

SEJTKULTÚRÁK ÉS PREPARATÍV TECHNIKÁK

(TBBE0230 TBBE2230)

BEVEZETÉS

- *Sejtbiológiai alapismeretek: az emlős sejtekről általánosságban,*
- *Sejtalkotók*
- *A sejtenyésztés történeti áttekintése*

Állati sejtek

„omnis cellula e cellula” *Rudolf Virchow 1855*

- ▣ „omnis cellula e cellula” új sejtek csak már meglévő sejtekből keletkezhetnek
- ▣ Az eukarióta sejtekben membránnal határolt sejtorganellumok találhatók.
- ▣ A sejt szervecskék a sejt plazmában helyezkednek el.
- ▣ A különböző szöveteket az adott funkció elvégzésére specializálódott sejtek építik fel.

Sejtorganellumok:

- ▣ Membránokkal határolt sejt szervecskék amelyek meghatározott funkciókat végeznek el a sejtben.
 - Sejtmag
 - ▣ A sejtmag mátrixában található a bazofil festődést mutató kromatinállomány laza szerkezetű: eukromatin, tömörödött, erősen festődő: heterokromatin
 - ▣ Magvacska: basofil festődésű RNS-t tartalmaz, a riboszómaképződés központja
 - ▣ A sejtmagot borító maghártya kettős membránból áll, melyek között 20-40 nm széles perinukleáris tér foglal helyet.

A sejt ciklus, és sejtosztódás:

- G1 fázis: Az mRNS-ek, tRNS-ek, a DNS megkettőződéséhez szükséges fehérjék (riboszómák, enzimek), és a centriolumok szintézise. Restrikciós (R) pont. Check point.

S fázis: a DNS megkettőződésének szakasza.

G2 fázis: fehérje- és mRNS szintézis. A mitózishoz szükséges fehérjék szintézise.

M fázis: a sejtek osztódási szakasza, kromoszómák a sejtmagban

Ha az R pont előtt nincs mitotikus szignál, a sejt kilép a sejt ciklusból: G0 fázis

○ A sejtciklus szabályozó molekulái:

A legfontosabb szabályozómolekulák a G1 és mitózis ciklinek, és a ciklinekkel komplexet alkotó ciklin dependens kinázok.

A sejtciklus vizsgálatához a sejtek tenyésztésben történő fenntartása jó lehetőséget biztosít.

Az osztódó sejtpopulációkban mitózisok és interfázisok váltják egymást ezek, a folyamatok alkotják a sejtek életciklusát, a sejtciklust.

A metafázisos kromatinszerkezet kialakulása:

- ❖ Az interfázisban lévő sejtek kromatin kondenzálódását a folyamat során megjelenő intermediereken keresztül tudjuk vizsgálni
- ❖ A kromatin szerkezetek kialakulásának kezdeti lépése a nukleosómák (a DNS rátekeredése a hisztonmolekulákra) létrejötte.
- ☐ Eukromatin: aktív DNS- régiókat tartalmazó lazább szerkezetű kondenzációs forma. (a mag középső területén található, R-sávozottságot mutat)
- ☐ Heterokromatin: kondenzáltabb későn replikálódó, kifejeződésre nem kerülő forma. (a magban perifériális elhelyezkedésű G- és Q-sávozottságot mutató rész)
 - Endoplazmatikus retikulum DER, SER
 - ☐ A külső maghártya közvetlen kapcsolatban van az endoplazmatikus retikulum membránjával, felszínén riboszómák figyelhetők meg:
 - ☐ Durva felszínű ER (fehérjeszintézis) ciszernákból áll, bazofil festődésű
 - ☐ Sima felszínű ER (lipidszintézis) elágazó és újra egyesülő tubulusok
 - Golgi apparátus
 - ☐ A sejtmag közelében helyezkedik el
 - ☐ Kisebb elkülönülő alegységei a diktioszómák. Falukat membrán határolja, bennük enzimek vannak, melyek az ER-ből érkező fehérjék módosítását végzik.
 - ☐ Szerepet kapnak a fehérjék szállításában is (transz-ciszternák)
 - Lizoszóma

- ☐ A Golg-apparátus környékén található szervecskék
 - ☐ Membrán határolja, a belső része szemcsézett
 - ☐ Savas pH-n működő hidrolitikus enzimeket tartalmaz
 - ☐ A sejt szerves molekuláinak bontását végzi

- Peroxiszóma
 - ☐ Membránnal határolt szemcsés szerkezetű, néha kristályt tartalmazó szervecske
 - ☐ Enzimeik az oxidatív folyamatokat katalizálnak pl.: peroxidáz, kataláz

- Mitokondrium
 - ☐ Két membrán határolja. A belső terét a belső membrán lefűződése növeli meg, a belső terét szemcsés mátrix tölti ki.
 - ☐ A mitokondrium működése során a $ADP + P_i \rightarrow ATP$ szabadul fel (e-transzportlánc, p^+ pumpa)

- Citoszkeleton
 - ☐ A sejtet támasztó és a sejt alakját biztosító fonalszerű fehérjehálózatot sejtváznak nevezzük. Ezt a hálózatot mikrotubulusok, intermedier filamentumok ill. mikrofilamentumok építik fel.
 - ☐ Fontos szerepe van a sejtben belüli aktív mozgások létrejöttében, és a sejt mozgásában is.

Sejthalál:

Az apoptózis és a nekrozis morfológiája

Apoptózis:

Programozott sejthalál, ami külső (extracelluláris) vagy belső (intracelluláris) szignálok által következik be. Kiváltói: az „öngyilkos szignálok megjelenése, ill. a „túlélő” szignálok hiánya. Ezer vágás által bekövetkező sejthalál az örökítő anyag hasítását kaspáz enzimek végzik.

Fiziológiás folyamat fontos az egyedfejlődés során a mind a növényi, mind az állati szövetek differenciálódásának az alapja.

Patológias folyamatokban is megjelenik (pl.: vírusfertőzések) vagy ha a sejt élete során olyan hiba következik be, amit az nem tud kijavítani.

Aktív, energiát igénylő folyamat, amely során a sejt térfogata csökken, a sejtalkotók feldarabolódnak, membránlefűződés keletkezik -> blebbing, majd apoptotikus testek keletkeznek. Ezeket a fagociták takarítják el (nincs gyulladás).

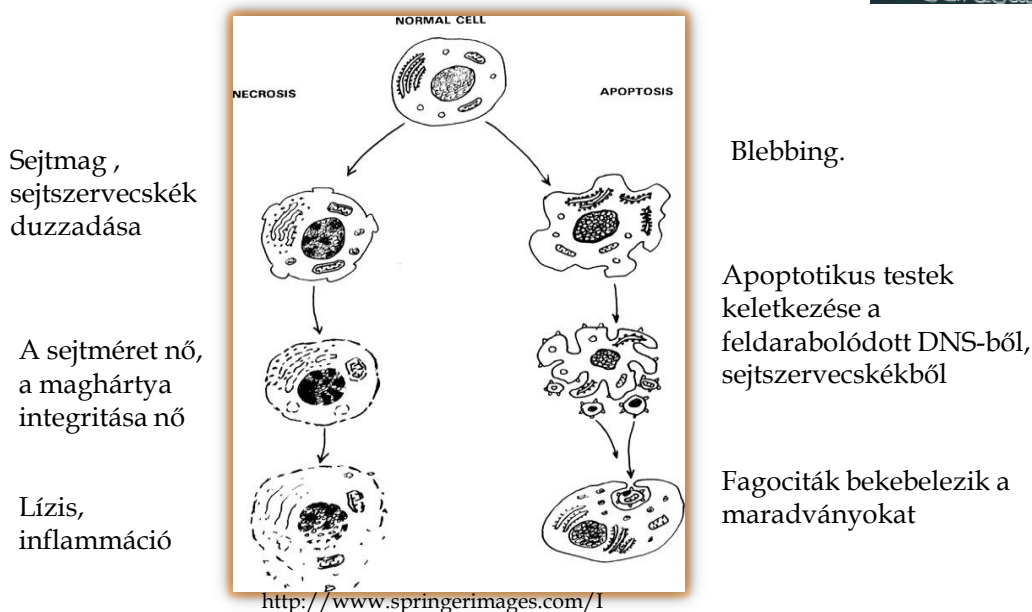
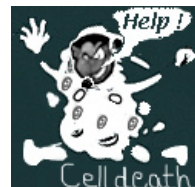
- ▣ A sejtelhalás legjobban jellemzett típusa.
- ▣ Egyedfejlődés során meghatározott helyen és időben bekövetkező sejtpusztulás.
- ▣ Aktív (azaz energiaigényes), viszonylag gyors és „csendes,”gyulladásmentes folyamat.

Nekrózis:

A sejtelhalás passzív (nem energiaigényes) patológias formája. A emésztő enzimek termelődése és a fehérjék denaturálódása indítja be a folyamatot, aminek következményeképp a sejt mérete nő, a sejtmembrán felszakad és a sejt tartalma a környező szövetbe kerül (gyulladást okozhat).

- ▣ Lehet programozott esemény és folyamat is.
- ▣ Kiváltói lehetnek bizonyos specifikus membránreceptorokhoz kötődő ligandok.
- ▣ Genetikailag, epigenetikailag és gyógyszeresen is lehet szabályozni.

SEJTHALÁL: AZ APOPTÓZIS ÉS A NEKRÓZIS MORFOLÓGIÁJA



A sejtenyésztés történeti áttekintése

Sejtenyésztés: diszpergált sejtek fenntartása *in vitro* körülmények között. Az *in vitro* kifejezés eredetileg azt jelenti, hogy „üvegben” (üvegedényben, lombikban), mai tudományos jelentése viszont az, hogy nem az élőlényben (*in vivo*), hanem laboratóriumi körülmények között a külső hatásokat kontrollálva működtetnek valamilyen folyamatot.

