

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE  
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA  
V MARTINE**

**Úvod do bunkových kultúr a bunkového  
inžinierstva**

Ján Strnádel



**Martin, 2023**

## Úvod do bunkových kultúr a bunkového inžinierstva

**Autor:** Ing.Ján Strnádel, PhD., Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Laboratórium prietokovej cytometrie, fenotypizácie buniek a tkanivového inžinierstva

### Recenzenti:

**Prof. MVDr. Dáša Čížková, DrSc.**

*Centrum experimentálnej a klinickej regeneračnej medicíny, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach*

**Doc. Mgr. Tatiana Burjanivová, PhD.**

*Ústav molekulovej biológie Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine*

**Doc. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.**

*Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave*

**Vydanie:** prvé

**Počet strán:** 131

Text neprešiel jazykovou korektúrou, za odbornú a jazykovú stránku diela zodpovedá autor

**Zverejnené na:** <http://portal.jfmed.uniba.sk>

**ISBN 978-80-8187-127-6**

**EAN 9788081871276**



# Obsah

Podakovanie	5
Predslov	6
1 Úvod do bunkových kultúr a bunkového inžinierstva	8
1.1 História <i>in vitro</i> kultivácie buniek	8
1.2 Definícia bunkovej línie	8
1.3 Význam bunkových línií v biomedicínskom výskume	9
1.4 Význam bunkových línií v onkologickom výskume	9
1.5 Význam bunkových línií v oblasti regeneratívnej medicíny	10
2 <i>In vitro</i> izolácia a charakterizácia buniek	12
2.1 Izolácia primárnych bunkových kultúr z tkaniva	12
2.2 Izolácia primárnych buniek pomocou explantátovej kultúry	14
2.3 Alternatívne zdroje buniek na prípravu iPS buniek	15
2.4 Derivovanie bunkovej línie klonovaním buniek ( <i>cell cloning</i> )	16
2.5 Zloženie kompletného bunkového média na kultiváciu buniek	17
2.6 Kultivačné platničky	20
2.7 Kultivácia a expanzia primárnych buniek	21
2.8 Pasážovanie primárnej bunkovej kultúry	22
2.9 Pasážovanie 3D kultúry	23
2.10 Určenie počtu a koncentrácie buniek v suspenzii	24
2.11 Určenie času zdvojenia ( <i>doubling time</i> ) v bunkových kultúrach	26
2.12 Stanovenie dynamiky rastu buniek v 3D kultúre	26
3 Mrazenie (kryoprezervácia) buniek	27
4 Kontaminácia v bunkovom laboratóriu a jej riešenie	30
4.1 Kontaminácia bunkových kultúr inými typmi buniek	34
5 Manipulácia hladiny génovej expresie v bunkách	36
5.1 Transdukcia génov do bunky pomocou virálnych vektorov	37
5.2 Transfekcia génov do bunky	41
6 Použitie chemických inhibítorov pri inaktivácii proteínov	42
7 Sterilizácia	42
7.1 Sterilizácia roztokov a pracovných pomôcok	42
7.2 Sterilizácia roztokov biologicky aktívnych látok	43
8 Alikvotovanie roztokov protilátok a citlivých rastových faktorov	44
9 Metódy <i>in vitro</i> charakterizácie buniek	45
9.1 Karyotypová analýza buniek (určenie karyotypu)	45
9.2 Imunofluorescenčná analýza expresie proteínov	46
9.3 Imunocytochémia	46
9.4 Použitie programu <i>ImageJ</i> pri spracovaní výsledkov	49
9.4.1 Príprava kompozitových obrázkov v publikačnej kvalite	50

9.5	Prietoková cytometria povrchových antigénov (CD znakov)	51
9.6	Prietoková cytometria intracelulárnych antigénov	54
9.7	Detekcia programovanej smrti (apoptózy)	55
9.8	Multiplexová analýza protilátkovými čipmi	56
9.9	ELISA	57
9.10	Western blotová analýza expresie proteínov	59
9.11	Príprava lyzátu z buniek	60
9.12	Príprava vzoriek na Western blot	61
9.13	Detekcia chemiluminiscenčného signálu	62
10	Denzitometrická analýza	63
11	<i>In vivo</i> charakterizácia buniek	65
11.1	Experimenty s použitím laboratórnych zvierat	65
11.2	Transplantácia buniek do imunodeficientných myší	66
11.3	Testovanie metastatickej schopnosti buniek v embryách	68
11.4	Tropická ryбка ako transplantačný model	70
11.5	Eutanázia laboratórnych zvierat	71
12	Modelovanie Huntingtonovej choroby pomocou iPSc technológie	71
13	Etické a právne súčasti práce s bunkovými kultúrami	78
13.1	Informovaný súhlas pacienta s experimentálnou štúdiou	78
13.2	Etické problémy v regeneratívnej medicíne	79
14	Štruktúra a vybavenie bunkového laboratória	82
15	Bezpečnosť pri práci v laboratóriu bunkových kultúr	84
15.1	Stupne biologickej bezpečnosti v bunkovom laboratóriu	87
16	Záver	88
17	Zoznam použitej literatúry	89
18	Obrazová príloha	92

## **Pod'akovanie**

Ďakujem celej svojej rodine za trpezlivosť a kolegom z Jesseniovej lekárskej fakulty za podporu pri písaní tohto diela. Moja vďaka patrí aj prof. MUDr.Martinovi Maršalovi, PhD., MVDr.Silvii Maršalovej, PhD., z Kalifornskej Univerzity v San Diegu, USA a RNDr. Vratislavovi Horákovi, PhD. z Ústavu živočíšné fyziologie a genetiky, AV ČR, v Liběchově, ČR a prof. RNDr.Erike Halašovej, PhD. za všetku ich pomoc. Ďakujem aj Agentúre na podporu výskumu a vývoja (projekt č.: APVV-17-0037), bez podpory ktorej by realizácia viacerých experimentov, uvedených v tejto práci nebola možná.

## Predslov

Pri riešení diplomových a dizertačných prác na lekárskech a prírodovedeckých fakultách sa študenti často stretávajú s problematikou *in vitro* modelovania ochorenia pomocou bunkových kultúr alebo bunkových línií. Aj v prípadoch, keď je vhodná bunková línia dostupná komerčne, je potrebné mať aspoň základné vedomosti o kultivácii, pasážovaní, kryoprezervácii a charakterizácii buniek. V prípade, keď vhodný bunkový model nie je dostupný, je eventuálne možná jeho príprava technikami bunkového inžinierstva. Prakticky každé ochorenie je dnes možné modelovať v *in vitro* podmienkach metódami bunkového inžinierstva. Bunkové inžinierstvo preto predstavuje veľmi progresívnu časť vedy a výskumu s nesmiernym potenciálom využitia v oblasti regeneratívnej medicíny a *in vitro* modelovania chorôb. Vývoj a optimalizácia nových aplikovateľných metodík pre *in vitro* modelovanie alebo *in vitro* prípravu terapeuticky použiteľných buniek je preto veľmi významnou súčasťou biomedicínskeho výskumu. Okrem toho, priam ohromujúce možnosti, ktoré v sebe ukrýva nedávny objav indukovanej pluripotencie je možné naplno rozvíjať len po predchádzajúcej edukácii študentov lekárskech, technických a prírodovedeckých odborov. Pravdepodobne sú to práve študenti všeobecného lekárstva, ktorí budú mať v budúcnosti možnosť (ako pracovníci prvej línie v liečbe pacientov) ponúkať a v spolupráci s vedeckými pracovníkmi vhodne modifikovať terapie, založené na použití indukovaných pluripotentných kmeňových buniek.

V rámci riešenia projektov diplomových a dizertačných prác sa študenti pracujúci s bunkovými kultúrami nevyhnutne dostávajú do kontaktu aj s množstvom experimentálnych protokolov, ktoré slúžia na charakterizáciu týchto bunkových kultúr. Variácií týchto protokolov je skutočne veľmi veľa. Rozhodnutie, ktorý protokol zvoliť ako optimálny je niekedy ťažké a mnohokrát študent optimalizovaním protokolu na aktuálne podmienky stratí množstvo času. Okrem toho sa často stáva, že protokoly, hoci dobre fungujúce, sú s dôvodu použitia určitých špeciálnych chemikálií spojené s veľkým finančným zaťažením laboratória resp. grantového projektu. Z tohto dôvodu je prirodzená tendencia študentov inklinovať k protokolom, ktoré je možné v dôsledku nižšej finančnej náročnosti (a aj za cenu nižšej kvality výsledkov) častejšie opakovať. Autor predložených skrípt sa na základe niekoľkoročných vedeckých aj pedagogických skúseností v domácich aj zahraničných laboratóriách rozhodol pripraviť výber optimalizovaných protokolov najviac používaných biochemických, molekulárnych

a imunodetekčných techník. Každý protokol je overený niekoľkoročnými skúsenosťami s danou technikou a doplnený o reálne vedecké dáta, z ktorých niektoré už prešli recenzným konaním a boli medzitým publikované vo vedeckých časopisoch.

V rámci skrípt sa autor dotýka aj praktického použitia niektorých *in vivo* techník (laboratórne techniky spojené s využitím laboratórnych zvierat na *in vivo* testovanie bunkových línií). V prostredí súčasnej európskej legislatívy je viditeľný a evidentný trend a snaha o významnú redukciu množstva použitých laboratórnych zvierat. V blízkej budúcnosti je možné očakávať sprísnenie noriem a aj celkových podmienok, ktoré budú kladené na experimentátora v prípade, že sa rozhodne v experimentoch naďalej používať laboratórne zvieratá. Stále však existujú experimenty, v ktorých je humánne použitie experimentálnych zvierat nevyhnutné a nedá sa nahradiť *in vitro* modelovaním. Výber z týchto experimentov je tiež zahrnutý v rámci predloženého diela. Príklady praktického použitia jednotlivých experimentálnych techník sú ilustrované na dvoch reálnych projektových príkladoch. Prvým projektom je projekt prípravy *in vitro* modelov pre neurodegeneratívne ochorenia a druhým príkladom je vývoj a testovanie nových 3D nádorových modelov. Tieto dva projekty boli na ilustráciu jednotlivých protokolov vybrané z dôvodu veľkej komplexnosti, aktuálnosti (relatívne nedávno, v roku 2012 bola za prvú uvedenú technológiu udelená Nobelova cena za medicínu a fyziológiu) a budúceho použitia v regeneratívnej medicíne a onkologickom výskume. Projekt vývoja 3D nádorových modelov bol ako ilustratívny projekt zvolený z viacerých dôvodov. Prvým dôvodom je aktuálnosť (v súčasnej dobe dochádza k celosvetovému posunu v oblasti testovania nových terapeutík z tradičných 2D línií na 3D nádorové línie, ktoré lepšie mimikujú architektúru reálneho nádorového ložiska). Druhým dôvodom je potenciál 3D nádorových línií nahradiť veľkú časť *in vivo* experimentov a znížiť tak celkové množstvo zvierat, použitých vo výskume.

Cieľom autora a zároveň jeho želaním ostáva, aby sa predložené skríptá stali aspoň malou metodickou pomôckou pre študentov v biomedicínskom výskume.

