

SEJTKULTÚRÁK ÉS SEJTTANI PREPARATÍV TECHNIKÁK

Turáni Melinda
PhD hallgató DEOEC-KODI

1. előadás vázlat

Állati sejtek

1. „omnis cellula e cellula” új sejtek csak már meglévő sejtekből keletkezhetnek (*Rudolf Virchow 1855*)
2. Az eukarióta sejtekben membránnal határolt sejtorganellumok találhatók.
3. A sejszervecskék a sejtplazmában helyezkednek el.
4. A különböző szöveteket az adott funkció elvégzésére specializálódott sejtek építik fel.
5. Sejtorganellumok
6. Membránokkal határolt sejszervecskék amelyek meghatározott funkciókat töltenek be a sejtben.
 - ▶ Sejtmag
 - ▶ Endoplazmatikus retikulum DER, SER
 - ▶ Golgi apparátus
 - ▶ Lizoszóma
 - ▶ Peroxiszóma
 - ▶ Mitokondrium
 - ▶ Citoszkeleton

A sejtciklus, és sejtosztódás

- ▶ G1 fázis: Az mRNS-ek, tRNS-ek, a DNS megkettőződéséhez szükséges fehérjék, 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 sejtciklusból: G0 fázis

- A sejtciklus szabályozó molekulái:
 - ▶ A legfontosabb szabályozómolekulák a G1 és mitózisos ciklinek, és a ciklinekkel komplexet alkotó ciklin dependens kinázok.
 - ▶ A sejtciklus vizsgálatához a sejtek tenyészetben történő fenntartása jó lehetőséget biztosít. Az osztódó sejt populációkban 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 nukleoszómák (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 később replikálódó, kifejeződésre nem kerülő forma. (a magban perifériális elhelyezkedésű G- és Q-sávozottságot mutató rész)

A sejtenyésztés...Mi is ez?

- ▶ 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.

A sejtenyésztés története –Hogyan jutottunk el a modern sejtenyésztésig?

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 = BSS (balanced salt solution) a Ringer oldat laktáttal kiegészített változatát napjainkban is használják intravénás folyadékként, ezt az oldatot Maurice V. Tyrode (1878-1930) amerikai fiziológus fejlesztette ki vese izolátumokhoz.

Renato Dulbecco

Olasz származású amerikai virológus aki a reverz transzkriptáz felfedezéséért társaival Howard Temin-nel David Baltimore-val 1975-ben orvosi Nobel díjat kapott. Emellett kifejlesztette a leggyakrabban használt sóoldatot a PBS-t

John H. Hanks (1906-1990)

Népszerű sóoldat kapcsolódik a nevéhez HBSS. Amerikai mikrobiológus a *Lepra in vivo* tenyésztéséhez fejlesztette ki ezt a sóoldatot, de nem ért el sikert vele.

Wilhelm Roux - a Roux flaska

próbálkozás a tenyésztőedény elszigetelésére - vattadugó

Ross.Granville Harrison

Sikeresen tenyésztett idegsejteket ebihalakból béka nyirok folyadékban és ezzel megtette az első lépést az őssejtkutatások irányába, illetve létrehozta az első tápfolyadékot. 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" -ami plazma alvadékos szérumot sóoldatot és csirke embrió kivonatot tartalmazott, és ez az 1950-évekig a standard volt - 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 – D palack

1923-ban ő fejlesztette ki az első sejttenyésztő 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.

Wilton R. Earle

Az első rágcsáló sejtvonal (L929) létrehozása egyetlen sejtből 1943-ban.

George O. Gey

1951 HeLa-sejtvonal létrehozása, az első hmán folytonos sejtvonal Henrietta Lacks méhnyakrák sejtjeiből.

Charles A. Lindbergh:

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

Lindbergh kifejlesztett egy egyszerű, sejtkultúra perfúziós kamrát is.

Van Wezel: a mikrokarrieres sejttenyésztés 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 expresszáltatni állati sejtbe.

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

Fontos eredmények (a modern sejttenyésztés alapjai):

- ▶ Antibiotikumok alkalmazása a fertőzések ellen.
- ▶ Tripszin használata az adherens sejteknél, így azok továbbtenyészthetők.
- ▶ Kémiaiilag meghatározott szintetikus tápoldatok használata.

Használt(táp)közegek - kialakulásuk

-különbéféle 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 34 évig sikerült folyamatosan in vitro fenntartani, mikoris lezárták a kísérletet. Ezt az eredményt sokan vitatják.)
- ▶ 1940/ Szintetikus tápközegek (medium) kifejlesztésének korszaka.
- ▶ 1952. Moscona. Szövetek trypsin emésztése
 - ▶ **modern sejttenyésztés kezdete.**

Milyen tápközegeket használunk ?

Korai 50-es évek az első szintetikus médiumok megjelenése (alapvető sókeverék, cukrok, vitaminok, aminosavak és supplementek pl. szérum vagy plazma, növekedési faktorok IGF hormonok albumin transferrin)

- ▶ Harry Eagle:

Pontosabban definiálta a sejteknek szükséges tápanyagokat: Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) és ennek módosított változata DMEM.