MÉRFÖLDKÖVEK A SEJTENYÉSZÉS TÖRTÉNETÉBEN

▣ Sydney Ringer

A 19. századi fiziológus. K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} és Cl^- ionokat tartalmazó izotóniás sóoldatban szervezeten kívül életben tartotta a béka izolált szívét. (Ringer-oldat)

▣ Wilhelm Roux

1885: Roux a német zoológus, csirkeembriókkal (tojásokkal) foglalkozott. A csirkeembrió medulláris lemezét eltávolítás után néhány napig életben tudta tartani meleg sóoldatban. Fontos eredményt ért el a sejtenyésztési technikák fejlődésében, és a szövettenyésztés alapjainak kidolgozásában. A nevéhez kötődik a Roux-flaska (Ross Granville Harrison és Paul Alfred Weiss).

▣ Ross Granville Harrison

1907. Sikeresen tenyésztett béka idegsejteket nyirok folyadékban és ezzel megtette az első lépést az őssejtek kutatások irányába. Nobel-díjat kapott munkájáért.

▣ Montrose Burrows

1910. Burrows segítségével Alexis Carrel az embrionális és felnőtt szöveteket is tenyésztett, pl.: kutyából, csirkéből, patkányból. Tenyésztőközeg: a frissen gyűjtött plazma ugyanabból a forrásból származik, mint a szövet. Sikeresen használta ezt a "plazma médiát" a csirke, patkány, kutya és humán tumorok sejt kultúráira (Carrel, A. and Burrow, M. T. (1911) Cultivation of tissues in vitro and its technique. J. Exp. Med. 13:387-396.)

▣ Alexis Carrel

1923-ban ő fejlesztette ki az első sejtenyésztő edényt. Ezek az úgynevezett D-palackok. Ezekkel az új edényekkel lehetővé vált, a nagyobb mennyiségű médium használata, mint egy függő csepp kultúránál. Ennek eredményeként, az új lombik kultúráknak könnyű volt a fenntartása, és hetekig életképesek voltak.

▣ Charles A. Lindbergh:

Lindbergh szivattyú szervkultúrákhoz: A leghíresebb találmánya, egy üveggamma melyet sikeresen alkalmazott csaknem 900 kísérletben (életben tartotta a szerveket, megoldotta a médium keringetését)

Lindbergh kifejlesztett egy egyszerű, sejt kultúra perfúziós kamrát is.

▣ 1967: Van Wezel:

A mikrokarrieres sejtenyésztés kidolgozása, a sejtek tenyésztése apró hordozó szemcsék felületén

▣ 1970: Rekombináns DNS technika alkalmazása a mikroorganizmusokon kívül állati sejteknél is. Sikerült egy vektorral DNS-t bevinni és expresszálni állati sejtbe.

▣ 1975: Köhler és Milstein Nobel díjas felfedezése: Kétféle emlős (egér) sejt fúziójával, ún. hibridómát tudott létrehozni, mellyel immunfehérjéket lehetett gyártani.

Használt (táp) közegek:

Különbféle sóoldatok, ascites folyadék, embrió/kivonat, vérplazma.

▣ 1907-1910. Ross Granville Harrison. A szövettenyésztés technikai alapjainak megteremtése.

▣ 1911. Alexis Carrel (és munkatársai).

- Sebészeti technikák bevezetése (asepsis, antisepsis), megfelelő tápközegek keresése, alkalmas edényzet kifejlesztése. (Pl. Carrel flaska.)
- „Bármilyen szövet, akármennyi ideig fenntartható in vitro, megfelelő subcultivációs technikával.”

☐ (Csirkeembrió szívéből készült explantatumból indított tenyészetet 32 évig sikerült folyamatosan *in vitro* fenntartani, mikor is lezárták a kísérletet. Ezt az eredményt sokan vitatják.)

☐ 1940. Szintetikus tápközegek (medium) kifejlesztésének korszaka.

☐ 1952. Moscona. Szövetek trypsin emésztése ► tényleges sejtenyésztés.

Összefoglalva a főbb technikai eredményeket:

- ❖ 1907 Harrison először hozott létre sejt kultúrát
- ❖ 1950-es évek: Earl, Eagle szérumszerű médium
- ❖ 1980-as évek:
 - ❖ szérumszerű médium,
 - ❖ perfúziós kultúra,
 - ❖ génamplifikációs eljárások
- ❖ 1990-es évek: irányított szövettenyésztés és regeneráció

A SEJTKULTÚRÁK

- A sejt kultúrák típusai: szuszpenziós, és adherens sejtek sajátosságai.
- Egyedi sejtek morfológiája, etológiája

A sejtek sejt kultúrában történő tenyésztésének előnyei:

- Lehetőséget nyújt a különböző sejt fajták egymástól szeparáltan történő tenyésztésére.
- Kísérleti körülmények kontrollálása könnyebben megoldható, mint intakt organizmusok esetén.

- A sejt saját tulajdonságai szabadon vizsgálhatók, mivel a más sejttípusokkal való kölcsönhatások nem érvényesülnek

☉ Sejtkultúra (Cell Culture)

Sejtek tenyésztése *in vitro*. A sejteket ez esetben önálló egységeknek, individuumoknak tekintjük. A tenyésztésüket, fenntartásukat pedig kutatási, ipari célokra meghatározott mennyiségben és minőségben jól definiált és kontrollált *in vitro* körülmények között valósítjuk meg. A sejttenyészteteket létrehozhatjuk adott szövetek diszpergált sejtjeiből, vagy meghatározott sejttörzsekből stb. a sejttenyésztetek közös jellemzője hogy nincs szövetté szerveződés. (3D-s növekedés lehet)

☉ Szövetkultúra (Tissue Culture)

Szövetfragmentumok fenntartása *in vitro*, akár a szövet eredeti szerkezetének fenntartása nélkül.

☉ Szervkultúra (Organ Culture)

Szövetek, teljes szerv vagy szerv egy darabjának fenntartása v. szaporítása *in vitro*

Lehetősége van differenciálódni és megőrzi szerkezetét, funkcióját.

- Tissue engineering:

Mára már önálló tudomány, eredetileg a biológia (biológiai anyagtudomány) és a mérnöki tudományok határterülete volt. A tissue engineering fő célja a valamely okból bekövetkező a olyan szövethiány megszüntetése (regenerálása, újraelőállítás) melyet szervezet természetes módon nem tud pótolni (betegségekből balesetektől származó szövethiány). Ezt a különféle sejttenyésztő, szövettenyésztő technikák, biológiai, biokémiai faktorok, anyagok alkalmazásával valósítja meg.

Leginkább a porc,- csont,- ér,- szív,- stb., szöveteinek (teljes szervek) regenerációjával függ össze a háromdimenziós szövettenyésztés révén. (A két dimenzióban történő szövettenyésztés nem alkalmas ez összetett szövetek létrehozására.)

Jellemző „eszköze”:

Scaffold: speciális váz a szövettenyésztéshez.

Olyan speciális polimerek természetes vagy szintetikus anyagok (polipeptidek, poliszacharidok stb.) melyek állványzatként szolgálnak a háromdimenziós szövettenyésztéshez pl.: porcszövet, csontszövet bőrszövet (háromféle sejt) tenyésztése, de véredények is létrehozhatók így, ill szív regenerációja is megoldható.

Több kritériumnak meg kell felelnie egy jól használható scaffoldnak:

- ✓ Nem válthat ki immunreakciót (host vs. graft jelenség csökkentése)
- ✓ A felülettel szembeni elvárások: ECM és a sejtek könnyen kapcsolódhassanak, egyenletesen oszoljanak el a scaffold felületén (migráció). Legyen nagy a fajlagos felület (pólusok).
- ✓ Átjárhatóság: Biztosítsa a megfelelő tápanyagellátást anyagáramlást, (pólusok)
- ✓ Biodegradálhatóság : idővel lebomlik a szervezetben. A lebomlással a biológiai anyagok fokozatos/ időszakos felszabadulása is megoldható.

Az adott szövet kialakításához szükséges sejtek:

- A tenyésztési kívánt szövetre jellemző érett, differenciálódott sejtek.
- Progenitor sejtek, köztes alakok az őssejtek és az érett sejtek között.
- Őssejtek: kétféle típusú őssejt:
 - Felnőtt őssejt Adult Stem Cell pl.:
 - csontvelői őssejtek,
 - MSC ~mezenhimális őssejt (Zsír szövetben is)
 - HSC ~hematopoetikus őssejt
 - ESC ~endoteliális őssejt
 - de minden szervben vannak
 - Embriónális őssejtek Embryonal Stem Cell

A 3D-s szövettenyésztés során fontos:

A) megfelelő áramlás kivitelezése, ha ez nem megfelelő: kifelé terjedő apoptózis, nekrozis következik be a tenyésztés belsejében.

B) nagy mennyiségű sejt/ szövet létrehozása szükséges egy-egy új szövet/szerv létrehozásához

A megoldás: kevertetett tenyésztetek, bioreaktorok. Ezek olyan tenyésztési eljárásokat jelentenek melyek során a fiziológiai környezetet a bioreaktorokon belül úgy szimulálják, hogy az a sejtek növekedését, és megfelelő differenciálódását segítse.

Fontos továbbá hogy a tenyésztett 2-, 3D-s sejt kultúráknak ún. dinamikus kultúra legyen. Ez azt jelenti, hogy az oxigén-, és tápanyagellátás (csere) folyamatos és dinamikus legyen. A

statikus, nem áramló folyadékban az oxigén diffúzió 100 μm vastagságig megoldható, a dinamikus (áramló tápfolyadékban növesztett) 3D kultúrák vastagsága viszont ennek többszöröse is lehet, hiszen az anyagáramlás biztosítva van. Egyes szövettípusok tenyésztése, és a későbbi a funkciónak megfelelő működése szempontjából fontosak a sejteket érő mechanikai stimulusok is (pl.: porc,- csontszövet sejtszámára szükséges, de más sejtekre nézve nem kedvező) e miatt a bioreaktorokban az áramlás következményeként fellépő nyíróerőket a megfelelő szinten kell tartani.