# 1 Úvod do bunkových kultúr a bunkového inžinierstva

## 1.1 História *in vitro* kultivácie buniek

Prvé pokusy o kultiváciu buniek alebo skôr častí tkanív v *in vitro* podmienkach (mimo tela organizmu) boli realizované už embryológmi Rossom Harrisonom a Alexisom Carrelom už na začiatku minulého storočia (*Carrel and Burrows, 1911; Gähwiler, 1999; Ambrose, 2019*). V tomto období vznikli aj prvé poznatky o tom, že bunky sú schopné kolonizovať povrch sklenenej alebo plastovej misky a boli testované prvé kultivačné médiá, pozostávajúce z nebunkových krvných komponentov, soľných roztokov a aditív. Alexis Carrel sa dokonca za svoje zásluhy v oblasti kultivácie buniek stal prvým Američanom, odmeneným Nobelovou cenou za medicínu v roku 1912. Veľmi zaujímavý je podiel letca a chirurga Charlesa Lindbergha v tejto oblasti. Bol totiž známy aj ako skúsený experimentátor a do oblasti *in vitro* kultivácie priniesol viacero objavov (*Malinin, 1996*).

## 1.2 Definícia bunkovej línie

Pojmom „bunková línia“ označujeme fenotypovo definovanú bunkovú kultúru (súbor buniek rastúcich v umelo pripravených podmienkach), ktorá môže mať aj tzv. klonálny charakter (línia odvodená z jedinej bunky) alebo pochádza z relatívne homogénnej časti tkaniva. Principiálne poznáme *primárne* a *kontinuálne* bunkové línie. Primárne bunkové línie sú tvorené krátkodobými bunkovými kultúrami, odvodenými napr. zo živočíšneho alebo ľudského nádorového tkaniva. Kontinuálne bunkové línie sú dlhodobé alebo immortalizované bunkové kultúry, odvodené zväčša z nádorového alebo nenádorového tkaniva. Bunkové línie je ďalej možné rozdeliť podľa typu resp. spôsobu kultivácie na i) 2D línie (tvoria ich bunky, rastúce na kultivačných platničkách v jednej vrstve (*Obr.1A,B*)) a ii) 3D bunkové línie (schopné rasti v 3D priestore (*Obr.2A,B*) v špeciálnych podmienkach). Bunkové línie je možné ďalej rozdeliť na i) výskumné, modelové línie, ii) produkčné línie (využívané pri výrobe vakcín alebo protilátok) a iii) terapeutické bunkové línie (určené pre potreby použitia v regeneratívnej medicíne). Existuje mnoho ďalších skupín a rozdelení bunkových línií podľa ďalších kritérií (napr. podľa pôvodu môžeme línie rozdeliť na ľudské a živočíšne bunkové línie, podľa schopnosti nepretržitej proliferácie na immortalizované a neimmortalizované bunkové línie, podľa fenotypu na klonálne bunkové línie (odvodené z jediného klonu) a línie odvodené z viacerých buniek apod. Bunkové línie je možné do viacerých skupín

rozdeliť aj podľa stupňa molekulárno - genetickej manipulácie na i) pôvodné línie a ii) bunkové línie s pridanými alebo naopak, „vystrihnutými“ génmi (geneticky manipulované bunkové línie).

### **1.3 Význam bunkových línií v biomedicínskom výskume**

Bunkové kultúry alebo bunkové línie predstavujú jeden zo základných prostriedkov *in vitro* modelovania (modelovania mimo organizmu) patologických stavov, ktoré prebiehajú v tele človeka. Vhodne zvolený bunkový model skúmaného ochorenia dokáže v kombinácii s *in vivo* technikami (techniky s použitím experimentálnych zvierat) priblížiť a efektívne skúmať patologický proces ochorenia a testovať prípadné kandidátne terapie. Vhodné bunkové kultúry predstavujú teda esenciálne *in vitro* modely pre výskum širokého spektra chorôb.

### **1.4 Význam bunkových línií v onkologickom výskume**

Bunkové línie sa historicky uplatňovali najmä pri výskume nádorových ochorení. Pokiaľ sa izolované primárne nádorové bunky podarilo udržať mimo organizmu počas niekoľkých tzv. pasáží (*cell passages*) a následne kultivovať vo forme bunkovej línie, táto sa stala technicky nenáročným postriedkom skúmania patológie daného ochorenia. Rýchlo sa deliace nádorové bunky, rastúce v rôznych druhoch kultivačných médií sa následne v historickom meradle stali základnými prostriedkami v *in vitro* skúmaní rakoviny.

Vývoj v oblasti *in vitro* modelovania nádorových ochorení však priniesol mnohé zmeny v oblasti selekcie ideálneho nádorového modelu. Zistilo sa totiž, že tradične používané bunkové kultúry, rastúce v 2D prostredí kultivačnej platničky (*Obr.1*) nie sú úplne ideálnym modelom na skúmanie 3D nádorov. Bunka, ktorá rastie na platničke v 2D prostredí je vďaka ľahkej dostupnosti relatívne ľahko eliminovaná experimentálnou chemoterapiou. V reálnom, živom organizme však k prieniku chemoterapeutika dochádza postupne, cez viaceré vrstvy nádorových buniek. To umožňuje niektorým nádorovým bunkám včas reagovať na prítomnosť chemoterapeutika expresiou obranných mechanizmov xenobiotickej kaskády. Okrem toho samotná 3D „architektúra“ rastúceho nádoru, ktorá v sebe zahŕňa aj interakcie nádorových a nenádorových (napr. imunitných, a stromálnych) buniek nie je v 2D podmienkach optimálne modelovaná. To viedlo k renesancii tzv. 3D kultúr, ktoré boli pôvodne

využívané skôr pre oblasť regeneratívnej medicíny a výskum diferenciačného potenciálu tzv. kmeňových buniek (*stem cells*). Dnes už je evidentný celosvetový posun *in vitro* modelovania nádorových ochorení smerom k 3D dizajne kultivačných protokolov (Obr.2). Najväčším dôvodom je fakt, že 3D nádorové bunkové línie umožňujú selekciu terapeutických látok hneď na začiatku ich *in vitro* testovania. Mnohé testované terapeutiká sa totiž ukázali ako sľubné na základe výsledkov testovania na 2D bunkových kultúrach, ale neskôr zlyhávali pri testovaní na reálnych 3D nádoroch na zvieratách, prípadne v predklinických fázach overovania na pacientoch.

### **1.5 Význam bunkových línií v oblasti regeneratívnej medicíny**

V oblasti regeneratívnej medicíny sú bunky v podstate esenciálnou a nosnou časťou výskumu a aj terapeutického použitia. Úspech tejto oblasti medicíny priamo závisí na dostupnosti, homogenite a bezpečnosti buniek alebo bunkových línií. Regeneratívna medicína používa bunky resp. bunkové línie priamo ako nástroj terapie. Je preto dôležité, aby takéto bunky boli nielen ľahko dostupné, ale i bezpečné a dostatočne charakterizované. Len takéto bunky je možné transplantovať do pacienta za účelom liečby. Z pohľadu zdroja terapeutických buniek sa dá transplantácia terapeutických buniek rozdeliť do troch hlavných kategórií: i) *alogénna*, ii) *autológna* a iii) *xenogénna* transplantácia. Pri alogénnej transplantácii ide o transplantáciu ľudských kmeňových buniek od vhodného darcu, pri autológnej transplantácii je darca buniek a ich príjemca ten istý pacient, pri xenogénnej transplantácii je donorom (darcom) buniek alebo tkanív iný živočíšny druh. Voľba zdroja terapeutických buniek je veľmi dôležitá, keďže alogénna a xenogénna transplantácia sú spojené s nasadením imunosupresívnej liečby, ktorá predstavuje veľkú záťaž (nehovoriac o finančnej náročnosti) pre organizmus pacienta a je spojená s vyšším výskytom nádorových ochorení u imunosuprimovaných pacientov (toto vyplýva zo samotnej povahy imunosupresívnej liečby, ktorá svojím pôsobením znižuje efektivitu eliminácie novovznikajúcich nádorových buniek imunitnými bunkami nášho organizmu). Ďalším, skôr etickým ako technickým problémom je odmietnutie niektorých foriem bunkovej terapie (najmä terapie, založenej na použití buniek odvodených z ľudských fetálnych a embronálnych kmeňových buniek) samotnými pacientmi z morálno-etických alebo náboženských dôvodov. Táto skutočnosť ešte donedávna rozdeľovala celý vedecký svet na zástancov a odporcov terapií, založených na embryonálnych kmeňových bunkách. Dá sa povedať, že tomu tak bolo až do roku 2012. V tomto roku bola mladému



japonskému lekárovi dr. Shinyiovi Yamanakovi udelená Nobelova cena za fyziológiu a medicínu za objav tzv. indukovanej pluripotencie (*induced pluripotency*). Dr.Shinya Yamanaka v podstate dokázal, že akúkoľvek finálne diferencovanú, dospelú somatickú (telovú) bunku je možné reprogramovať do podoby pluripotentnej kmeňovej bunky - inými slovami je možné „vrátiť bunku v čase“. Čo to však znamená v praxi? Znamená to, že dnes sme schopní pripraviť vhodnú, terapeuticky využiteľnú bunku na liečbu pacienta reprogramovaním akejkoľvek jeho somatickej bunky (napr. kožnej bunky alebo fibroblastu). Takto reprogramované bunky sa namnožia a účinkom špeciálnych bunkových médií zmenia na potrebné typy buniek (napr. kardiomyocyty). Tieto bunky sa vo forme autológnej transplantácie následne aplikujú do pacienta. Pokiaľ je pacientove ochorenie podmienené prítomnosťou mutácie génu, je možné po izolácii kožných buniek mutovanú časť DNA „vystrihnúť“ a opraviť pomocou tzv. *Crispr-Cas9* technológie editovania genómu. Z takto opravených buniek je následne pripravená terapeutická bunková línia na transplantáciu. Metóda indukovanej pluripotencie alebo reprogramovania buniek revolučne zasiahla aj oblasť *in vitro* modelovania chorôb najmä v prípadoch, v ktorých je dostupnosť buniek na štúdium konkrétnej patológie ochorenia značne limitovaná alebo nemožná. Príkladom môže byť štúdium patológie neurodegeneratívnych ochorení napríklad amyotrofickej laterálnej sklerózy (*ALS, amyotrophic lateral sclerosis*). Pri ALS ochorení sú postihnutými bunkami tzv. motorické neuróny (*motor neurons*). Získanie živej frakcie motorických neurónov na výskum od pacienta s ALS nie je reálne a *post-mortem* (po smrti) väčšinou technicky nemožné (neuróny zvyčajne odumierajú veľmi rýchlo na rozdiel od napr. fibroblastov, u ktorých sa viabilita potvrdila aj 24-48 hodín po smrti pacienta). Technológiou indukovanej pluripotencie je však možné (po informovanom súhlase pacienta) reprogramovať biele krvinky (zo vzorky krvi) alebo kožné fibroblasty (z malej kožnej excízie) do indukovaných pluripotentných buniek (*iPSc, induced pluripotent stem cells*) a následne čiastočne diferencovať do neurálnych prekursorov, z ktorých riadenou diferenciáciou je možné získať aj motorické neuróny (*Obr.3A-L*). Vďaka mitotickej aktivite reprogramovaných kmeňových buniek (dá sa porovnať s mitotickou aktivitou nádorových buniek) je možné považovať tento zdroj buniek na štúdium patológie ochorenia takmer za nekonečný.