- ▶ Richard G. Ham

A szérum összetételének variabilitásából adódó hibák kiküszöbölésére az első szintetikus médium az F12 (1965)

- ▶ Gordon H. Sato és David Barnes

Szérummentes médium mely többféle sejtnél használható, ill. rámutattak hogy a különböző sejtféleségek különböző hormonokat, növekedési faktorokat igényelnek. Univerzális növekedési faktor: inzulin.

A sejtenyésztés gyakorlati előnyei

- ▶ A sejt saját tulajdonságai szabadon vizsgálhatók, mivel a más sejttípusokkal való kölcsönhatások nem érvényesülnek.
- ▶ Lehetőség van a sejtek vizsgálatára ún. kokultúrában is (két különböző sejtféleség együttes tenyésztése).
- ▶ Kevesebb kísérleti állatra van szükség pl.:farmakológiai vizsgálatoknál
- ▶ Egyszerű kivitelezés, gyors eredmény.
- ▶ Sokféle vizsgálat: toxikológiai farmakológiai tumorok vizsgálata, őssejt differenciálódási stb.

Szerv és szövettenyésztés

- ▶ A szövettenyésztés a sejtek szövetként való tenyésztése, szövetdarabok fenntartása.
- ▶ „tissue engineering”
 - ▶ Gyakorlatilag a különböző szövetek regenerációjával foglalkozó biológiai és mérnöki tudomány. 3D-s sejt szövettenyésztés kivitelezése és eszközeinek fejlesztése.
 - ▶ Miért? Hosszú transzplantációs várólisták, a kilökődés problémája.

Cél: a szervezet számára sajátként felismert és funkcionáló szervek és szövetek létrehozása

▶ Hogyan?

- ▶ Scaffold (= állványzat) egy speciális váz a sejtek számára 3D-s szövettenyésztéshez
- ▶ Az adott élőlényből származó sejtek tenyésztéséből és szöveté szervezéséből

Scaffolddal szembeni követelmények:

- ▶ Természetes v. szintetikus polimerek pl.: proteinek poliszacharidok
- ▶ Nem válthat ki immunreakciót
- ▶ Az ECM és a sejtek könnyen kapcsolódhassanak egyenletesen oszoljanak el a scaffold felületén (migráció)
- ▶ Biztosítsa a megfelelő tápanyagellátást (pólusok)
- ▶ Biodegradálhatóság

Sejtek a 3D-s szövettenyésztésben: több sejttípus különböző differenciáltsággal

Mert a szövetek több sejttípus szerveződése melyeknek mindegyike feltétlenül szükséges az adott szerv/szövet működéséhez.

- ▶ Érett, differenciálódott sejtek
- ▶ Progenitor sejtek, köztes alakok
- ▶ Óssejtek: Felőtt őssejt Adult Stem Cell pl.:
 - ▶ csontvelői őssejtek,
 - ▶ MSC ~mezenhimális őssejt (Zsírszövetben is)
 - ▶ HSC ~hematopoetikus őssejt

- ▶ ESC ~endoteliális őssejt
- ▶ de minden szervben vannak
- ▶ Embrionális őssejtek Embriional Stem Cell

Bioreaktorok

- ▶ A 3D-s szövettenyésztés során fontos :
 - ▶ A) a megfelelő áramlás kivitelezése, ha ez nem megfelelő: apoptózis, nekrosis
 - ▶ B) a nagy mennyiségű sejt/ szövet létrehozása
- ▶ A megoldás: kevertetett tenyészetek, bioreaktorok

Szövetnyomtatás: bioprinting

- ▶ A tintasugaras nyomtató elvén működik. Lényege hogy az egyik injektorban sejtuszpenziót , 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. Erek létrehozására.
- ▶ Drága megoldás -> morális problémák
- ▶ Komplexebb szervek előállítása jelentős nehézségekbe ütközik: az egymás mellé nyomtatott sejteknek szövetként kell viselkedniük -> komplex probléma
- ▶ A feltaláló: Forgách Gábor Missouri Egyetem

Felhasznált irodalom

- ▶ Sejtbiológia, Medicina, szerk.: Szabó Gábor
- ▶ 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
- ▶ <http://www.chemotaxis.usn.hu>
- ▶ <http://micro.magnet.fsu.edu>
- ▶ <http://ccaoscience.wordpress.com/>
- ▶ <http://www.corning.com/index.aspx>
- ▶ Sejttenyésztés Dr. Schlammadinger József DE OEC ÁOK Humán-genetikai Tanszék
- ▶ <http://www.invitrogen.com>
- ▶ <http://web.engr.oregonstate.edu>
- ▶ http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/11_04.html
- ▶ Embrionális őssejtek és őssejt-vonalak *Gócza Elen PhD, Magyar tudomány, 2004/3* 285. o.
- ▶ Onkopatológia *Jakab Csaba 2010*
- ▶ <http://www.biolcell.org/boc/084/0187/boc0840187.pdf>
- ▶ Turáni M; Balogh E; Király G; Kiterjesztett time-lapse imaging rendszer a citotoxikológiában.
- ▶ <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/index.html>

Az érdeklődőknek ajánljuk az <http://etox.eu/index.php/hu/sejtkulturak> oldalon megosztott videóknak megnézését.