Egy jó bioreaktor jellemzői:

- egyszerű összerakni, szétszedni
- könnyű tisztítani
- biokompatibilis, v biológiailag inert anyagból van
- sterilizálható
- különböző műszerekkel kiegészíthető pl.: pH mérő, pumpa.

Fajtái:

- keverő: (Az áramlás biztosítása folyamatos keveréssel, a scaffoldok rögzítve vannak a reaktortérben)
- forgó: (A scaffoldok szabadon, felfüggesztés nélkül lebegnek. A nyíróerő alacsonyabb a scaffoldok eloszlása egyenletesebb)
- kompressziós: (Dinamikusan változó nyomóerő biztosítja az áramlást)
- húzó-feszítő: (A nyíróerő helyett húzóerő pl.: izom-, ínszövet)
- perfúziós: (Átfolyós rendszerű, egyenletesebb anyag, és sejteloszlás pl.: csontszövet)

Bioprinting: szövetnyomtatás

A feltaláló: Forgách Gábor, Missouri Egyetem

A tintasugaras nyomtató elvén működik. Lényege hogy az egyik injektorban sejt szuszpenziót, bio-tintát? ~bioink (sejt aggregátumok, ún. spheroidok) egy másikban pedig az ezek megtartásához szükséges tápanyag dús gélt/médiumot –ezt később eltávolítják - adagolja egy hidro-gél alapú vázra. A sejtgömbök később fuzionálnak, szövétté állnak össze. A véredények esetében az aggregátumokat körkörösén „nyomtatják” pontosan az előző réteg fölé, így a sejtek fúziója során egy cső jön létre.

Ez a technológia az ipari felhasználással a mesterségesen létrehozott szövetek elterjedéséhez, és szövetek ipari méretű gyártásához vezethet.

A sejtkulúrák típusai:

A; Adherens (letapadó) sejtek

A sejtek monolayeret alkotnak, azaz egy rétegben kitapadnak a flaska aljára. A tenyésztőfelület százalékos borítottsága a konfluencia szint. Ezen sejtek tenyésztéséhez speciális felület szükséges. Az adherens sejtek hosszú távú vizsgálati módszerekkel jól vizsgálhatók (apoptózis, nekrozis, osztódás, sejt-sejt interakciók) De az ilyen sejttenyészetek fenntartása bonyolultabb a sejtek átoltása során, passzáláskor a letapadás megszüntetéséhez enzimikus kezelés (tripszin) szükséges. A tenyészet növekedését a rendelkezésre álló tenyésztőfelület limitálja.

Általában a tömör szövetekből (bőr, máj stb.) származó sejtek

Az adherens sejtek sajátosságai

- Letapadási függőség (kitapadásra alkalmas felszín szükséges, integrin molekulák)
- Fokális kontaktus (sejt növekedéséhez szükséges kapcsolatok sejt-sejt, sejt-kötőszövet stb.)
- Kontakt gátlás (a rendelkezésre álló szabad felület csökkenése gátló hatású a növekedésre)

Sejtkapcsoló struktúrák

⊙ Kihorgonyzó kapcsolatok

- Dezmoszóma (*macula adherens*): sejtek közötti foltszerű kapcsolóstruktúra
- Hemidezmoszóma: a sejteket a környező kötőszövethez különösen lamina basalis-hoz rögzítő foltszerű szerkezet
- Adherens junction: a hámsejtek oldalsó felületén övszerűen körbefutó szerkezet, mely szomszédos sejteket kapcsol össze
- Fokális kontaktus (adhéziós plakk): a zonula adherens-hez hasonló, de a sejt-kötőszövet kapcsolatban részt vevő szerkezet, mely a sejtek mozgásában is szerepet játszik

⊙ Mechanikai kapcsolóstruktúrák

Tight junction (= szoros illeszkedés): övszerűen körbefutó szerkezet. Mechanikai kapcsolat, barrier funkció

⊙ Kommunikációs kapcsolat

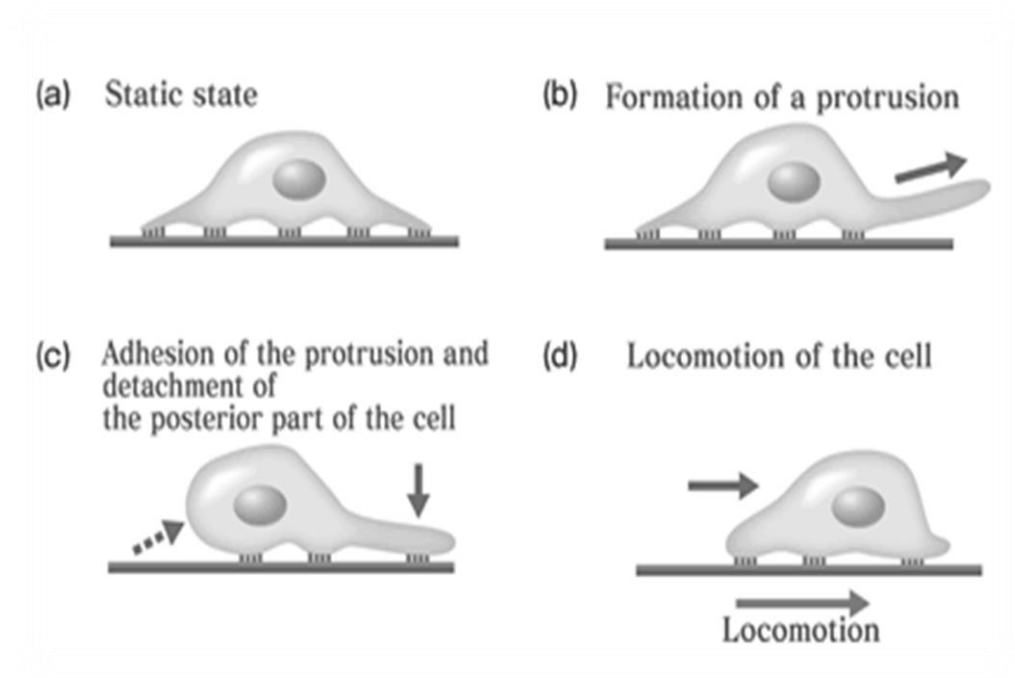
Gap junction (= réskapcsolat): csatornákat képez a sejtek között. Anyagtranszport (neurotranszporterek)

Migráció:

A sejtek mozgásának kulcsfontosságú szerepe van a szövetek kialakulásában, differenciálódásában, a szövetfunkciók normál fenntartásában, ill. a kóros folyamatok lefolyásában.

A migráció lépései:

- ⊙ A sejt a mátrix anyagához horgonyzódik.
- ⊙ A mozgás kezdeteként, a sejtadhézió csökken a mozgás irányával ellentétes oldalon, és a mozgás irányába sejtnyúlvány irányul.
- ⊙ A nyúlvány a mátrix anyagához kapcsolódik, és a másik oldalon a sejt-mátrix kapcsolat megszűnik.
- ⊙ Végül, a hátsó részből a citoplazma áramlik az elülső részbe, amely lehetővé teszi a sejt előre mozgását.



B; Nem adherens (szuszpenziót alkotó) sejtek

A sejtek lebegnek a tápfolyadékban. Általában az immun-, és a vérképző rendszerből származó sejtek, illetve egyes rosszindulatú tumor sejtek, melyek letapadva és szuszpenzióban is nőnek.

Ezeknek a sejteknek nem szükséges speciális tenyésztőfelület a tenyésztés során.

Egyszerűbb a passzálás - egy-egy tápfolyadék csere az átváltás is jelenti-, viabilitás vizsgálat, de ha a növekedési mintát is vizsgáljuk naponta sejtszámolás szükséges.

A tenyészet növekedését a sejtek koncentrációja limitálja.

A sejtek morfológiai típusai

- ⊙ Lymphoblast-szerű sejtek gömb alakúak, és általában szuszpenzióban nőnek.
- ⊙ Fibroblastic (vagy fibroblast-szerű) sejtek bipoláris vagy többpólusú, hosszúkás alakú, letapadó sejtek.
- ⊙ Epithelialis-szerű sejtek poligonális alakú, többdimenziós növekedésű, letapadó sejtek.
- ⊙ Neuronok (idegsejtek) különböző méretű és alakú sejtek, jellemző képletek a dendritnyúlványok.

SEJTTÍPUSOK

- *Őssejtek sajátosságai: ES-vonalak, hematopoetikus őssejtek*
- *Normál, nem tumoros sejtek sajátosságai*
- *Tumoros sejtek sajátosságai (HeLa, Melanoma malignum Uveális melanoma)*
- *Immortalizált sejtek sajátosságai*

ŐSSEJTEK:

- Differenciálódási képesség szerinti csoportosítás:
 - Totipotens (a megtermékenyített petesejt)
 - Pluripotens (ekto- mezo- entoderma sejtjeivé differenciálódhat -> embrionális őssejt)
 - Multipotens (ivarsejté nem, de más szöveti sejté differenciálódhat, csökkent differenciálódási potenciál -> szöveti őssejt)
 - Unipotens (megújuló sejt, de csak egyféle sejté tud differenciálódni)
- Származás szerint:
 - Embrionális őssejt ESC (Embryonic Stem Cell)

- Olyan pluripotens sejtek melyeknek utódsejtjei is pluripotensek maradnak.
- Könnyen differenciálódnak a tenyésztés során.
- Az ES-sejteket számos kutatási területen felhasználják:
 - kimérák létrehozása
 - génmódosítás,
 - transzgénikus sejtek

Pluripotens embrionális őssejt-vonalakat jellemző sajátosságok összefoglalása

- Hólyagsíra állapotú embrió embriócsomójából származnak, és képesek folyamatosan osztódni anélkül, hogy differenciálódnának.
- Stabil, diploid kromoszómakészlettel rendelkeznek.
- Mindhárom csíralemez sejtje létrejöhet belőlük in vitro differenciálódás során.
- Képesek beépülni hólyagsíra állapotú embrió embriócsomójába, ott tovább osztódnak, differenciálódnak, bekapcsolódnak az embrionális fejlődés mentébe. Kiméra embriót, kiméra állatot képesek létrehozni, ill. az utódsejtek képesek bekerülni a kiméra állat ivarsejtjei közé is, beépülve a csírasejt-vonalba hím, illetve női ivarsejteket képesek létrehozni.
- "Klónozható", ami ebben az esetben azt jelenti, hogy egyetlen ES sejtől kiindulva létre lehet hozni genetikailag azonos sejtek halmazát, újabb ES sejttenyészeteket.
- A sejtek nagyrészt a sejtciklus S fázisában tartózkodnak, nem szükséges külön külső inicializáció ahhoz, hogy a DNS replikációja megtörténjen, de külső faktorok hozzáadásával is befolyásolni lehet a sejtek osztódását, és indukálni lehet differenciálódásukat is.
- Az ES sejtekben nem figyelhető meg X-kromoszóma inaktiváció.