## 2 *In vitro* izolácia a charakterizácia buniek

### 2.1 Izolácia primárnych bunkových kultúr z tkaniva

Izolácia buniek z tkaniva je proces, pri ktorom dochádza k separácii individuálnych buniek z tkanivovej vzorky. Samotná separácia môže byť založená na mechanickej izolácii pomocou tzv. *triturácie* tkaniva pipetou alebo špeciálnym skleneným alebo teflónovým piestom, alebo na separácii buniek pomocou enzýmov. Najviac rozšírená metóda je enzymatická metóda izolácie. Najčastejšie sú izolované bunky zo zdravých orgánov a tkanív (*Obr. 1A*), ale aj (napr. v prípade prípravy nádorových bunkových línií) z nádorového tkaniva (*Obr. 1B*). Enzymová izolácia buniek z tkaniva je založená na schopnosti niektorých enzýmov štiepiť väzby proteínov v extracelulárnej matici, obklopujúcej bunky v tkanive. Medzi najčastejšie na tento účel používané enzýmy patrí kolagenáza a trypsín. Enzymovej izolácii buniek predchádza mechanické rozrušenie tkaniva na menšie kúsky (napr. skalpelom) s následnou inkubáciou zmesi tkaniva a enzýmu na trepačke pri 37°C.

*Poznámka:* Pri aseptickej príprave nových bunkových línií z excizovaného tkaniva nádoru je nutné tkanivo odobrať ideálne pri dodržaní sterilných podmienok (čo nie je vždy možné zabezpečiť kvôli faktu, že odobrané tkanivo sa najprv spracuje na histologickú evaluáciu ochorenia). Z tohto dôvodu je nutné tkanivo použité na izoláciu buniek sterilizovať ponorením do roztoku 50-70% alkoholu na dobu cca 5 sekúnd a následne tkanivo opakovane opláchnuť sterilným pufrom (napr. PBS (*phosphate buffered saline*), pH 7,4). Následne sa tkanivo mechanicky rozruší alebo rozreže na menšie kúsky skalpelom a zaleje roztokom enzýmu. Enzymová reakcia prebieha pri 37 °C v inkubátore alebo temperovanej trepačke. Rýchlosť izolácie bunkovej suspenzie z tkanivovej vzorky závisí od viacerých faktorov – napr. od veľkosti kúskov tkaniva, typu tkaniva (chrupavkovité tkanivá si vyžadujú koncentrovanejšie enzýmy, dlhší čas inkubácie a zmenu parametrov (napr. *rpm*, (*revolutions per minute*) na trepačke), typu enzýmu, teploty inkubácie a prítomnosti inhibítorov enzymovej reakcie. Spravidla je však možné jednotlivé bunky z tkaniva izolovať do 60-120 minút, pričom je dôležité proces monitorovať, aby nedošlo k prílišnému „natráveniu“ vzorky a poškodeniu alebo zničeniu izolovaných buniek. V ideálnom prípade sa podmienky izolácie buniek z jednotlivých typov tkanív ešte optimalizujú (pri zachovaní koncentrácie a objemu enzymovej zmesi na 1g tkaniva sa testuje optimálny čas

inkubácie potrebnej na optimálnu izoláciu buniek s vysokou viabilitou). Zastavenie enzýmovej reakcie v procese izolácie buniek je možné realizovať viacerými spôsobmi – zriedením roztoku enzýmu s následnou centrifugáciou vzorky a odsatím supernatantu (roztoku nad sedimentom izolovaných buniek), pridaním inhibítora enzýmovej reakcie (napr. pridaním bunkového média, ktoré obsahuje FBS (fetálne bovinné sérum) alebo pridaním EDTA (takto sa napríklad zastavuje roztok enzýmu dispázy, Obr.9C). Izolovanú bunkovú suspenziu je nutné po centrifugácii premyť sterilným pufrom (napr. PBS). Centrifugácia vzorky má byť šetrná a relatívne rýchla. Osvedčené a bezpečné parametre centrifugácie v chladenej centrifúge sú napríklad 300xg, 3 min. a 13°C. 300xg predstavuje hodnotu preťaženia (násobok zvýšenia gravitačného zrýchlenia), ktorá podstatne zvyšuje rýchlosť sedimentácie a tým aj oddelenia sedimentu buniek od suspenzie (supernatantu). Tri minúty predstavujú dostatočný čas, nevyhnutný na účinnú centrifugáciu väčšiny typov bunkových suspenzií bez rizika ich výraznejšieho poškodenia. Teplota 13°C je postačujúca, keďže pri rozbehnutí rotora centrifúgy dôjde v dôsledku prúdenia vzduchu k ďalšiemu poklesu teploty vo vnútri centrifúgy až na cca 4°C. Je nutné si uvedomiť a nezabudnúť, že aj pri nastavení týchto podmienok sa pri každom centrifugačnom kroku znižuje množstvo (počet) izolovaných buniek a následne aj celková výťažnosť. Preto je potrebné zredukovať počet centrifugačných krokov (pri premývaní vzorky) najmä v prípadoch malej veľkosti vzorky (napr. biopsie).

*Poznámka:* Separácia buniek z roztoku je možná aj bez centrifugácie a to prirodzenou sedimentáciou buniek (tento proces je však veľmi pomalý je možné ho doporučiť len v prípade veľmi citlivých, nestabilných buniek, ktoré by mohli byť vo väčšej miere poškodené pri centrifugácii).

*Príklad z laboratórnej praxe:* Pri izolácii buniek z ľudskej vzorky nádoru (duktálneho adenokarcinómu pankreasu) za účelom derivácie novej bunkovej línie a analýzy povrchových markerov na prietokovom cytometri sa tkanivo poskytnuté Ústavom patologickej anatómie prenieslo v roztoku bunkového média (DMEM/F12 Glutamax, 1% Pen/Strep a 10% FBS, bližšie informácie o zložení bunkového média sú uvedené v kapitole 2.5) do laboratória. V laminárnom boxe triedy BSL-2 (Obr.35A) sa tkanivo sterilizovalo ponorením do 50% roztoku etanolu (na prípravu roztoku sa použil čistý nedenaturovaný etanol a sterilná, redestilovaná voda) na 5 sekúnd. Tkanivo sa následne 3x premylo PBS pufrom (pH 7,4) a na Petriho miske nakrájalo na menšie

kúsky pomocou chirurgického skalpela. Kúsky tkaniva sa pomocou skalpela alebo pipety preniesli do plastovej skúmavky s objemom 50 mL a obsahom cca 10 mL roztoku kolagenázy IV (koncentrácia 1mg/mL) a umiestnili do trepačky s možnosťou inkubácie vzorky pri 37 °C. Pôvodne číry roztok enzýmu sa vplyvom uvoľnených buniek z natráveného tkaniva zakalil. Po cca 60 minútach inkubácie sa zo skúmavky odpipetoval supernatant resp. zakalený roztok a tento roztok sa následne centrifugoval (300xg, 3 min., 13°C). Po odsatí supernatantu sa sediment izolovaných buniek premyl sterilným PBS a opätovne centrifugoval. Po opätovnom odsatí supernatantu sa sediment zmiešal s kultivačným médiom a takto získaná suspenzia buniek nádorového tkaniva sa vysadila na plastové kultivačné platničky alebo ďalej spracovala podľa vlastného protokolu na 3D kultiváciu.

## **2.2 Izolácia primárnych buniek pomocou explantátovej kultúry**

Primárne bunky je možné izolovať aj bez použitia enzýmov a to pomocou tzv. explantátovej kultúry. Tá je založená na kultivácii malého kúska tkaniva, ktoré sa po niekoľkých dňoch stane zdrojom deliacich sa primárnych buniek (*Obr.3A*). Tkanivo je z platničky následne možné odobrať a použiť ho ako zdroj primárnych buniek v inej platničke. Táto metóda je výhodná najmä na izoláciu kožných fibroblastov, používaných pri príprave indukovaných pluripotentných kmeňových buniek. Výhoda spočíva v tom, že klinické pracovisko po odobraní excízie kože môže tkanivo ponorené v bunkovom médiu poslať kuriérom priamo do výskumného laboratória v polystyrénovom boxe s chladiacimi gélovými vložkami. Nie vždy je totiž možné tkanivo spracovať do formy bunkovej suspenzie priamo v nemocničnom zariadení. Aj keď existujú výnimky, na izoláciu nádorových buniek z nádorového tkaniva (*Obr.1B* a *Obr.4*) tento typ kultúry nie je veľmi vhodný, pretože väčšinou dôjde k izolácii iba stromálnych buniek, prítomných v nádore (*Obr.1B*).

*Príklad z praxe:* V projekte prípravy indukovaných pluripotentných kmeňových buniek zo zebričky - pokusnej akvárijnej rybkы (*Danio rerio*) sa mladý jedinec uviedol do anestézie pomocou roztoku *trikaínu* (*Tricaine methanesulfonate*). Následne sa rybkę, umiestnenej v malom množstve vody na Petriho miske jemne skalpelom odrezal malý, cca 2 mm kus chvostovej plutvy. Odrezaná časť sa premyla sterilným roztokom PBS a umiestnila do sterilnej kultivačnej nádoby, v ktorej sa zaliala bunkovým médiom (*Leibovitz's L-15* médium s obsahom penicilínu a 10% séra z lososa). Kultivačná

nádobka sa umiestnila do inkubátora s teplotou 22°C. Po cca 5 dňoch boli viditeľné fibroblasty (Obr.5A-D), vyrastajúce z kúska tkaniva (plutvy).

### **2.3 Alternatívne zdroje buniek na prípravu indukovaných pluripotentných kmeňových (iPS) buniek**

Príprava indukovaných pluripotentných kmeňových buniek na terapeutické účely, prípadne za účelom *in vitro* modelovania chorôb z kožnej excízie má nevýhodu v samotnej invazivite chirurgického odberu kožnej vzorky. Preto je tendencia získavať primárne bunkové kultúry na reprogramovanie menej invazívnymi postupmi. Existuje niekoľko alternatívnych spôsobov, ako také kultúry získať. Pomerne dobre je spracovaný protokol na izoláciu buniek a kultiváciu epitelových buniek, ktorých zdrojom je moč pacienta, aj keď nie vždy sa podarí (napr. v prípade detských pacientov) získať dostatočné množstvo čerstvej vzorky moču. Medzi ďalšie neinvazívne resp. menej invazívne metódy patrí i) izolácia buniek z úst pacienta pomocou vatovej tyčinky, ii) izolácia buniek z vlasového folikulu, iii) izolácia buniek z drene vypadnutého alebo extrahovaného zuba a IV) izolácia buniek z krvi. Odber krvi ako zdroja buniek vhodných na reprogramovanie patrí medzi postupy s relatívne nízkou mierou invazivity.

