se počítat buňky a připravíme si mikroskopické preparáty (makrofágové + fluorescenční mikročástice) pro studium fagocytózy.

Potřebné nádobí a zařízení:

Pipeta

Mikrozkumavka

Hemocytometr

Mechanické počítadlo

Kalkulačka

Laminární box

Světelný mikroskop

Jamková destička

Potřebné chemikálie:

Kultivační médium

Fluorescenční částice (pHrodo-zymosan a glukonové částice)

Trypanová modř

70% ethanol

Savo

Postup:

1. Nejprve se seznámte se základy sterilní práce v laminárním boxu. Asistent vám předvede, jak v laminárním boxu pracovat a upozorní na časté chyby.

2. Asistent vám předá zkumavku se suspenzí makrofágů v kultivačním médiu o neznámém množství buněk. Zkumavka s buňkami bude po dobu demonstrace umístěna ve vodní lázni o teplotě 37°C.
3. V souladu se sterilními podmínkami umístíte zkumavku s buňkami do laminárního boxu. Do stojanu si připravíte mikrozskumavku, do které napipetujete 10μl buněčné suspence.
Pozn.1: Vše, co vstupuje do laminárního boxu musí být postříkáno 70% ethanolem.
Pozn.2: Buňky je třeba před pipetováním resuspendovat.
4. Další krok můžete provést při sterilních i nesterilních podmínkách. Záleží, zda je zásobní roztok trypanové modře sterilní nebo ne. Pokud nebudete vědět, ptejte se asistenta.
5. Do mikrozskumavky s buňkami přidejte 10μl Trypanové modře a pipetou promíchejte.
6. S vytvořenou směsí se přesunete k mikroskopu a hemacytometru. Napipetujete 10μl suspenze pod sklíčko hemacytometru. Hemocytometr poté umístíte pod mikroskop a spočítáte buňky v alespoň 5ti čtvercích hemocytometru. K počítání můžete využít mechanické počítadlo.
Pozn.3: Ve všech oblastech hemocytometru by mělo být podobné množství buněk. V případě špatně připraveného vzorku je třeba celý postup zopakovat.
Pozn.4: V případě, že by ve vzorku bylo velké množství buněk (~150 buněk/čtvereček), dohodněte se s asistentem, zda by nebylo vhodné zásobní suspenci buněk naředit.
7. Po spočítání alespoň 5ti čtverečků využijte vzorec pro výpočet koncentrace buněk v zásobním roztoku (viz popis zařízení – Hemocytometr).
8. Naředte si zásobní roztok buněk a odpipetujte zadané množství buněk do jamek destičky. V každé jamce by měl být stejný objem média i v případě, že množství buněk se bude mezi jednotlivými jamkami lišit.
Pozn.5: Množství buněk v jamkách bude uvedeno asistentem. V některých případech bude zadáno stejné množství buněk pro všechny jamky v jiných případech se počet buněk mezi jamkami může lišit.
9. Přidejte k buňkám asistentem zadané koncentrace fluorescenčních částic (pHrodo zymosan nebo fluorescenčně značené glukonové částice) a destičky s buňkami vložte do inkubátoru. Analýza fagocytózy částic po 24h bude součástí následující práce *Fagocytóza částic makrofágy – [F]*.
Pozn.6: Při práci s fluorescenčními reagenty je třeba pracovat ve tmě (stačí zhasnout), aby nedocházelo k zbytečnému vysvěcování (fotoblednutí).

6. Zpracování výsledků

Do protokolu vložte výpočet množství buněk v zásobním roztoku (viz Hemocytometr-pravidla počítání buněk), součástí by měla být i fotka z mikroskopu pro kontrolu správného pipetování a práce s hemacytometrem.

Uvedte výpočet pro ředění buněk do odpovídající objemu kultivačního média pro nasazení makrofágů do destičky.

Uvedte postup (výpočet) ředění částic.

7. Bezpečnostní pokyny

I když jsou linie J774A.1 a RAW 264.7 klasifikovány jako Biosafety level 1 (BSL-1; nízké riziko), v laboratořích platí přísná pravidla:

1. Práce v plášti a rukavicích: Ochrana před kontaminací vzorku i před expozicí kultivačním médiím.
2. Likvidace biologického odpadu: Vše, co přišlo do kontaktu s buňkami (špičky, pipety, destičky), musí být odloženo do nádob pro biologický odpad a následně autoklávováno.
3. Ochrana zraku: Při zapnutém UV světle v boxu by neměl být nikdo v místnosti (nebezpečí poškození rohovky)

8. Kontrolní otázky

1. Co to je fagocytóza?
2. Co je to hemocytometr?
3. K čemu se používá trypanová modř?
4. Jaké jsou zásady práce v laminárním boxu?

Symboly a zkratky

Literatura

1. <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/trypan-blue-exclusion.html> (ThermoFisher Trypan blue protokol)
2. <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/counting-cells-in-a-hemocytometer.html> (ThermoFisher Hemocytometer protokol)
3. <https://rsscience.com/how-to-use-a-hemocytometer-to-count-cells/>
4. <https://danlab.pl/en/our-products/furniture-and-fume-hoods/laminar-flow-cabinets/bio-ii-advance-plus-ii-safety-class-laminar-chambers-with-manual-front-window-sliding/>
5. **Freshney, R. I. (2015).** *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 7th ed. John Wiley & Sons. Dostupné na Wiley.
6. **Thermo Fisher Scientific.** Cell Culture Basics: Aseptic Technique. Online metodická příručka.

Videa

<https://videos.thermofisher.com/detail/video/5765962892001/aseptic-techniques:-cell-culture-basics> (základy buněčné kultivace)

<https://www.youtube.com/watch?v=WWS9sZbGj6A> (použití hemocytometru)