- Foetális őssejt
- Köldökvérből származó őssejt
- Szomatikus őssejt (HSC→MSC)

- A különböző szövetekben kis mennyiségben jelenlévő multipotens sejtek.
- MSC = mezenchymal stem cell Elsődlegesen a humán csontvelőből, de köldökzsinórvérből, (-> indukált pluripotencia (iPSCs)) májból-zsírszövetből származó fibroblaszt jellegű őssejtek az ún. mezenhymális őssejtek
- Haematopoetikus őssejt (HSC)
 - Feladatuk a vérsejtek utánpótlása
 - A felnőtt szervezetből származó sejtek különböznek a köldökzsinórvérből származó sejtektől itt több az éretlen sejt= nagyobb osztódási kapacitás
 - Haematopoetikus őssejtek (HSCk) típusai:
 - Hosszú életű HSC (LT-HSC) → Rövid életű HSC (ST-HSC) → multipotens progenitor sejtek (MPC vagy MAPC vagy MSC).
 - MSC sejtek: kisebb számban vannak jelen, ekto-, endo-, és mesodermális sejtekké is alakulhatnak
- Nem haematopoetikus őssejt

NORMÁL SZÖVETI SEJTEK

- ⊙ Véges élettartamú sejtek, azaz a tenyésztés során a passzálások száma véges (40-50 átoltás).
- ⊙ Szövettől függő sejttípus.
- ⊙ Sejtkultúrát a szöveti sejt izolálásával indíthatunk → primer kultúra
 - ⊙ A sejtek közvetlenül egy szövetdarabból származnak
 - ⊙ Először 1907-ben alkalmazták
 - ⊙ Általában limitált passzálást élnek meg (kivéve a tumorból származó primerek)

Telomerek szerepe a sejtek életében

- A sejtek élettartamának egyik meghatározó tényezője a kromoszómák végein található speciális szakaszok, az úgynevezett telomerák (telomerek) hossza.

- A telomerek szintéziséért a telomeráz enzim a felelős. Normál esetben ez az enzim olyan alacsony aktivitású, hogy osztódáskor ez a szakasz megrövidül.

A telomer-sapkák eltűnése az apoptózist váltja ki (ha nincs telomer szakasz, a fontos információkat tartalmazó DNS károsodik és e mellett a kromoszóma végek összetapadnak, a létrejövő sejt életképtelenné válik)

TUMOROS SEJTEK

- A daganatokban genetikailag módosult sejtklónok olyan sejtek populációit hozzák létre, amelyekre a kontrollálatlan növekedés jellemző.
- Több daganattípusban a sejtciklus szabályzó mechanizmusának sérülése, vagy hiánya mutatható ki.

Majdnem minden daganattípusnál a sejtosztódás zavara a G1 fázisban végbemenő szabályzó folyamatok zavarával hozható összefüggésbe.

Daganatos sejtek → celluláris okok

- ⊙ Két géncsalád aktivitásában van általában abnormalitás:
 - Protoonkogén -mutáció → onkogén: funkcióyerést okozó mutáció. Domináns
 - pl.: Ras: az onkogén egy pontmutáció hatására hiperaktívvá válik, mitotikus szignált közvetít, és rendellenes osztódásokat okoz (Ras – MAP/ERK kináz kaszkád – ciklin D túltermelés)
 - Szupresszor gének –mutáció → tumorszupresszor gének: (Rb, p16): géntermékeik gátolják az onkogéneket. Általában funkcióvesztéssel járó mutációk. Recesszív.
 - Rb: (örökletes/nem örökletes) restrikciós pont gátlása, mitogén stimulációig.
 - p16 gén mutációja gyakori daganatos sejtekben.
- ⊙ Stabilitás gének: a DNS-hibajavítási rendszer tagjai

HeLa (Henrietta Lacks méhnyakrák sejtjei)

- A HeLa sejtvonal az első, Petri-csészében nevelt halhatatlan emberi sejtvonal.
- A HeLa sejtvonal örök életét a telomeráz enzim egy különös aktív fájának köszönheti, ami megakadályozza, hogy a kromoszómák sejtosztódás során rövidüljenek

IMMORTALIZÁLT SEJTEK

- ⊙ Az immortalizált sejtvonalak korlátlan számú sejtosztódásra képesek, de változhatnak, pl.: mutációk során
- ⊙ Az immortalizált sejteket vagy sejtvonalakat nagyszámú osztódás és nagy sejttömeg jellemzi. Elvárásként tekintető a primer sejtekhez hasonló genotípus illetve fenotípus.

Immortalizáláshoz használható technikák:

- ✓ Vírus génszakasz beépítése a genomba
- ✓ Telomeráz reverz transzkriptáz (TERT) protein expressziója Pl.: humán sejtek.
- ✓ Ras vagy Myc overexpressziója is hatásos immortalizációs mechanizmus egyes sejtípusokban.
- ✓ Általában vírusgénnel inaktíválják a megfertőzött sejt tumor szupresszor génjeit (p53, Rb, stb.) közvetlen immortizáló hatást érnek el.

Pl.: HaCaT, De bármely szöveti (tumoros) sejt immortalizálható.

SEJTKULTÚRA TÍPUSOK

- *Primer sejt kultúra.*
- *Szekunder sejt kultúra.*
- *Sejtvonal.*
- *Sejttörzs.*

A sejttenyészetek „kor” szerint

Primer sejt kultúra (Az izolált sejtek összessége) → Szekunder sejt kultúra (már csak a tenyésztési kivánt sejteket tartalmazza) → *Immortalizálás, v tumor sejtek* → Sejtvonal → Sejttörzs

Primer sejt kultúra

A sejtek közvetlenül egy szövetdarabból származnak, így megőrzik a szövet sejtjeire jellemző morfológiai és biokémiai sajátosságokat.

Először 1907-ben alkalmazták

Általában limitált passzálást élnek meg (kivéve a tumorból származó primerek)

Primer izolálási protokoll

- Az izolálandó sejteket tartalmazó szövetet steril körülmények között eltávolítjuk, és aprítjuk
- A szövetfajtától függően különböző enzimeket használva kinyerjük a sejteket
- A megmaradt szövetrészeket steril gézen átszűrve távolítjuk el
- A sejteket centrifugáljuk, életképességet nézünk
- Tenyésztőedénybe helyezük őket, médiumot adunk hozzájuk.

Szekunder sejt kultúra

Minden sejttenyészet primer kultúraként kezdi pályafutását. Sok esetben a kinyert sejtek megfelelnek a tenyésztés kritériumainak, máskor szelektálni kell a kívánatos sejteket. A szelektálás legegyszerűbb módja a tápfolyadék cseréje (letapadó sejtek esetén), más esetben különböző supplement-ek hozzáadása szükséges pl.: geneticin.

Az első passzálas (szub/kultiváció) után az *in vitro* tenyészet sejtjeit már a szekunder kultúra megjelölés illeti. Szokás ettől az átoltástól kezdve sejtvonallal beszélni.

Fibroblasztosodás

A fibroblaszt sejteknek a többi szöveti sejthez képest igen nagy poliferációs képessége van (elfibroblasztosodás) Ez számunkra nem jó hír, mert a kívánt sejtfeleség helyett fibroblaszt sejtek fognak nőni. Elkerülése pl.: geneticin.

Kritériumok a sejt vonal elnevezéshez

A sejt vonal: általában egy adott primer kultúrára visszavezethető, jól tenyészthető (ennek megfelelően az esetek többségében transzformáltnak tekinthető) sejtek csoportja, és itt a közös ősből eredés meghatározó. Az ún. „established cell line” tartósan azonosnak tekinthető önmagával, de ez a kitétel erős fenntartással fogadandó (öregedés → mutáció). A sejt vonalak irodalmilag azonosíthatók, → ha magunk állítunk elő ilyet, igen részletes leírást kell adnunk róla, és azt szakirodalmi közleményben szerepeltetnünk is kell.

Véges (finite cell line) és folytonos (continuous cell line) sejt vonalak:

A normál sejtek véges osztódást élnek meg, mielőtt elvesztik a poliferációs képességüket, azaz elöregednek e sejtekből létrehozott sejt vonalakat nevezzük Finite cell line-nak, vagyis véges sejt vonalnak. Ezeknél a sejteknél fontos információ a „p-szám” azaz a passzálasok száma.

Sok sejt vonalnál a spontán módon bekövetkező, vagy mesterségesen kivitelezett (kémiai vagy vírus által indukált) transzformációval a sejtek „halhatatlanná” tehetők –

immortalizálhatók az ilyen sejtvonalakat continuous cell line-nak, vagy folytonos sejtvonalnak nevezzük.