*Príklad z laboratória:* V projekte prípravy *in vitro* bunkových modelov Duchennovej muskulárnej dystrofie sa moč detských pacientov ukázal ako neefektívny zdroj proliferujúcich buniek (malá výťažnosť, potreba optimalizácie bunkových médií, obmedzené proliferácia buniek, dlhé obdobie potrebné na izoláciu dostatočného množstva buniek na reprogramovanie). Z týchto dôvodov sa pristúpilo k izolácii buniek z periférnej krvi, ktoré je tiež možné reprogramovať do indukovaných pluripotentných kmeňových buniek. Krv sa po odobraní do injekčnej striekačky (pokrytej K<sub>2</sub>EDTA antikoagulantom) preniesla do laminárneho boxu a opatrne prepipetovala do 50 ml skúmaviek, obsahujúcich *Ficoll* gradientový roztok (Obr.6). Pri centrifugácii krvi v tomto roztoku sirupovitej konzistencie (800xg, 30 minút, pri lab.teplote a pri najnižšej resp. vypnutej hodnote akcelerácie a aj brzdenia rotora) dôjde k oddeleniu jednotlivých frakcií buniek krvi, ktoré je možné selektívne odpipetovať. Biele krvinky (bunky, obsahujúce bunkové jadro) je možné identifikovať ako difúzny prstenec bielej farby (Obr.6). Po opatrnom odsatí vrstvy nad touto frakciou sa biele krvinky opatrne odpipetovali a ihneď 2x premyli centrifugáciou (300xg, 3 minúty, 13°C) s PBS pufrom

(pH 7,4). Bunky sa následne zamrazili v tekutom dusíku (postup mrazenia buniek je uvedený v ďalšej kapitole). Na reprogramovanie do indukovaných pluripotentných kmeňových buniek sa použili rozmrazené a následne expandované bunky (lymfocyty).

## **2.4 Derivovanie bunkovej línie klonovaním buniek (*cell cloning*)**

V bunkovom inžinierstve predstavuje klonovanie buniek veľmi užitočný nástroj izolácie bunkovej línie z identifikovaného klonu resp. jednej bunky. Na nasledujúcom príklade je možné vidieť príklad praktického použitia klonovania pri príprave nádorovej bunkovej línie.

*Príklad:* V procese prípravy novej bunkovej línie, odvodenej z duktálneho adenokarcinómu pankreasu sa na identifikáciu nádorových kmeňových buniek použili dve metódy. Prvá metóda bola založená na značení živých, nefixovaných buniek pomocou fluorescenčne značenej protilátky, detekujúcej CD133 povrchový marker, prítomný na povrchu nádorových kmeňových buniek. Pomocou fluorescenčného mikroskopu (*Evos, Invitrogene*) sa v sterilnom prostredí laminárneho boxu na základe fluorescencie identifikovali bunky, exprimujúce CD133 a tieto sa následne klonovali pomocou tzv. klonovacích krúžkov (veľmi jednoduché zariadenie, pozostávajúce z plastového krúžku, ktorý sa pomocou špeciálneho adhezíva (silikónu) pripevní do kultivačnej misky tak, aby bola bunka, určená na klonovanie lokalizovaná v jeho strede. Následne sa odsalo médium z priestoru, ohraničenom plastovým klonovacím krúžkom a priestor sa premyl pomocou PBS (premytie slúžilo na odstránenie zvyškov média, ktoré má inhibičný účinok na enzým (trypsín). Pridal sa trypsín (0,25%) a uvoľnená bunka sa preniesla do skúmavky, kde sa pôsobenie trypsínu zastavilo prídavkom rastového média s obsahom FBS. Médium, obsahujúce obsahujúce zvolený bunkový klon sa potom prenieslo do jamky 96 jamkovej kultivačnej platničky na ďalšiu expanziu.

Druhý spôsob, založený na možnosti klonovania živých buniek, ktoré exprimujú mRNA požadovaného génu, ponúka technológia *NanoFlare* (Obr.12). V tejto technológii sa využívajú nanočastice zlata, ktoré sú pokryté tzv. *antisense DNA* úsekmi a tzv. reportérovou fluorescenčnou sekvenciou (*reporter flare sequence*), hybridizovanou na antisense DNA sekvencii. Po pridaní do kultúry buniek sa nanočastice dostanú do bunky a v prípade, že sa v bunke nachádza mRNA (napr. pre *Nanog*, marker pluripotencie kmeňových buniek), dôjde k následnej hybridizácii mRNA s antisense

DNA úsekom za súčasného uvoľnenia fluorescenčne označenej sekvencie, dovtedy „tlenenej“. Prítomnosť mRNA sa tak prejaví prítomnosťou fluorescenčného signálu v jednotlivých bunkách (alebo kolóniách iPSc buniek), čo umožňuje následnú selekciu a manuálne klonovanie buniek. Na Obr.3L je viditeľná kolónia diferencovaných buniek, ktorá vznikla manuálnym klonovaním jednej bunky pomocou tejto technológie.

Klonovanie je možné realizovať aj sofistikovanými metódami napríklad metódou, založenou na použití špeciálneho prietokového cytometra alebo FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) sortera. Na základe praktických skúseností je však táto metóda vhodná skôr na klonovanie buniek, označených viacerými fluorescenčnými protilátkami (manuálne klonovanie v takomto prípade je dosť zložité). Nevýhodou klonovania buniek pomocou sortovania je finančná náročnosť potrebného zariadenia, poškodenie buniek následkom hydrodynamických tlakov pri sortovaní a s tým spojená znížená viabilita buniek po sortovaní, a aj nevyhnutnosť umiestnenia sortovacieho zariadenia v špeciálnom laminárnom boxe (aby sa zabezpečilo sterilné prostredie pre sortované bunky). Na trhu sa však nedávno objavili systémy sortovania buniek pomocou piezoelektricky kontrolovaných mikrofluidných zariadení, ktoré riešia problém sterility sortovacieho prostredia a značne znižujú poškodenie buniek pri sortovaní. Ich cena však stále ostáva limitujúcim faktorom pre praktické použitie vo väčšine laboratórií.

Tradičným, relatívne časovo náročným a prácnym, ale finančne bezkonkurenčným spôsobom klonovania je klonovanie buniek pomocou riedenia. Experiment je založený na predpoklade, že pri vysokom tzv. limitnom riedení buniek v médiu a následnom vysadení buniek do jamiek sa v niektorých jamkách objavia iba jednotlivé bunky. Tie sa po namnožení charakterizujú a bunky, odvodené od jedného klonu a spĺňajúce požadované kritériá sa použijú v ďalších experimentoch

## **2.5 Zloženie kompletného bunkového média na kultiváciu buniek**

Bunkové médium (Obr. 7), pripravené na kultiváciu väčšiny ľudských buniek je zložené z troch hlavných komponentov: i) samotného média, ktoré je vlastne roztokom, obsahujúcim zmes glukózy, aminokyselín, vitamínov a minerálov vo forme anorganických solí (médium tiež obsahuje acidobázický indikátor pH v oblasti medzi 6,8 - 8,4 (tzv. fenolovú červeň (*phenol red*), ktorá umožňuje vizuálne sledovať metabolickú aktivitu buniek a „vyčerpanie“, ale i možnú kontamináciu média). Médium



okrem toho obsahuje pufrovací systém (napr. *sodium-bicarbonate buffer*), ktorý v prostredí 5% CO<sub>2</sub> udržiava optimálne pH média. Medzi najčastejšie používané základné médiá patrí RPMI médium (názov je odvodený od Roswell Park Memorial Institute, MEM (*Minimum Essential Medium*) alebo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Špeciálnym typom média je už spomenuté Leibovitz's L-15 médium, ktoré umožňuje kultiváciu buniek v prostredí bez CO<sub>2</sub> ekvibrácie (inkubátor nemusí byť pripojený na tlakové CO<sub>2</sub> bomby, ako v prípade štandardných médií). Okrem základných typov médií existuje ešte široká ponuka komerčne dostupných špeciálnych médií, určených na osobitné použitie (napr. bunkové médiá určené na kultiváciu pluripotentných kmeňových buniek, ďalej bunkové médiá na diferenciáciu buniek a podobne).

*Poznámka:* Častou, priam hamletovskou otázkou v laboratóriu je otázka, či bunkové médiá nakupovať vo forme *ready-to-go* (médium vo formáte priamo určenom na použitie, najmä v prípade špeciálnych typov média) alebo ich radšej pripraviť *de novo*. Odpoveď je v podstate závislá na type experimentu. Pokiaľ plánujeme krátkodobé alebo pilotné, resp. testovacie experimenty, je lepšie si objednať predpripravené, publikované médium (aj keď je jeho cena o niečo vyššia, v konečnom dôsledku sú výdavky na takýto typ experimentu menšie). Pokiaľ však povaha experimentov vyžaduje dlhodobé použitie určitého média vo väčších množstvách, je ekonomicky zaujímavejšie si médium pripraviť vo vlastnej réžii (nakúpením jednotlivých položiek osobitne a následne zmiešaním komponentov a sterilizáciou média pomocou filtrov). Existujú pracoviská, ktoré si pripravujú aj základnú zložku média (DMEM, MEM alebo RPMI) svojpomocne a po sterilizácii veľkého objemu média pomocou filtračnej sterilizácie takto pripravené médium alikvotujú do sterilných sklenených fliaš a uskladnia až do použitia v chladničke. Aj keď sa tento spôsob javí ako ekonomicky a ekologicky najlepší, nemožno ho kvôli náročnosti prípravy a výberu kvalitných komponentov úplne odporúčať a najmä v prípade sofistikovaných bunkových kultúr kmeňových buniek je lepšie spoľahnúť sa na produkty renomovaných dodávateľov (napr. firmu Gibco, USA).

Ďalším komponentom typického bunkového média na kultiváciu ľudských buniek je ii) *FBS* (fetálne telacie sérum). Fetálne telacie sérum (*fetal bovine serum* alebo *fetal calf serum* (oba termíny sú ekvivalentné) je dôležitou aditívnou súčasťou bunkového média. Je zdrojom mnohých rastových faktorov a snahy o jeho nahradenie



v kultivačných médiách sa v praxe uplatňujú len veľmi pomaly a sporadicky. Existujú však mnohé vedecké a eticko-morálne dôvody, prečo nahradiť použitie séra v bunkových médiách. Z vedeckého hľadiska ide hlavne o fakt, že sérum nie je chemicky definovaná položka bunkového média. Jeho použitie preto naráža na problém reprodukovateľnosti výsledkov. Ďalším dôvodom je riziko jeho použitia, spojené s prenosom niektorých typov ochorení (napr. priónových ochorení). Etické dôvody sú tiež veľmi závažné a vyplývajú z povahy samotného procesu získavania tel'acieho séra. Tel'acie sérum sa totiž získava punkciou srdca (*cardiac puncture*) z teliat, čerstvo izolovaných zo zabitej kravy. Ročne takto padne za obeť viac než milión nenarodených teliat. Punkcia srdca plodu sa vykonáva ihlou s hrubým priemerom bez anestézie a to až do kompletného vykrvenia plodu. Existujú výskumy, potvrdzujúce domnienku, že plod cíti a vníma samotnú procedúru a je teda vystavený týraniu. Niektoré pracoviská, v ktorých sa sérum získava tvrdia, že odber realizujú až pri zástave srdca plodu. To by však podľa výskumov malo za následok získanie len veľmi malého množstva krvi alebo séra. Podľa nových odporúčení by sa mal plod (dostatočne dlho po usmrtení matky) pred punkciou srdca a odberom krvi usmrtiť zbraňou s tzv. viazaným projektilom. Táto metóda umožňuje vykrvenie zvieraťa, ktoré bolo predtým omráčené a nie je pri vedomí, ale srdce mu ešte nejaký čas pracuje. V každom prípade však dnes už existujú syntetické, definované náhrady tel'acieho séra a novinkou je aj tzv. *platelet-derived serum*. Ide o extrakt z krvných doštičiek, ktorý sa získava lýzou doštičiek opakovaným zmrazením a rozmrazením vzorky. Tento extrakt sa osvedčil hlavne pri tvorbe klinicky použiteľných, terapeutických buniek (napr. mezenchymálnych buniek). Ďalšou možnosťou ako nahradiť fetálne tel'acie sérum je použitie ľudského séra, ktoré je v požadovanej kvalite a čistote dostupné cez viaceré biotechnologické spoločnosti. Už spomínané, syntetické, chemicky definované alternatívy fetálneho tel'acieho séra sú tiež dostupné, ich značnou nevýhodou je však stále relatívne vysoká cena. Majú však veľký význam pre použitie v klinicky aplikovateľných protokoloch, v ktorých je použitie dobre chemicky definovaných komponentov nevyhnutné.