Transzformáció immortalizáció

Transzformáció: Valamilyen –nem azonosított – kémiai ágens, vírusfertőzés stb. következménye is, és lehet szándékosan előidézett (pl. fertőzés Epstein/Barr vírussal).

Bekövetkezhet spontán is, amit kifejezetten elősegít, ha a tenyészetet többször is konfluenssé hagyták nőni –adherens sejtek esetén.

Immortalizáció: Ez azt jelenti, hogy a sejtek immár korlátlan ideig tenyészthetők *in vitro*. De ezen transzformált sejteknek megváltozik a genomja, ami a kariotípusukban is megnyilvánul → aberrált sejtek

Sejttörzs

A sejttörzs megnevezés valamennyire rokon a sejtvonallal, általában ebből is származik (ritkán primer kultúrából), valamilyen szelekciós vagy klónozási eljárás eredményeként jön létre. Ennek megfelelően ez névleg még inkább azonos önmagával és az eredetéként szereplő sejtpopulációval. Névleg, mivel már nem ugyan azok a tulajdonságai, mint a primer sejteknek (transzformáció, aberráció spontán szelekció)

Növekedés

Ha a sejtekkel kapcsolatban a növekedésről esik szó nem az egyes sejtek növekedését, hanem a teljes sejtkultúra növekedését értjük. A sejtek növekedését több tényezővel tudjuk befolyásolni, a legegyszerűbben a kezdő sejtszámmal (nagy kiindulási sejtszám=gyorsabb növekedés)

Élő- és összsejtszám változása a tenyészetben

A sejtek növekedési fázisai:

- ❖ Lag Fázis: Általában 1-2 nap kismértékű a sejtszám növekedés: a sejtek alkalmazkodnak az új körülményekhez (sejten belül zajló folyamatok).
- ❖ Log fázis: Exponenciális mértékű sejtszám növekedés, a tápanyag függvényében.
- ❖ Plateau fázis: Egyensúlyi állapot jön létre közel annyi sejt keletkezik, mint amennyi elpusztul.

Irányelvek a biztonságos laboratóriumi gyakorlathoz

Útmutató

- ☞ Mindig viseljen **megfelelő egyéni védőeszközöket**. Váltson kesztyűt, és dobja ki a használtat, ha az más laboratóriumi vizsgálat során szennyezett lett.
- ☞ **Mosson kezet** munka után, és a laboratórium elhagyása előtt is a fertőzésveszély miatt.
- ☞ **Nem szabad enni, inni, dohányozni**, kontaktlencsét és kozmetikumokat viselni, és emberi fogyasztásra szánt **élelmiszereket tárolni** a laboratóriumban.
- ☞ Kövesse az intézményi szabályzatban foglaltakat **a vágó, szűrő eszközök biztonságos kezelését** illetően. (tűk, szikék, pipetták és törött üveg).
- ☞ Ügyeljen arra, hogy minimálisra csökkentsék az aeroszolok és / vagy fröccsenő anyagok létrehozását a kísérletek alatt, és **ha valami kiömlik vagy lecsöppen, azonnal törölje fel**, és fertőtlenítsen le mivel ezen anyagok a potenciálisan fertőzőnek minősülnek. Rutinszerűen kell tisztítani a laboratóriumi berendezéseket, akkor is, ha nem szennyezettek.
- ☞ Fertőtlenítsen az összes fertőzésveszélyes anyagot annak ártalmatlanítása előtt.
- ☞ **Jelentse a megfelelő személyzetnek** (pl. laboratóriumi felügyelő, biztonsági tiszt), **minden olyan eseményt, amelyek eredményeként a fertőzésveszély következik be.**

A biológiai biztonságról mikrobiológiai és orvosi laboratóriumokban (BMBL)

- ☞ Center of Disease Control and Preservation és a National Institutes of Health az egészségügyi, valamint a környezetvédelmi biobiztonsági szabályokat rendszeresen közzéteszi és aktualizálja a különböző nemzetközi lapokban: *biológiai biztonságról mikrobiológiai és orvosi laboratóriumokban (BMBL)* és az *elsődleges elszigeteléséről a biológiai veszélyeknek: a kiválasztás, a telepítés és a használat a biológiai biztonság szempontjából*.
- ☞ Ezek a kiadványok az 5. és 3. kiadásban közlik a nemzeti irányelveket, és elősegítik a biztonságos körülményeket és a munkavállalók egészségének megőrzését a biológiai és orvosi laboratóriumokban.
- ☞ Mindkét kiadvány letölthető elektronikus formában.
- ☞ További nyomtatványok is rendelkezésre állnak: a biológiai biztonság intézményi betartását segítve:
 - ☞ biológiai kockázatértékelési sablon,
 - ☞ egy testre szabható sablon, a laboratóriumi és egészségügyi dolgozók figyelmeztetése potenciális kockázatokra.

☞ A biológiai laborok biztonságtechnikai szintjei

☞ *Mikrobiológiai és biológiai biztonságról az orvosbiológiai laboratóriumokban* c. dokumentum tartalmazza azon irányelveket és útmutatásokat melyek a biztonságos munkavégzéshez szükségesek. A kiadványt a Centers for Disease Control and Preservation (CDC) és a National Institutes of Health (NIH) készítette. A **dokumentum meghatározza** a négy emelkedő szintű elszigetelést, - a továbbiakban a **biológiai biztonsági szintet**-, és leírja a mikrobiológiai gyakorlatot, a biztonsági berendezéseket létesítményben és az alkalmas védelmet a kockázati szinteknek megfelelően.

Biosafety Level 1 (BSL-1)

❖ BSL-1 az alap szintű védelmet biztosító, a legtöbb kutató és a klinikai laboratórium, kutatási terület: azon biológiai anyagok, amelyek nem okoznak betegséget a normális, egészséges embereknél.

Biosafety Level 2 (BSL-2)

❖ BSL-2 olyan kutatások kivitelezésére alkalmas laboratóriumok, melyek mérsékelt kockázatú kórokozók okozta emberi megbetegedések vizsgálatát végzik. Változó súlyosságú betegségek okozói: lenyeléssel vagy perkután expozícióval vagy a nyálkahártyán keresztül bejutva a szervezetbe megbetegedést okoznak.

❖ A legtöbb **sejtkultúra laboratórium** legyen legalább BSL-2 szintű, de a pontos követelmények függenek attól, hogy milyen sejtvonalat használnak, illetve a végzett munka típusától is.

Biosafety Level 3 (BSL-3)

❖ Olyan kutatások végzésére alkalmas laboratóriumok ahol az az őshonos és egzotikus kórokozóként ismert potenciálisan veszélyes, aeroszol formájában terjedve járványokat okozó mikrobák vizsgálata folyik.

❖ Olyan biológiai minták, amelyek súlyos és potenciálisan halálos hatásúak.

Biosafety Level 4 (BSL-4)

❖ Azon létesítmények ahol azok az egzotikus kórokozókat tanulmányozzák, melyek nagy egyedi kockázatot jelentenek, az életet veszélyeztető betegséget és járványt okoznak fertőző aeroszolként és ellenük semmilyen hatásos kezelés nem áll rendelkezésre. Ezek a biológiai minták amelyek kizárólag magas laboratóriumi elszigetelést biztosítva vizsgálhatók.

☞ Mikrobiológiai és biológiai biztonságról *Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition*

☞ IV fejezet Alapelvek a laboratóriumi biológiai biztonságról

- ☞ A BMBL IV (1999) megjelenése óta jelentős fejlődés ment végbe a biológiai biztonság kidolgozásában szigorításában végrehajtásában. Oka a 2001-es lépfene támadások az USA-ban.
- ☞ Ebben a szakaszban a laboratóriumi biológiai biztonság megtervezésére tett ajánlások szerepelnek.
- ☞ **Biológiai védelem (biosecurity) intézkedések** (jogszabályok politikai döntések stb.) melyek célja főképp az ember által véletlenül –baleset-, vagy szándékosan –terrorizmus- kiváltott járványok megelőzése – a közegészségügy, gazdaság és környezeti károk elkerülése-
- ☞ **Biosafety**: a veszélyes biológiai tényezők expozíciójának csökkentésére megszüntetésére tett lépéseket (hozzáférés korlátozása a létesítményhez a kutatási anyagokhoz és információkhoz.) a biológiai laboratóriumok munkabiztonságát jelenti.
- ☞ A biosafety és a biológiai biztonsági programok alapja a kockázatbecslés, eszközük a megfelelő szintű ellenőrzés melyet képzett szakemberek végeznek.
 - ☞ Az ATCC (American Type Culture Collection) - a világ legnagyobb mikrobiológiai törzsgyűjteménye – a mikroorganizmusok és a velük kapcsolatos termékeket a kezelési és szállítási követelmények szerint négy biztonsági szintbe – biosafety level BSL- sorolja.

Mikrobiológiai és biológiai biztonságról *Biomedical Laboratories (BMBL) 5th edition*

VII - Munkahelyi Egészségvédelmi és immunoprofilaxis

☞

A cél az, hogy orvoslást támogató szolgáltatásokkal egy orvosbiológiai kutatási területen, elősegítsék a biztonságos és egészséges munkahely megteremtése. A foglalkozási egészségügyi és biztonsági rendelkezések megalkotásában közös felelőssége van az egészségügyi szolgáltatóknak, a biztonsági szakembereknek, a vezető kutatóknak, a munkaadóknak és a munkahelyi személyzetnek e kutatások során. Az optimális munkavédelem függ a csoportok hatékony, folyamatos együttműködésétől.

- ☞ Első sorban felügyelők és biztonsági szakemberek feladata azonosítani a potenciális munkahelyi egészségügyi veszélyeket.
- ☞ A munkavállalókat teljes körűen tájékoztatni kell az egészségügyi kockázatokról, és a rendelkezésre álló orvosi szolgáltatásokról. Az orvosi támogatásokat a kockázatértékelés alapján a szolgáltató határozza meg.