Dôležitým komponentom bunkového média sú *antibiotiká*. Antibiotiká v kultivačnom médiu slúžia na zabránenie kontaminácie bunkovej kultúry mikroorganizmami. Používajú sa v relatívne nízkych koncentráciách, pretože môžu byť toxické aj pre samotné kultivované bunky. Antibiotiká sú nefyziologickou súčasťou bunkových médií

a pri niektorých kultivačných protokoloch sa nepoužívajú. Príkladom môže byť reprogramovanie ľudských kožných fibroblastov do pluripotentných kmeňových buniek transfekciou pomocou syntetickej RNA. Pri tzv. transfekcii RNA molekúl (transfekcia je nevirálny prenos molekúl alebo vektorov do bunky) sa môžu väčšie množstvá antibiotík dostať do vnútra bunky a pôsobiť toxicky, následkom čoho vzrastie počet mŕtvych buniek a celkovo sa zníži efektivita transfekcie. Je potrebné si uvedomiť, že prítomnosť antibiotík v kultivačnom médiu zabraňuje kontaminácii kultúry len do určitej miery – napr. pri náhodnom otvorení platničky mimo laminárny box je kontaminácia platničky veľmi pravdepodobná (aj keď to do značnej miery závisí od čistoty miestnosti) a je lepšie takúto kultúru vyradiť resp. použiť napríklad na extrakciu proteínov alebo analýzu povrchových CD markerov pomocou prietokovej cytometrie. Na zabránenie kontaminácie bunkových kultúr kvasinkami a plesňami, ktoré sú prítomné vo vzduchu, sa používajú tzv. *antimykotiká*. Pri izolácii primárnych kultúr sa často používa aj ich kombinácia (najmä v prvých fázach izolácie).

*Príklad z praxe:* Študent potreboval malé množstvo sterilného média na alikvotovanie rastových faktorov. Otvoril preto novú fľašu s bunkovým médiom a odobral z nej 5 mL média. Otvorenie fľaše so sterilným médiom je spojené s rizikom jeho kontaminácie. Na zabránenie kontaminácie v otvorenej fľaške média pridal študent k médiu roztok antibiotík (1%). Fľašu uzatvoril, na etiketu označil prídavok antibiotík spolu s dátumom a uskladnil ju v chladničke. Po pridaní FBS (séra) sa takéto médium následne použilo na kultiváciu buniek.

## 2.6 Kultivačné platničky

Ľudské bunky sa kultivujú v plastových kultivačných nádobách rôznych rozmerov, ale štandardne sa možno stretnúť s plastovými Petriho miskami (priemer 10 cm), 6-jamkovými, 12-jamkovými, 24-jamkovými a 96-jamkovými platničkami, ďalej kultivačnými fľaškami rôzneho objemu, ktoré sú vyrobené z priesvitného polystyrénu, nezriedka ošetrovaného rôznymi chemicko-fyzikálnymi metódami napr. elektrickou plazmou. Takéto ošetrovanie plastovej platničky zvyšuje schopnosť buniek priľnúť k povrchu plastu. Špeciálnym prípadom sú plastové platničky s neadherentným (gélmi alebo polymérmi inaktivovaným) povrchom, ktoré sa používajú na tzv. 3D kultivácie buniek vo forme sféroidov.

## 2.7 Kultivácia a expanzia primárnych buniek

Po úspešnej izolácii bunkovej suspenzie z tkaniva nastupuje ich kultivácia, spojená s expanziou. Na zopakovanie - bunky sa kultivujú v bunkových kultivačných médiách, ktoré sú komerčne dostupné vo veľmi veľkom množstve typov a modifikácií. Napriek tomu si niektoré laboratória pripravujú kultivačné médiá vo vlastnej réžii z dôvodu vysokej ceny komerčných médií (v roku 2022 sa cena bunkových médií pohybovala od 20 eur/500 mL štandardného média (DMEM) až do 500-600 eur/L špeciálneho média). Zloženie väčšiny používaných médií je známe, zloženie niektorých špeciálnych médií je naopak tajné a chránené medzinárodnými patentmi. Štandardné bunkové médium je izotonické, HEPES alebo bikarbonátovým pufracím systémom pufrovaný roztok obsahujúci ióny (kofaktory enzýmových reakcií), vytvárajúce optimálny osmotický tlak, aminokyseliny (prekurzory resp. stavebné jednotky bielkovín), vitamíny, zdroj energie (glukózu), a napokon pH indikátor (*phenol red*). pH indikátor umožňuje vizuálnu kontrolu stavu média a aj kontaminácie (bakteriálna kontaminácia je sprevádzaná nižším pH média, ktoré po kontaminácii zmení farbu na žltú). K médiu sa pred samotnou kultiváciou buniek pridáva fetálne teľacie sérum (FBS), ktorého percentuálne zastúpenie sa pohybuje od 5% do 10% objemu média. Fetálne teľacie sérum (ako už bolo spomenuté) je veľmi dôležitou súčasťou bunkových médií na kultiváciu ľudských buniek, obsahuje množstvo rastových faktorov, stimulujúcich rast buniek a pomáha udržiavať osmolaritu média, ale vzhľadom na jeho vysokú cenu, rozdiely v jednotlivých šaržiach a nemožnosti určiť presné zloženie, sa dnes nahradzuje syntetickými, presne definovanými alternatívami. Okrem toho, producenti fetálneho teľacieho séra deklarujú, že ide o vedľajší a nie cielený produkt pri spracovaní hovädzieho mäsa (keď sa na bitúnku usmrtí krava, ktorá má v sebe plod, odoberie sa kanyláciou krv plodu za účelom získania FBS). Veľký finančný benefit, spojený s predajom FBS a nutnosť určitej miery sterility pri odbere séra však skôr naznačuje, že výroba FBS je cielený proces, ktorý je možné za určitých podmienok považovať za eticky sporný a dvíha sa proti nemu vlna protestu zo strany ochranných organizácií. Veľkým problémom pre použitie FBS v kultivácii buniek je riziko spojené s priónovými ochoreniami. Väčší dodávatelia preto svoje výrobné šarže testujú aj na tieto infekčné agensy. Niektorí výskumníci preto radšej používajú na kultiváciu ľudských buniek médium s obsahom ľudského séra. Dôležitým komponentom bunkového média sú už spomínané antibiotiká. Typické je použitie

zmesi penicilínu a streptomycínu (1%), niekedy sa do médií pridávajú aj fungicídne látky (komerčne dostupná je zmes antibiotík a antimykotík of firmy Gibco, USA). Niektoré médiá obsahujú aj stabilizovanú formu glutamínu (esenciálnej aminokyseliny), komerčne známu pod menom Glutamax. Prídavok rôznych rastových faktorov (bFGF, LIF a pod.) je podmienené použitím špeciálnych protokolov, väčšinu ľudských buniek je však možné pestovať v médiu takéhoto zloženia: DMEM/F12 Glutamax (500 ml), FBS (50 mL) a Penicilín/Streptomycín (1%).

## **2.8 Pasážovanie primárnej bunkovej kultúry**

Pasážovanie bunkovej kultúry (*Obr.8*) je proces, pri ktorom sa bunky, prichytené na dne kultivačnej nádoby enzymaticky od dna nádoby oddelia, následne centrifugujú, stanoví sa ich počet a potom sa prenesú na čerstvé kultivačné platne. Pasážovanie buniek sa má robiť pri 70-80% konfluencii (konfluencia je percentuálna miera „kolonizácie“ platničky bunkami). Nie je vhodné pasážovať bunky pri vyššej konfluencii. Bunky v platničke, ktorá je 100% konfluentná sa „odliepajú“ len veľmi pomaly a to má za následok zníženú viabilitu buniek (kvôli dlhšiemu pôsobeniu enzýmu). Nádorové bunky, ktorým chýba schopnosť tzv. kontaktnej inhibície môžu kultivačnú platničku kolonizovať aj vo viacerých, na sebe uložených vrstvách. Pasážovanie takejto kultúry môže trvať dlhšie (aj viac ako 30 minút), pričom dôjde k poškodeniu veľkého množstva buniek použitými enzýmami.

Na pasážovanie rôznych typov buniek sa používa viacero typov enzýmov. Jedným z najpoužívanejších je enzým trypsín (*Trypsin*), používaný v rôznych koncentráciách a niekedy s prídavkom EDTA (kyseliny etyléndiamíntetraoctovej). Je relatívne lacným pasážovacím enzýmom. Jeho nevýhodou je, že pri jeho pôsobení na bunky niekedy dochádza k odstráneniu senzitívnych povrchových markerov (CD znakov), čo komplikuje jeho použitie napríklad pri protokoloch v prietokovej cytometrii. Ďalšími enzýmami sú akutáza (*Accutase*), dispáza (*Dispase*) a kolagenáza (*Collagenase*). Používajú sa buď samostatne, v kombinácii alebo postupne (sekvenčne) za sebou (napríklad pri pasážovaní 3D kultúr, *Obr.8C*). Výber vhodných enzýmov na pasážovanie buniek závisí od viacerých faktorov – i) citlivosti buniek voči jednotlivým enzýmom, ii) sily enzýmovej reakcie (niektoré bunky potrebujú agresívnejšie enzýmy) a iii) kompatibility so zvoleným imunodetekčným prípadne iným protokolom. Napríklad enzým akutáza (*Accutase*) sa používa pri pasážovaní citlivých buniek (napr.

indukovaných pluripotentných kmeňových buniek). Niektoré pasážovacie enzýmy obsahujú aj prídavok enzýmu DNázy, na štiepenie lepivej molekuly DNA, uvoľnenej z poškodených buniek). Zaujímavý je spôsob regulácie, resp. zastavenia enzýmovej reakcie – trypsín je účinne inhibovaný bunkovým médiom s obsahom 10% FBS (fetálneho teľacieho séra) alebo samotným sérom. Niektoré enzýmy možno zastaviť prídavkom PBS s obsahom EDTA (napríklad enzým dispázu). Niektorí výskumníci enzýmovú reakciu zastavujú (z rôznych dôvodov) len premývaním - zmes enzýmu a buniek priamo centrifugujú a následne premytím pomocou PBS pufru odstránia enzým v supernatante. Z praktických skúseností však tento postup neodporúčame (enzýmová reakcia totiž pokračuje (prebieha) aj v centrifúge a tak pri centrifugácii dôjde k predĺženej expozícii buniek enzýmom na dobu niekoľkých minút. To sa nezriedka prejaví prítomnosťou lepivej DNA (hlienovitá konzistencia suspenzie buniek), uvoľnenej z enzýmom poškodených buniek. Prítomnosť DNA spôsobí zlepenie veľkej časti buniek, ktoré sa pri následnom filtračnom kroku (v prípade protokolov pri prietokovej cytometrii) zachytia na bunkovom filtri a dôjde tak k zníženiu výťažku buniek. Pokiaľ je použitie inhibítora nemožné (napr. pri použití trypsínu na pasážovanie kmeňových buniek sa neodporúča jeho zastavenie médiom s obsahom FBS séra, ktoré môže spôsobiť nežiadúcu diferenciáciu pluripotentných buniek), odporúča sa pred centrifugáciou pridať k bunkám PBS (pH 7,4) alebo čisté médium za účelom nariadenia enzýmu pod jeho efektívnu pracovnú koncentráciu.

## 2.9 Pasážovanie 3D kultúry

Pasážovanie buniek, rastúcich v 3D kultúre (Obr.8C) sa uplatňuje vo viacerých protokoloch napríklad v protokole *in vitro* diferenciácie indukovaných pluripotentných kmeňových buniek alebo pri derivovaní nových 3D nádorových bunkových línií. Optimalizovaný a účinný protokol na deriváciu nádorových buniek pomocou 3D kultivácie je možné nájsť v detailnej podobe na tejto adrese: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2874> (Strnadel et al., 2018 (Bioprotocol)). Protokol bol pôvodne vyvinutý v laboratóriách Kalifornskej univerzity v San Diegu (na Patologickom oddelení UCSD) a ďalej optimalizovaný v laboratóriách Martinského centra pre biomedicínu, na Jesseniovej lekárskej fakulte. Viedol k úspešnej izolácii viacerých nových nádorových bunkových modelov (línií). V tomto protokole sa bunky, rastúce v tzv. sféroidoch (*spheroids* alebo *tumorspheres*) kultivujú ukotvené v gélovej proteínovej matrici - tzv. *Matrigeli* (extracelulárnej matrici (*extracellular matrix*), izolovanej z myšieho

sarkómového nádorového tkaniva). Pri ich pasážovaní je potrebné najprv použiť enzým, schopný uvoľniť sféroidy z gélovej matrice – napr. dispázu (*Dispase*). Celkový postup je možné popísať takto: po jemnom odsatí média, prítomného na povrchu gélovej vrstvy (tak, aby nedošlo k nasatiu gélu) sa gél, obsahujúci sféroidy preniesie sterilným skalpelom alebo nasatím pipetou s veľkým priemerom do 50 mL plastovej skúmavky. Pridá sa roztok dispázy a skúmavka sa preniesie do inkubátora, kde sa nechá prebiehať enzýmová reakcia. Skúmavka sa počas inkubácie niekoľkokrát jemne premieša. Reakciu sa ukončí pridaním roztoku EDTA v čase, keď už nie je prítomný gél a sféroidy dosadnú na kónické dno skúmavky (*Obr.8C*). Po následnom premytí s PBS pufrom je možné z takto izolovaných sféroidov získať jednobunkovú suspenziu pomocou inkubácie sféroidov s enzýmom akutázou (*Accutase*) pri 37°C. Reakcia sa zastavuje opakovaným premytím suspenzie buniek s PBS (takto dôjde k nariedeniu a celkovému vymytiu enzýmu). Získaná suspenzia buniek je pripravená na ďalšie použitie (pasážovanie, mrazenie, analýzu prietokovou cytometriou alebo ICC).

## **2.10 Určenie počtu a koncentrácie buniek v suspenzii**

Mnoho *in vitro* protokolov si vyžaduje presné určenie počtu a aj následnej koncentrácie buniek v suspenzii. Na určenie počtu a aj koncentrácie buniek sa dnes vo väčšine bunkových laboratórií používajú sofistikované automatické prístroje (počítače buniek alebo *cell counters*, *Obr.22J* a *Obr.36C*). Manuálne počítanie buniek pomocou tzv. Bürkerovej komôrky sa dnes používa už len veľmi zriedkavo. Stále však ide o najpresnejšiu (i keď časovo najnáročnejšiu) metódu určenia počtu a koncentrácie buniek (je zaujímavé, že v protokoloch ju majú ako hlavnú metódu aj spoločnosti, zaoberajúce sa bunkovými terapiami). Bürkerová komôrka je špeciálne podložené sklíčko s dvoma počítacími plôškami, ktoré v komôrke s presným objemom (a hĺbkou 0,1mm) obsahujú mikromriežku s presne definovanými rozmermi. Mriežku Bürkerovej komôrky tvorí sieť deviatich väčších štvorcov, ktoré sú rozdelené do 16 menších štvorcov. Do nich sa naniesie bunková suspenzia a následne sa prekryjú krycím sklíčkom. Pod mikroskopom sa následne počítajú bunky, nachádzajúce sa v priestore štvorcovej mriežky a tie, ktoré sa dotýkajú napríklad ľavej a hornej strany štvorca (aby sa zabránilo opakovanému počítaniu buniek na rozhraní štvorcov). Postupuje sa väčšinou zhora nadol a smerom zľava doprava. Počet buniek v 1mL sa následne vypočíta ako priemerná hodnota počtu buniek v štvorci, vynásobená číslom 10 000 (objem priestoru pod veľkým štvorcom (v Bürkerovej komôrke je ohraničený trojitou

čiarou) je  $0,1\text{mm}^3$ , po vynásobení číslom 10 000 dostaneme počet buniek v  $1\text{ cm}^3$  ( $1\text{ cm}^3 = 1\text{mL}$ ). Ak sa suspenzia buniek pred počítaním na komôrke nariedila (napr. 5x, to znamená v pomere 1:4 alebo 1 diel bunkovej suspenzie a 4 diely PBS pufru), skutočná hodnota počtu buniek je potom vynásobená faktorom riedenia (v našom prípade je to faktor 5). Riedenie buniek pred počítaním na Bürkerovej komôrke je niekedy potrebné, keďže počítat bunky vo veľmi hustej suspenzii je veľmi komplikované a niekedy aj technicky nemožné.

*Príklad z praxe:* Študent spočítal bunky v Bürkerovej komôrke a zistil, že koncentrácia buniek je veľmi nízka. Na *in vivo* experiment potreboval bunky s koncentráciou 10x vyššou. Nariediť bunky je jednoduché, stačí pridať roztok PBS, ale ako ich zahustiť (zvýšiť ich koncentráciu) bez ďalšej kultivácie? Odpoveď je jednoduchá, bunky stačí centrifugovať, pipetou jemne odsať roztok nad peletom a pridať 10x menší objem, ako bol pôvodný. Takto je možné zvýšiť koncentráciu buniek na požadovanú hodnotu koncentrácie.

*Príklad z praxe:* Študent pri meraní koncentrácie buniek používal automatický počítač buniek (*cell counter*). Pri opakovanom meraní zistil, že odchýlky medzi jednotlivými meraniami sú veľmi veľké počet (viac ako 15%) a jednotlivé namerané hodnoty koncentrácie buniek mali klesajúcu tendenciu). Ten istý problém nastal, keď použil automatický počítač buniek od iného výrobcu. Pri analýze pracovného postupu študenta sa zistil dôvod týchto veľkých rozdielov v jednotlivých meraniach. Pri analýze bunkovej suspenzie s vyššou koncentráciou buniek boli medzi jednotlivými meraniami cca 3-minútové intervaly, počas ktorých hustá suspenzia buniek rýchlo sedimentovala. Pri odbere vzorky na analýzu na počítači buniek študent suspenziu opätovne nepremiešal (len odobral vzorku z hornej časti suspenzie, ktorá už vplyvom sedimentácie obsahovala menej buniek). Problém sa vyriešil dôkladným premiešaním bunkovej suspenzie a následným rýchlym (do 10-15 sekúnd) odberom vzorky do analyzátoru.

Pri použití automatických analyzátorov buniek na stanovenie viability buniek (pomocou farbenia mŕtvych buniek Trypánovou modrou (*Trypan blue*) u väčšiny výrobcov nie je potrebné počítat s riediacim faktorom, spojeným s nariedením vzorky 1:1 s roztokom Trypánovej modrej. Softvér prístroja je totiž schopný farbivo v bunkách identifikovať a spomínaný faktor riedenia už zahrnúť do výslednej hodnoty koncentrácie buniek.



*Poznámka:* Pri práci s Trypánovou modrou je potrebná zvýšená opatrnosť, keďže ide o mimoriadne zdraviu škodlivú zlúčeninu, s karcinogénnymi účinkami. Špičky a jednorázové plastové počítacie komôrky je treba po použití vyhodiť do uzavretej odpadovej nádoby (nenechávať Trypánovu modrú voľne sa odparovať z použitého plastového materiálu).

### 2.11 Určenie času zdvojenia (*doubling time*) v bunkových kultúrach

Dôležitým parametrom, ktorý charakterizuje bunky novovytvorených bunkových línií alebo bunky po pôsobení terapeutika je čas zdvojenia alebo „*doubling time*“. Je to časový interval, potrebný na zdvojnásobenie počtu buniek v danej bunkovej kultúre. Na výpočet tohto parametra sa používa vzorec: **čas zdvojenia kultúry = meraný časový interval \*  $\ln(2)/\ln(\text{finálna koncentrácia buniek}/\text{začiatočná koncentrácia buniek})$ .**

Pre ilustráciu uvádzame príklad: Pri stanovení času zdvojenia novej nádorovej bunkovej línie, izolovanej z duktálneho adenokarcinómu pankreasu sa určil počet buniek v Burkerovej komôrke (9 500 buniek v jamke). Po 56 hodinách sa opätovne stanovil počet buniek (34 500) a obidve hodnoty sa vložili do vzorca. Výsledok (cca 30 hodín) udáva počet hodín, potrebných na zdvojenie bunkovej kultúry v daných podmienkach.