- ☞ A munkavállalók számára a megfelelő immunizálást biztosítani szükséges. Rendszeres vizsgálatok végzése az expozícióknak megfelelően kordában tartva az esetleges fertőzéseket a szolgáltató feladata.

WHO

Laboratory biosafety manual - Third Edition megjelenés: 2004

Laboratory Biorisk Management: Strategic Framework for Action 2012–2016 megjelenés: 2012

61/1999. (XII. 1.) EüM rendelet

a biológiai tényezők hatásának kitett munkavállalók egészségének védelméről

- ☞ * „*A biológiai tényezők olyan a mikroorganizmusok, sejttenyészetek és emberi belső élősdiek, amelyek fertőzést, allergiát vagy mérgezést okozhatnak. Megjelenési formájukat tekintve lehetnek baktériumok és hasonló organizmusok, vírusok, paraziták és gombák, amelyek egyes tevékenységeknél a munkavégzés során súlyos kockázatot jelentenek a munkavállalók egészségére. Különösen a következő tevékenységeknél kell biológiai kockázatokkal számolni:*”

* Vonatkozási területek:

- ☞ Élelmiszer-előállító létesítményekben végzett munkák
- ☞ Mezőgazdasági munkák
- ☞ **Olyan munkatevékenységek, amelyek állatokkal, állatok tetemeivel, illetve állati eredetű termékekkel való érintkezéssel járnak (pl. ún. állati fehérje feldolgozás).**
- ☞ **Az egészségügyi és szociális ellátásban végzett munkák, beleértve az elkülönítő, valamint a kórbonctani részlegeket.**
- ☞ **A klinikai, állatorvosi diagnosztikai laboratóriumokban végzett munkák.**
- ☞ A hulladék megsemmisítő, ártalmatlanító létesítményekben végzett munkák.
- ☞ A szennyvíztisztító berendezésekben, járható szelvényű szennyvízelvezető művekben végzett munkák.

* Az 61/1999. (XII. 1.) EüM rendelet a biológiai tényezőket a fertőzés kockázatának szintjétől függően négy csoportba sorolja:

- ☞ **1. csoport:** az a biológiai tényező, amely nem képes emberi megbetegedést okozni.
- ☞ **2. csoport:** az a biológiai tényező, amely képes emberi megbetegedést okozni, ezért veszélyt jelenthet a munkavállaló számára, de elterjedése az emberi közösségben nem valószínű, az általa kiváltott betegség többnyire eredményesen megelőzhető, vagy a kezelése hatásos.

- ☞ **3. csoport:** az a biológiai tényező, amely súlyos emberi megbetegedést képes okozni, ezért komoly veszélyt jelenthet a munkavállaló számára, szétterjedésének kockázata az emberi közösségben fennállhat, de általában eredményesen megelőzhető, vagy a kezelése hatásos.
- ☞ **4. csoport:** az a biológiai tényező, amely súlyos emberi megbetegedést okoz, ezért komoly veszélyt jelent a munkavállaló számára, az emberi közösségben való szétterjedésének nagy a kockázata, általában nem előzhető meg, vagy nem kezelhető hatásosan.

* Kockázatbecslés

- ☞ A kockázatok ismerete a megelőzés alapja, ezért minden olyan tevékenységnél, amely feltehetően biológiai tényezők kockázatával jár, a munkáltatónak meg kell határoznia a munkavállalókat érő expozíció jellegét, időtartamát és - amennyiben lehetséges – mértékét.
- ☞ A különböző csoportokba tartozó biológiai tényezők együttes expozíciójával járó tevékenységnél a kockázatot minden jelen lévő biológiai tényezőre meg kell becsülni.
- ☞ A kockázatbecslés nem egyszeri aktus, hanem évente, továbbá minden olyan esetben meg kell ismételni, amikor a körülmények megváltozása a munkavállaló biológiai tényezőkkel történő expozícióját befolyásolhatja.

A sejttenyésztés biztonsági szempontjai

Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook-2nd Edition

- ☞ Mielőtt bármilyen tevékenységet kezdenénk kockázatértékelést kell végeznünk. Ez az értékelés két elemből áll:
 - ☞ 1, A kockázatok azonosítása és értékelése
 - ☞ 2, Irányelvek kiválasztása melyekkel a kockázatok elkerülhetők, minimalizálhatók
- ☞ Kockázati tényezők sejttenyésztésnél:
- ☞ Állati sejt kultúráknál a kockázat szintje függ a sejtípustól, a használat módjától, és azon alapul, hogy a sejt veszélyes-e az emberre:
 - ☞ **Alacsony kockázat-** Nem ember/nem főemlős sejt vonalak és valamint jól karakterizált humán sejt vonal.
 - ☞ **Közepes kockázat-** gyengén karakterizált emlős sejt vonalak.
 - ☞ **Magas kockázat-** primer sejtek emberi/főemlős szövetből vagy vérből. Sejt vonalak endogén kórokozókkal (a pontos osztályozás függ a kórokozótól). Sejt vonalak melyeken kísérleti fertőzést használtak (az osztályozás függ a fertőző ágenstől).

☞ Referencia: Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP) irányelvei.

SEJTNYÉSZTÉSI ALAPISMERETEK I-II

- Anyagok, eszközök.
- Steril munkavégzés.
- Primer sejtenyészet indítása. Sejtvonalak „élete”
- LTS rendszer: a sejtek megfigyelése

Anyagok, eszközök

Használati eszközök, anyagok

Médium: Tárolása 4°C-on történik. Ha többféle sejthez ugyan azt a típusú tápfolyadékot használjuk, a keresztfertőzések elkerülése miatt szét kell osztani.

- Tartalmazza a sejtek számára szükséges tápanyagokat, növekedési faktorokat
- Összetétele, fajtája a sejtípusokra specifikus:
 - klasszikus tápfolyadék pl.: RPMI 1640, DMEM
 - speciális tápfolyadék pl.: CHO Media

A tápfolyadék általános összetevői

- Sóoldat: anorganikus sók ionjai (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-)
- Glükóz: energiaforrás a sejtek számára (anyagcseréhez lipid, fehérészintézishez)
- Vitaminok
- Esszenciális aminosavak: ezeket a gerincesek nem tudják előállítani pl.: lizin
- Pufferrendszer: a pH fenntartásához szükséges (HEPES vagy CO_2 /bikarbonát puffer)
- Indikátor: Fenol-vörös: jelzi a pH-változását (a sejtek anyagcseretermékeinek hatására savas irányba tolódik a pH)

A komplett média tartalmaz még utólag hozzáadott:

- Szérum: A sejtek proliferációjához szükséges anyagokat pl.: inzulin, tartalmazó foetális –pl.: FCS, FBS –, vagy felnőtt szérummal egészítik ki a médiumot 5-20%-kal.
- Antibiotikum, antimicotikum: opcionális, a steril munkavégzési szabályok betartásával nélkülözhető. Tárolás: -20°C

Szérum: Tárolás: -20°C Az egyik legfontosabb tápfolyadék- kiegészítőnek tekinthető. A legtöbb sejt számára megfelelő a felnőtt ló,- és marha szérum, de vannak sejtek melyek

számára foetális borjú szérum szükséges. Bizonyos érzékeny humán sejtekhez emberi vészérum szükséges. A szérum lenne az ideális tápközeg, de 5-10%-ban is elegendő a tápfolyadékhoz adni, csak a nagyon érzékeny sejtek számára szükséges 20%-os szérumtartalom.

A Médium színének megváltozása a pH változás miatt

- ⊙ Sárga: savas (A sejtek táplálkozása során savas anyagcseretermékek keletkeznek)
- ⊙ Piros: semleges
- ⊙ Lila: lúgos

Fiziológiás (élettani) sóoldatok

A sejtekkel történő munkavégzés során vannak olyan lépések melyeknél nem jó, ha a sejteket a médiumban tartjuk. Ilyenkor szükséges egy olyan közeg mely fiziológiás a sejtekre nézve. A legegyszerűbb ilyen oldat a fiziológiás nátrium-klorid oldat (0,9 m/m %). Viszont a fiz sőt ritkán használjuk, mivel rövid túlélést biztosít a sejtek számára, leginkább oldószere a használt vegyületeknek (pl.: toxinok)

Általában ún. balanced salt solution-okat BSS használunk. Ezek az oldatok összetételükben fiziológiásak a sejtekre nézve a pH értékük és az ozmotikus nyomásuk is fiziológiás.

Általában vízben oldott kálium, kalcium, nátrium, magnézium és klorid ionokat tartalmaznak. (egyes BSS oldatok még glükózt és/vagy fenol-vöröst tartalmazhatnak)

A BSS-ek voltak a szintetikus médiumok alapjául szolgáló oldatok, ezekből fejlesztették ki őket.

Az egyik legáltalánosabban, és leggyakrabban használt sóoldat a PBS (phosphate buffered saline)

Összetétele:

| Só | Koncentráció (g/l) |
|---|--------------------|
| NaCl | 8,01 |
| KCl | 0,20 |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 1,78 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,27 |
| pH | 7,4 |

A Dulbecco féle változat (DPBS); Ca, és Mg ionokat is tartalmaz. (A recept szerinti változat a Ca, Mg mentes, így kell feltüntetnünk az üvegén, mivel ha a Dulbecco féle PBS oldatot használjuk pl.: tripszinezésnél az enzim kevésbé fog hatni. A Ca és Mg ionok jelenlétében a sejtek letapadása erőteljesebb)

Emlős sejtek esetében használt további sóoldatok:

Earle's balanced salt solution EBSS

Hanks' balanced salt solution HBSS.