### 2.12 Stanovenie dynamiky rastu buniek v 3D kultúre

Stanovenie dynamiky rastu buniek v 3D kultúre môže byť obtiažne z dôvodu problematického získavania jednobunkovej suspenzie. Pôsobením enzýmov totiž dôjde k väčšiemu poškodeniu buniek (bunky na povrchu sféroidu sú pôsobeniu enzýmu vystavené dlhšiu dobu, ako bunky vo vnútri sféroidu) a tým k zníženiu reálneho počtu buniek. Vhodným riešením v takomto prípade môže byť stanovenie množstva celkových proteínov a príprava kalibračnej krivky s danou bunkovou líniou. Nasledujúci príklad ilustruje praktické použitie tejto metódy. V 3D kultúre boli kultivované v jamkách nádorové sféroidy, ktoré sa vytvorili po vysadení rovnakého množstva buniek (10 000 buniek na jamku). Na charakterizáciu rastu kultúry bolo potrebné zostrojiť rastovú krivku. Príprava jednobunkovej suspenzie zo sféroidov z tejto nádorovej kultúry sa však vyznačovala veľkou citlivosťou buniek na pôsobenie enzýmu, dôsledkom čoho bola veľká mortalita buniek a signifikantné zníženie počtu



buniek v dôsledku poškodenia enzýmom. Na riešenie tohto problému sa použila metóda stanovenia množstva celkových proteínov. Sféroidy sa nechali sedimentovať na dne kónickej skúmavky, médium sa odsalo, pridal sa PBS pufo a sféroidy sa opäť nechali sedimentovať. Následne sa jemne pipetou odsal premývací pufo a sféroidy v sedimente sa lyzovali v ľadovom RIPA lyzačnom pufri. Po lyzovaní sféroidov na ľade a následnej centrifugácii a odstránení bunkových fragmentov sa supernatant použil na stanovenie koncentrácie proteínov. Kalibračná čiara sa pre zvolenú bunkovú líniu pripravila lyzovaním rôzneho množstva 2D buniek (10 000, 50 000, 100 000, 250 000, 500 000 a 1 000 000). Zo zostrojenej kalibračnej čiary sa v programe *Microsoft Excel* metódou lineárnej regresie určila hodnota počtu buniek zo známej hodnoty koncentrácie proteínov z lyzovaných 3D sféroidov.

Určenie počtu buniek je možné aj cez spektrofotometrické meranie metabolickej aktivity buniek. Metóda alamarBlue eseje (*AlamarBlue assay*, ThermoFisher Scientific) je založená na modrom nefluorescenčnom indikátorovom činidle, ktoré je netoxické a voľne preniká do buniek - resazuríny (*resazurin*). Po preniknutí do bunky je resazurín redukovaný na intenzívne fluorescenčný resorufín (*resorufin*). Množstvo červeného fluorescenčného signálu, ktorý kontinuálne narastá v prítomnosti živých, metabolicky aktívnych buniek je možné odmerať fluorescenčným spektrofotometrom. Počet buniek, ktorý prislúcha hodnote odmeraného signálu sa následne určí z kalibračnej čiary (táto sa vytvorí vysadením rôzneho počtu buniek a odmeraním fluorescenčného signálu, ktorý prislúcha rôznym množstvám buniek). Samotná realizácia experimentu je jednoduchá – AlamarBlue činidlo sa pridá k bunkám na 1-4 hodiny (pri 37°C) a po inkubácii sa zmeria hodnota fluorescencie (je možné meranie aj absorbancie). AlamarBlue činidlo je netoxické, preto umožňuje opakované a dlhodobé použitie v experimentoch.

### **3 Mrazenie (kryoprezervácia) buniek**

Archivácia bunkového biologického materiálu sa realizuje kryoprezerváciou pri teplote -196 °C v špeciálnych izolovaných nádobách, tzv. Dewarových nádobách (*Obr.9A-D*). Pri teplote -196 °C je možné uchovať bunky až niekoľko desaťročí (autor pracoval s primárnymi bunkami, ktoré boli zamrazené 17 rokov bez zreteľnej straty viability). Kryoprezervácia buniek je špeciálny proces, pri ktorom najprv dochádza k odstráneniu vody z bunky (v praxi sa realizuje zmiešaním sedimentu (peletu) buniek s bunkovým

médiom, obsahujúcim 10% DMSO (*dimetylsulfoxid*) a následnému poklesu teploty až na  $-80^{\circ}\text{C}$ , pričom pokles teploty by nemal byť väčší ako  $1^{\circ}\text{C}/\text{minútu}$ . Toto sa dá dosiahnuť pomocou špeciálnych chladiacich zariadení (prístrojov) alebo použitím plastového mraziaceho zariadenia, komerčne známeho pod názvom *Mr.Frosty*. Tento jednoduchý plastový výrobok kombináciou použitého materiálu určitej hrúbky a obsahom izopropanolu zabezpečí optimálny pokles teploty zamrazovanej vzorky (pokles o  $1^{\circ}\text{C}/\text{minútu}$ ), keď je spolu so zamrazovanými vzorkami umiestnený do mrazničky s teplotou  $-80^{\circ}\text{C}$ . Takto predmrazené bunky sa následne (najlepšie na druhý deň) prenesú do Dewarovej nádoby a v špeciálnych plastových stojanoch (*Obr.10B-D*) sa umiestnia do oblasti plynnej fázy tekutého dusíka. Na kryoprezerváciu buniek sa používajú špeciálne kryoskúmavky (*cryovials*) s rozličným objemom (najčastejšie 1-2mL), na ich označovanie je nevyhnutné použiť špeciálne označovače, schopné zaručiť čitateľnosť označenia aj pri takýchto extrémne nízkych teplotách. Vhodne popísaná kryoskúmavka by mala obsahovať pomenovanie buniek resp. názov bunkovej línie, dátum zamrazenia, číslo pasáže a prípadne ďalšie informácie (napr. informáciu o transdukcii virálnym vektorom). Pri mrazení buniek je z dôvodu zachovania ich viability vhodné mraziť bunky v určitej koncentrácii. Napr. pri použití kryoskúmavky s obsahom 1mL by množstvo zamrazených buniek nemalo prekročiť  $1 \times 10^6$  buniek/skúmavku. Viabilita buniek po rozmrazení môže byť nižšia, ak koncentrácia zmrazených buniek bola veľmi nízka (rádovo niekoľko desiatok tisíc buniek v 1mL kryoprezervačného média). Hodnota viability buniek po rozmrazení však často súvisí s charakterom mrazených buniek – niektoré bunky znášajú zamrazovanie bez problémov aj za neoptimálnych podmienok (napr. nádorové bunky), iné typy buniek (najmä kmeňové bunky) vyžadujú nezriedka prítomnosť podporných antistresových faktorov (napr. ROCK inhibítora) a špeciálne typy médií. Na základe skúseností autora je kultivačné médium s prídavkom 10% DMSO možné doporučiť ako najvhodnejšie kryoprezervačné médium. Veľký pozor treba dávať na použitie komerčných kryoprezervačných médií (hlavne tých, ktoré sa predávajú v tzv. *ready-to-go* formáte (bez potreby pridania ďalších zložiek). Tieto médiá nie sú vždy optimálnou voľbou a ak sa pre ne napokon predsa len rozhodneme, mali by sme si ich efektivitu najprv overiť na menšom množstve zamrazovaných vzoriek.

Prítomnosť FBS (séra) v kryoprezervačnom médiu podľa niektorých autorov pomáha zachovať viabilitu zamrazených buniek. Pri mrazení kmeňových buniek však nie je možné sérum použiť (v dôvodu nežiadúcej diferenciácie buniek v prítomnosti séra). V takýchto prípadoch je možné použiť médium bez séra (na archiváciu počas niekoľkých mesiacov) alebo pridať do kryoprezervačného média 10% KOSR (*Knock out serum replacement*, čo je vlastne chemicky definovaný substituent séra, ktorý však neindukuje diferenciáciu kmeňových buniek, a zároveň udržiava viabilitu zamrazených buniek).



*Príklad z praxe:* V laboratóriu boli pasážované primárne bunky, izolované z biopsie kože (fibroblasty) a kolónie indukovaných pluripotentných kmeňových buniek. Z kolónií iPS buniek bola pripravená jednobunková suspenzia pomocou enzýmu acutázy (*Accutase*). Na mrazenie týchto dvoch typov buniek sa pripravili dve osobitné mraziace bunkové médiá: i) DMEM/F12 Glutamax s obsahom 1% P/S, 10% FBS a 10% DMSO (pre fibroblasty) a ii) mTESR 1 médium (obsahujúce 1% roztok antibiotík) s prídavkom 10% KOSR (*knock out serum replacement*) a 10% DMSO.

Kryoprezervačné médium sa pripravilo nasledujúcim spôsobom: Do 15 ml plastových skúmaviek sa napipetovalo kultivačné médium a následne DMSO. Médium sa sterilnou pipetou niekoľkokrát zamiešalo. Následne sa médium pridalo k bunkám (peletu), zmes sa opäť jemne premiešala a preniesla do vopred označených kryoskúmaviek. *Poznámka: Kryoskúmavky sa nikdy neplnia až po okraj (v takom prípade môžu kryoskúmavky prasknúť pri mrazení alebo dokonca explodovať pri rozmrazovaní).* Kryoskúmavky sa preniesli do zariadenia na mrazenie (*Mr.Frosty*), ktoré bolo ekvilibrované na teplotu okolia (laboratória). Následne sa zariadenie prenieslo do mrazničky (-80°C). Na druhý deň sa vzorky vybrali a premiestnili v špeciálnych stojanoch do Dewarovej nádoby s tekutým dusíkom. Nákladnou, ale niekedy nevyhnutnou alternatívou (v prípade mrazenia veľmi citlivých buniek) je automatické mrazenie pomocou špeciálnych prístrojov. Tieto dokážu zamraziť vzorku na -80°C alebo priamo na -196°C (zariadenia vyžadujúce zdroj tekutého dusíka) precíznou kontrolou znižovanej teploty a to bez ovplyvnenia kvality vzorky tzv. latentným teplom, ktoré sa uvoľňuje pri zmene skupenstva zmrazovanej zmesi.

## 4 Kontaminácia v bunkovom laboratóriu a jej riešenie

Kontaminácia bunkovej kultúry mikroorganizmami je nežiadúcim javom v laboratóriu bunkových kultúr. Jej príčinou môže byť externá kontaminovaná vzorka, bunky alebo kontaminované tkanivo. Kontaminácia môže vzniknúť aj v dôsledku chyby alebo porušenia zásad aseptického práce. Riešenie situácie spojennej s kontamináciou v bunkovom laboratóriu spočíva v niekoľkých krokoch. Prvým je likvidácia kontaminovaných platničiek pomocou 10% roztoku chlórnanu sodného (napr. Savo), sterilizácia bunkových inkubátorov, filtrácia médií baktériologickými filterami alebo (odporúčaný variant) likvidácia použitých médií. Dôležitá je aj výmena filterov v automatických pipetoch, na prívodnej hadičke medzi CO<sub>2</sub> bombou a inkubátorom. Následne je nutné dôkladné vyčistenie vnútorného priestoru laminárnych boxov 70% etanolom a UV sterilizácia takto vyčistených priestorov. Odporúča sa aj kontrola HEPA filtračného systému (túto časť treba zveriť servisnému technikovi firmy, ktorá laminárny box dodala). Niekedy môže byť zdrojom kontaminácie aj klimatizácia, ktorá by z týchto dôvodov mala byť pravidelne čistená a filtre menené. Pri práci v bunkovom laboratóriu sa aj z týchto dôvodov neodporúča mať klimatizáciu zapnutú. Zaujímavým zdrojom kontaminácie v bunkovom laboratóriu sú laboratórne plášte. Na ilustráciu uveďme prípad experimentátorky, ktorá dopoludnia kultivovala rezistentné kmene baktérií a poobede pracovala v laboratóriu bunkových kultúr – v tom istom plášti. Výsledok filozofie „druhý laboratórny plášť nie je nutný“ nie je ťažké si predstaviť. Kvalitné laboratóriá pri práci s bunkami používajú oblečenie podobné oblečeniu pracovníkov kovidových odberových jednotiek. Vo väčšine prípadov to však nie je nutné a na bežné experimentálne účely sa na prácu s bunkami používajú laboratórne plášte, ktoré sú v pravidelných intervaloch čistené (prané) a v ktorých pracovníci neprichádzajú do kontaktu s mikrobiologickými kultúrami.