Egyéb gyakran használt vegyületek a sejtenyésztő laboratóriumban:

Trypsin: 0,25%-os oldatát (Ca^{2+} és Mg^{2+} ion mentes (PBS) sóoldatban, vagy annak glükózt tartalmazó változatában) az adherens sejtek felszedésére használjuk a flaska belső aljzatáról. Hatására a kihorgonyzó fehérjeszálak leemésződnek. Hatóideje függ a sejtek fajtájától, koncentrációjuktól (konfluencia) maximum 10 perc 37 C° -on. Ha saját magunk készítjük fertőzési forrás lehet ezért steril körülmények között kell elkészíteni és/vagy sterilizálni kell pl.: sterilre kell szűrni $0,22\mu\text{m}$ átmérőjű szűrő használatával. Ha az oldathoz EDTA-t (etiléndiamid-teraeetsav) használunk nem szükséges a sterilre szűrés.(Trypsin+EDTA)

EDTA: kelátképző a két és háromértékű fémionokkal komplexet alkot, így a Ca^{2+} ionokkal is. ezeket megkötve gyengíti a kihorgonyzó fehérjék tapadását. 0,02%-os PBS oldatát használják

DMSO: (dimetil-szulfoxid): A sejtek fagyasztása során használjuk. A krioprotektív tulajdonságai miatt a fagyasztóoldatok fő alkotója. a fagyasztóoldat általában FBS és DMSO 9:1 arányú oldata. A DMSO gátolja a sejten belüli jégkristályok képződését. Nem szükséges sterilizálni. Krioprotektív anyag a glicerin is ezt sterilizálni kell.

A sejtenyésztő flaska

Az első sejtenyészeteket szérummal, azaz vérsavóval bevont PYREX üvegedények üveg Petri-csészék alján és ún. függő csepp kultúrákban tartották fenn.

A legtöbb sejt (főleg a primer sejtek) azonban nehezen és kevésbé tapadnak le az üveg felületekre. A bevonattal (először kollagén bevonat) rendelkező üveg edényeket nagyon körültekintően kell kezelni a bevonat sérülékenysége és az újra használhatóság (speciális mosogatási módszerek hogy újra bevonatolni lehessen) miatt. Ezen okokból terjedtek el az egyszer használatos műanyag flaskák, melyeket lehet bevonattal vagy bevonat nélkül kapni.

A műanyag (polisztirol) flaskák belső felszínét normál légnyomáson koronakisüléssel (hideg plazma), vagy vákuum alatt gáz-plazmával kezelik. Mindkét eljárás során nagy energiájú oxigénionok keletkeznek, amik a polisztirolláncokba beépülve (oxidálás) azokat hidrofíllé és negatív töltésűvé teszik így biztosítva a sejtek könnyebb letapadását.

- Anyaguk általában műanyag
- Sterilek besugárzással, UV, vagy Y sugárral sterilizálják
- Rendkívül sokfélék (méret, térfogat, tenyésztő felület, nyak állása, kupak, stb.)

- A sejtek típusa és a kísérlet határozza meg, hogy melyiket használjuk
- Leggyakrabban használt típusok:
 - T - 25 flaska
 - T - 75 flaska
 - a T a hasznosítható tenyésztőfelületet jelöli

Laminális áramlású steril fülke Carrel!!

- Szűrt levegővel ellátott steril fülke
0,3 µm-es filter biztosítja a munkafelület felett áramló levegő tisztaságát
- Védi a sejteket és a felhasználót a fertőzéstől
- Méret és a levegőáram irányát tekintve különböző típusok kaphatók

Inkubátor

- A sejtek számára szükséges hőmérsékletet és a megfelelő CO₂ szintet biztosítja (emlős sejteknél ez 37 °C és 5% CO₂).
- Állandó parciális nyomású CO₂-ot, megfelelő páratartalmat biztosít.
- A hőmérséklet, és a CO₂ tartalom szabályozása elektromos úton történik.
- Beépített vészjelzővel és digitális kijelzővel rendelkeznek.
- Az 5%-os CO₂ tartalom biztosítja a médium pH-ját.

Mikroszkóp

- Sztereo mikroszkóp: a sejtek tenyésztésben történő megfigyelésére szolgál.
- Fénymikroszkóp: A sejtek viabilitás vizsgálatára (élő-, halott sejtek száma)

Egyéb eszközök:

- pipetták 1, 2, 5, 10 ml-es pipettor
- automata pipetták
- centrifugacsövek 15, 50 ml-es

Az eszközök, oldatok sterilizálása:

Eszközök:

Az egyszer használatos eszközöket semmilyen körülmények között nem használhatjuk többször! Pl.: a sejttenyésztő műanyag edények alján lévő adherens felület károsodása elkerülhetetlen a sterilizálás során, bármennyire óvatosan is végezzük azt.

A műanyag eszközök csomagolásán fel van tüntetve hogy többször használhatók-e.

A többször használatos eszközöknél fontos a kémiai,- fizikai sajátosságok ismerete a megfelelő sterilizálási módszer eldöntéséhez.

A sterilizációs eljárások első lépése a többször használható edények eszközök tisztítása.

A mosogatás során először csapvízzel és pH semleges mosogatószerrel mossuk el az eszközöket. Ezután csapvízzel majd desztillált vízzel is el kell öblíteni azokat. A száradás után a megfelelő sterilizációs eljárással sterilizáljuk a tiszta eszközöket, edényeket.

A sterilizálás történhet fizikai, és kémiai módszerekkel is.

Fizikai módszerek:

- A száraz és nedves hővel (hőlégszterilizáló, ill. autokláv).
 - Ilyenkor nagyon fontos hogy tisztába legyünk a különböző anyagok hőállóságával!
 - Besugárzással: UV-sugárral, Y-sugárral, esetleg röntgen-sugárral (sugársterilizálás)
- A legtöbb esetben a hővel történő sterilizálási módszert alkalmazzuk.

Üveg eszközök:

Az üveg pipettákat száradás után fém tartókba tesszük.

A fémtárolók aljára célszerű valamilyen sterilizálható és hőálló betétet rakni (pl.: szilikon lap) azért hogy elkerüljük a pipetták hegyének esetleges törését/lepercenését.

A főzőpoharakat és egyéb üvegeszközöket alufóliába csomagolva tesszük a hőlégszterilizátorba.

Fém eszközök:

Alufóliába csomagolva, vagy speciális fém tárolóban (sterilizáló tálca a műtéti eszközöknek)

A hőlégszterilizátorban 160 °C-on 120 percig sterilizálunk

A műanyag eszközöket mosogatás után alufóliába csomagoljuk és kuktában sterilizáljuk.

A kuktázás menete: a kuktát jelig töltjük, desztillált vízzel majd beletesszük a műanyag eszközöket. 10 perc, míg a kukta felmelegedik, 15 percig sterilizáljuk őket majd újabb 10 perc, míg lehűl a kukta.

Oldatok sterilizálása:

Általában hővel vagy szűréssel történik.

A szerves oldatok esetében megfelelő a hővel történő sterilizálás, viszont a szerves anyagokat (fehérjék) tartalmazó oldatoknál nem minden esetben megfelelő ez a módszer.

Ma már kaphatók olyan tápfolyadékok melyek kibírják a hőkezelést – vagy a hőre érzékeny komponenseket a hőkezelés után kell hozzáadnunk.

A legelterjedtebb, és legegyszerűbb sterilizációs módszer azonban még mindig a sterilizáció. Ez 0,22 µm pórusú membránszűrőn keresztül történő szűrést jelent. A szűrés történhet nyomószűrővel, ill. vákuumszűrővel ez esetben egyszer használatos, saját felfogó edénnyel rendelkező vagy a felfogó edényre csavarható műanyag szűrővel történik.

Kis mennyiségű folyadék esetén fecskendőszűrőt célszerű használni.

Ügyelni kell arra, hogy a szűrő membránjának átnedvesítéséhez a folyadék egy része (a szűrő membrán felületétől függ a mennyiség) elhasználandó.

A sterilizáció során a vírusok prionok és a mycoplasma nem távolítható el.

A steril munkavégzés szabályai

- A munkafolyamatot játsszuk le a fejünkben!
- Viseljünk erre a célra rendszeresített köpenyt!
- A munka megkezdése előtt és után mindig alaposan mossunk kezet!
- Gumikesztyű használata kötelező!
- Használat előtt és után, illetve különböző fajtájú sejtek kezelése között a munkafelületet mossuk le 70% - os alkohollal! (belülről kifelé)
- Az oldatokat tartalmazó edényeket, eszközöket és mindent, amit a steril fülkébe teszünk, mossuk le 70% - os alkohollal!
- Használat előtt ellenőrizzük a steril eszközök csomagolásának épségét!
- Nyitott edény felett ne nyúljunk át!
- Az edények szája, illetve az alkalmazott eszközök (pl. pipetta) ne érjenek hozzá semmihez!

Primer sejt kultúrák indítása

Protokoll:

- Az izolálendő sejteket tartalmazó szövetet steril körülmények között eltávolítjuk, és aprítjuk
- A szövetfajtától függően különböző enzimeket használva kinyerjük a sejteket
- A megmaradt szövetrészeket steril gézen átszűrve távolítjuk el
- A sejteket lecentrifugáljuk, életképességet nézünk.
- Tenyésztőedénybe helyezük őket, médiumot adunk hozzájuk.

Primer kultúrák

Fibroblaszt sejtek

- ⊙ A sejteket az egér bőréből (fül, lábak farok) izoláljuk.
- ⊙ Ezek a sejtek korlátozott osztódást érnek meg, normál szöveti sejtek.
 - ⊙ A többi szöveti sejthez képest a fibroblaszt sejteknek igen nagy proliferációs képessége van. (elfibroblasztosodás)

A sejtvonalak használata

A sejtek felvétele fagyasztásból

- A fagyasztócsőben lévő, már kiolvadt sejteket 1ml médiummal centrifugacsőben felfuszpendáljuk, majd lecentrifugáljuk (5 min 500 G/1000 rpm= fordulat).
- A felülúszó leöntése után 1 ml tápfolyadékkal felfuszpendáljuk
- A felfuszpendált sejteket steril T-25-ös flaskába pipetázzuk és médiumot (4 ml) adunk hozzájuk

A letapadó (adherens) sejtek passzálása

- A letapadt sejteket PBS-sel átmoszuk, majd tripszint adunk hozzá.
- Ezután 10 percig inkubáljuk.
- A tripszint médiummal leállítjuk
- A felvált sejteket tartalmazó médiumot lecentrifugáljuk,
- A felülúszót leöntjük, a sejteket felfuszpendáljuk, leszámoljuk, és szétosztjuk (új flaskákba vagy fagyasztjuk őket)

Fagyasztás:

- A sejteket a tápfolyadék eltávolítása után PBS-sel mossuk (1 ml)
- Tripszint adunk hozzá (1ml), és inkubáljuk
- A felvált sejteket centrifugacsőbe pipetázzuk, a tripszint médiummal leállítjuk,
- Lecentrifugáljuk a szuszpenziót
- Fagyasztóoldattal szuszpendáljuk a sejteket és fagyasztócsőben fagyasztjuk

A szuszpenziós tenyészetben lévő sejtek passzálása

- Akkor szükséges, ha tenyészet mikroszkóp alatti vizsgálata során, ha a sejtek már kisebb mértékben összetapadtak
- A tenyészetben lévő sejteket leszámoljuk
- A sejtszám és térfogat függvényében a sejteket új flaskákba pipetázzuk, majd médiummal 5 ml-re kiegészítjük a végtérfogatot.

A Long-Term Scan rendszer

- Sejttenyésztő inkubátorban elhelyezett, 2 darab általunk kifejlesztett inverz mikroszkóp, célszerűen módosított 720x576 pixel felbontású CCD kamerával felszerelve.
- Minimalizált fototoxicitást biztosító felvétel szinkronizált megvilágító rendszerrel.
- Távoli felügyelet internetes kapcsolattal.

ImageJ

Java alapú képfeldolgozó program, melyet a National Institutes of Health (NIH) fejlesztett ki.

A programot a <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html> oldalról ingyenesen le lehet tölteni.

Sok képformátumot tud kezelni pl.: TIFF, GIF, JPEG, BMP.

Nyílt forráskódú, melyet ki lehet egészíteni számos beépülő modullal: macro, script, plugin.

Kvantitatív képanalízis - sejtszámolás

A kép(ek) feldolgozása ImageJ programmal.

Sejtek számában bekövetkező változások mérése.

A kapott eredmények grafikus kiértékelése.

Meghatározza a következő lépést a kísérletben.

A számolás menete:

1.) ImageJ program elindítása

2.) képsorozat betöltése: File=> Import=> Image Sequence... paranccsal

3.) fény és kontraszt beállítása a menü Image=> Adjust=> Brightness/Contrast... segítségével

4.) következő lépésben a képek elő-ill. háttérének elválasztása a Threshold funkcióval

A leggyakrabban alkalmazott image processing eljárások közé tartoznak a thresholding (küszöbölés) és a szegmentáció. A lényegük: bizonyos szempontok alapján területekre osztjuk a képet

5.) ezután a sejtek megszámlálása történik az Analyze=> Analyze particles... paranccsal

6.) a kapott eredmények átvitele az Excel programba, és grafikonon ábrázolás

Generációs idő meghatározása

Az ImageJ programban lehetőség van a generációs idő kiszámítására, mely egy sejtől történő sikeres osztódást követően keletkezett 2 utódsejt újbóli osztódása között eltelt időt jelenti.

Ez az adat alapvető fontosságú lehet vizsgálataink során.

A vizsgálni kívánt képekből előállítunk egy Stack-et, melyből kivágjuk azt az osztódó sejtet, melyre kíváncsiak vagyunk az Image=> Crop paranccsal.

Az ezt követően kapott új Stackből a Plugins=> 3D=> ImageJ 3D Viewer opcióval készíthetünk egy voxeltömböt. Miután betöltött az ablak az Edit=> Display as=> Orthoslice menüpontnál beállíthatjuk, hogy a síkok vetületeit mutassa, így jól látható a sejt osztódásának helye, a sejt mozgásának iránya és a következő osztódás is.

A Z tengely hosszúsága megegyezik a képek számával, így az első osztódás végétől a következő osztódás végéig tartó szakasz hosszúsága meghatározható. Mivel azonos időközönként készültek a képek, a mért hosszúság átváltható percbe, illetve órába.

A sejtszámolás napi rutin a sejtekkel.

- Gyakori hibák, tippek trükkök
- Fertőzések
- A sejt kultúrák növekedési fázisai, Sejtszámolás

Gyakori hibák

A steril körülmények be nem tartása fertőzést okoz

A sejtek viabilitás (azaz életképesség) - vizsgálatánál ügyeljünk rá, hogy a tripan-kék elpusztítja az élő sejteket is → nem lesz valid a kapott eredmény, törekedni kell a gyors és pontos számolásra.

Adherens sejteknél, ha nem megfelelően szuszpendáljuk a sejteket hosszabb a letapadási idő, ill. nagyobb a sejtpusztulás.

A fertőzés jelei

Bakteriális

Fungális: Fonals gombák, élesztők, mycoplasma

A sejtek növekedési fázisai:

- Lag Fázis: Általában 1-2 nap kismértékű a sejtszámnövekedés. A sejtek alkalmazkodnak az új körülményekhez (sejten belül zajló folyamatok).
- Log fázis: Exponenciális mértékű sejtszámnövekedés, a tápanyag függvényében.
- Plateau fázis: Egyensúlyi állapot jön létre közel annyi sejt keletkezik, mint amennyi elpusztul.

Élő- és összsejtszám változása a tenyészetben

Sejtszámolás

A jegyzőkönyv készítéséhez szükséges

A sejtszám változása:

- meghatározza a következő lépést
- információt nyújt a tenyészet állapotáról
- megmutatja, hogy milyen fázisban van a tenyészet

Sejtszámolási módszerek

Közvetett: a vizsgált tenyészetek azon sejtjeinek (egységeinek) számát adja meg, amelyek különálló telepeket képesek létrehozni

Közvetlen: mikroszkóppal, pl.: Bürker-kamrával

Tripán-kék ($C_{34}H_{23}N_6O_{14}S_4Na_4$)

A neve onnét származik, hogy elpusztítja a tripanoszóma kórokozóját miközben kék színűre is festi azt. Csak az elpusztult sejtek membránján képes áthatolni, és ott a citoplazma fehérjékhez kötődik. Az élő sejtek membránja nem ereszt át a festéket.

Emberre nézve gyanúsítható, állatkísérletekben bizonyítottan rákkeltő hatású

Bürker kamrás sejtszámolás:

- Nagyobb méretű sejteknél közvetlen sejtszámolás valósítható meg Bürker-kamrával
- A módszer az összsejtszám megállapítására ad lehetőséget.
- Gyakran alkalmazott, gyors és egyszerű sejtszámlálási módszer.

A sejtszámolás menete

- Mintát veszünk a sejt kultúrából és eppendorf csőbe pipettázzuk
- A Bürker-kamrát és a fedőlemezt detergenssel zsírtalanítjuk,
- Rászorítjuk a kamrára a fedőlemezt
- A sejtuszpenzióhoz (0,1 ml) hozzáadunk 0,1 ml tripánkék-oldatot, majd szuszpendáljuk, a fedőlemez alá pipettázzuk
- 16x-os vagy 40x-es nagyítású objektívet használva megszámláljuk a sejteket
- 25 egységet leszámolunk, majd kiszámítjuk az 1ml-re eső sejtszámot a következő módon:

kapott sejtszám x hígítás x 10^4 /ml

(élő, vagy holt sejtek)

- 10 μ l sejthez, ha 10 μ l tripán-kék oldatot adtunk, az 2x-es hígítás
- Példa: a 25 négyzetben összesen 50 db sejtet számolva

$$50 \times 2 \times 10^4 / \text{ml}$$

$$100 \times 10^4 / \text{ml}$$

$$1 \times 10^6 / \text{ml}$$

Ajánlott irodalom, és források:

- 1) Sejtbiológia, Medicina, szerk.: Szabó Gábor
- 2) Sejttenyésztés: Alapvetés és néhány elméleti kérdés öt, –itt egyetlen prezentációban összefoglalt – előadásban Dr. Schlammadinger József ny. egyet. Docens DE OEC ÁOK Humán-genetikai Tanszék 2007
- 3) Nagy G, Turani M, Kovacs K E, Banfalvi G. Chromatin changes upon silver nitrate treatment in human keratinocyte HaCaT and K562 erythroleukemia cells. In: Cellular effects of heavy metals. G. Banfalvi ed. Springer, Dordrecht 2011
- 4) <http://www.chemotaxis.usn.hu>
- 5) <http://micro.magnet.fsu.edu>
- 6) <http://ccaoscience.wordpress.com/>
- 7) <http://www.corning.com/index.aspx>
- 8) <http://www.invitrogen.com>
- 9) <http://web.engr.oregonstate.edu>
- 10) http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/11_04.html
- 11) Embrionális őssejtek és őssejt-vonalak Gócza Elen PhD, Magyar tudomány, 2004/3 285. o.
- 12) Onkopatológia Jakab Csaba 2010
- 13) <http://www.biolcell.org/boc/084/0187/boc0840187.pdf>
- 14) Szeberény J: Molekuláris sejtbiológia
- 15) <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
- 16) Turáni M; Balogh E; Király G; Kiterjesztett time-lapse imaging rendszer a citotoxikológiában.
- 17) <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/index.html>
- 18) <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/>
- 19) <http://www.info-media.hu/hirek/munkavedelem/a+biologiai+tenyezok+hatasanak+kitett+munkavallalok+egeszsegenek+vedelme/63811>
- 20) <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/safety-aspects-of.htm>
- 21) http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_3D_hu_book/ch01s05.html