Aj pri dodržiavaní zásad sterilnej práce a udržiavaní čistoty v kultivačnej miestnosti sa občas vyskytne kontaminácia bunkovej kultúry, a to najmä pri izolácii primárnych bunkových kultúr. Pokiaľ ide len o ojedinelú kontamináciu jednej platničky (napr. v dôsledku náhodného pootvorenia pri manipulácii alebo spracovaní vzorky, ktorá bola kontaminovaná) a nie o celkovú (systémovú) kontamináciu všetkých platničiek a kultivačných nádob ako dôsledok kontaminácie zásobného média), riešenie spočíva v opatrnom odstránení kontaminovanej platničky a vyčistení inkubátora papierovou utierkou, namočenou v 70% etanole. Pokiaľ je možné na nejaký čas presunúť ostatné,

nekontaminované kultúry do náhradného inkubátora, je dobré inkubátor, v ktorom sa kontaminácia vyskytla sterilizovať spustením automatického sterilizačného programu (cyklu) alebo aspoň dôkladným vyčistením 70% etanolom (pozor, po čistení etanolom sa bunky môžu navrátiť do inkubátora až po dôkladnom odparení a vyvetraní etanolu).

Najčastejšiou formou kontaminácie bunkových kultúr je bakteriálna kontaminácia, ktorá sa prejavuje značným zakalením číreho bunkového média, jeho žltým zafarbením a aj sprievodným, typickým zápachom kultúry. Bakteriálnu kontamináciu v tomto štádiu nie je väčšinou možné eliminovať a kultúru je nutné zlikvidovať.

*Poznámka:* Snaha o niekoľkonásobné premytie platničky s kontaminovanými bunkami s následným prídavkom média s vyššou koncentráciou antibiotík zväčša neprinesie žiadny výsledok. Menej závažnú bakteriálnu kontamináciu, ktorá sa pod mikroskopom prejavuje ako prítomnosť malých, čiernych pohybujúcich sa teliesok (baktérií) je ešte možné eliminovať (napr. zmenou kombinácie antibiotík alebo zvýšením ich koncentrácie), ale najlepším riešením (pokiaľ nejde o mimoriadne vzácne primárne bunky izolované napríklad z raritných foriem nádorov) je takúto kultúru zlikvidovať.

Kontaminácia kvasinkami tiež predstavuje v určitých ročných obdobiach veľký problém a nie je možné ju účinne v rámci kontaminovanej kultúry zlikvidovať. Kontaminácia plesňami (vláknitými hubami, *Obr. 10*) je naopak relatívne ľahko eliminovateľná, ako ukazuje nasledujúci príklad z laboratória:

*Príklad:* Pri izolácii primárnych kožných fibroblastov z kožnej biopsie z ucha experimentálneho prasiatka sa kožná biopsia sterilizovala rýchlym ponorením tkaniva do 70% etanolu a následným premytím sterilným roztokom PBS. Tkanivo sa následne prenieslo do kultivačných platničiek s bunkovým médiom. Na piaty deň bola zistená prítomnosť vláknitých štruktúr na dvoch miestach kultivačnej platničky. Pod mikroskopom sa potvrdila kontaminácia plesňami. Keďže realizácia odberu novej kožnej biopsie by bola časovo aj personálne náročná, pokúsili sme sa o záchranu kultúry nasledujúcim spôsobom: pinzetou sa biopsia preniesla do Petriho misky a opätovne sa sterilizovala krátkym ponorením do 70% etanolu. Biopsia sa následne prepláchla sterilným roztokom PBS a vložila do novej kultivačnej misky s obsahom média, do ktorého bola pridaná zmes antibiotík a antimykotík (*Anti-Anti*, Gibco, USA). Keďže v pôvodnej, kontaminovanej platničke sa už nachádzali primárne fibroblasty, odvodené z kožnej biopsie (a zároveň existovalo riziko, že pri opätovnej sterilizácii

kožnej biopsie etanolom došlo k nezvratnému poškodeniu tkaniva), rozhodli sme sa o záchranu aj pôvodnej kultúry. Pod mikroskopom sa pomocou sklenenej kapiláry, napojenej na vákuovú odsávačku jemne odsali všetky vláknité štruktúry a médium sa následne tiež odsalo. Platnička sa dvakrát prepláchla a znovu naplnila bunkovým médiom s dvojnásobnou (oproti koncentrácii odporúčanej výrobcom) koncentráciou zmesi antibiotík a antimykotík (*Anti-Anti*, Gibco, USA). Na druhý deň sa pozoroval opätovný, ale značne reduvaný výskyt vláknitých štruktúr (*Obr.10A,B*), preto sa procedúra znova zopakovala, tentokrát dvakrát v rámci jedného dňa. Po 5 dňoch už bola kultúra bez viditeľnej kontaminácie a po 10 dňoch sa koncentrácia antibiotík a antimykotík zredukovala na koncentráciu odporúčanú výrobcom. Takto zachránená primárna bunková línia sa stala prekursorom pre veľmi zaujímavú pluripotentnú bunkovú líniu (*Strnadel et al., 2018, (Science Translational Medicine)*).

V oblasti bunkového inžinierstva existuje veľmi závažná forma skrytej a pomaly sa manifestujúcej infekcie vnútrobunkovými baktériami alebo tzv. mykoplazmami (*Mycoplasma*). Ide o veľmi jednoduché malé baktérie, ktoré nemajú bunkovú stenu. Niektoré sú pôvodcami ľudských ochorení a ochorení zvierat. Z hľadiska významu vo výskume ide o parazity, ktoré môžu značne komplikovať experimenty, založené na použití bunkových kultúr. Najčastejšiou mykoplazmou, s ktorou sa možno pri kontamináciách bunkových kultúr stretnúť je *Mycoplasma orale*, prítomná v ústach človeka. Pri práci s bunkovými kultúrami je preto veľmi dôležité nosiť jednorázové rúško alebo respirátor. Kontaminácia touto mykoplazmou sa totiž vizuálne nijako neprejavuje a experimentátor si väčšinou niečo všimne až v čase, keď nastane inhibícia rastu kultivovaných buniek (v dôsledku kompetície o aminokyselinu arginín). Kontamináciu buniek mykoplazmou sa dá zistiť pomocou metódy PCR (veľmi dobrým produktom je *Universal mycoplasma detection PCR kit* od spoločnosti ATCC, ktorá je jednou z najväčších biobánk pre bunkové línie na svete) alebo po nafarbení kultúr pomocou fluorescenčnej látky na vizualizáciu jadier (DAPI). Pod mikroskopom je kontaminácia mykoplazmou viditeľná ako prítomnosť malých bodových štruktúr v okolí jadra a v cytoplazme. Aj keď už sú komerčne dostupné antibiotiká, schopné eliminovať mykoplazmy a takto zachrániť kontaminované bunky, možno tento postup odporúčať len pre veľmi raritné a vzácne primárne bunkové kultúry. Inak je nutné kultúry (aj zamrazené alikvoty) zlikvidovať (10% roztokom SAVA), dekontaminovať pipetovacie zariadenia (autoklávaním), zlikvidovať všetky otvorené médiá a aditíva a nahradiť

ich novými. Inkubátor je nutné sterilizovať parným alebo chemickým cyklom, laminárny box umyť 70% alkoholom a sterilizovať pravidelne UV žiarením. Do rutinej laboratórnej praxe je potrebné zaviesť používanie plastových špičiek s filtrom (prevencia infekcie pri pipetovaní). Veľmi dobrou, ale často podceňovanou radou je nezdieľanie bunkových médií, aditív a alikvotov rastových faktorov (v špičkových svetových výskumných laboratóriách je to nemysliteľné). Súčasťou naozaj kvalitného laboratória, v ktorom sa pracuje s bunkovými kultúrami je pravidelné testovanie médií alebo kultivovaných buniek PCR metódou na prítomnosť mykoplazmy.



Je totiž dokázané, že takmer 50-60% všetkých bunkových kultúr je kontaminovaných mykoplazmou. Spoliehať sa na to, že to nemusí ovplyvniť naše experimenty je znakom značného amaterizmu. Úplnou pohromou sa môže stať prijatie buniek, darovaných iným laboratóriom bez otestovania alikvotu na prítomnosť mykoplazmy. Zavedenie pravidelného testovania je pritom jednoduchým a finančne nie veľmi náročným spôsobom, ako uchrániť nielen bunky, ale i vzájomné dobré vzťahy medzi spolupracovníkmi.

Kontaminácia buniek vírusmi patrí do špeciálnej kategórie kontaminácií, ktoré sa však môžu objaviť v bunkovej kultúre. Väčšinou nie je dobre rozoznateľná (ak sa vylúčia všetky ostatné typy kontaminácií, je možné ju skôr predpokladať) a ani nie je možné ju včas odhaliť (pokiaľ sa nejedná o špeciálny typ patogéna, asociovaného so špecifickou bunkovou líniou). Liečba takejto kultúry nie je väčšinou možná a kultúru je potrebné zlikvidovať.

*Príklad z praxe:* Pri derivovaní nových bunkových modelov z ľudských pankreatických duktálnych adenokarcinómov bola chirurgickým oddelením americkej nemocnice (*Thornton Hospital, San Diego, USA*) poskytnutá vzorka nádoru z pacienta, ktorý trpel infekčným ochorením (hepatitídou C). Na túto skutočnosť boli vedeckí pracovníci prijímajúci vzorku upozornení chirurgami. Na základe tejto informácie nebola vzorka spracovaná do podoby bunkovej línie, pretože existovalo reálne riziko infekcie pre pracovníkov a aj bunkové kultúry v inkubátore.

## 4.1 Kontaminácia bunkových kultúr inými typmi buniek

Medzi veľmi závažné formy kontaminácie bunkových kultúr patria kontaminácie inými typmi ľudských alebo živočíšnych buniek. Kontaminácia inými typmi ľudských buniek vzniká v dôsledku hrubých chýb v procese kultivácie – napr. pri zlom označení alikvotov pri mrazení buniek, ich pasážovaní a dokonca aj pri výmene média. Niektorí pracovníci v snahe ušetriť finančné prostriedky pri výmene média používajú tú istú pipetu na výmenu média v dvoch rôznych typoch bunkových línii. Argument typu „veď som sa len dotkol steny platničky“ nie je namieste a hlavne pri suspenzných kultúrach hrozí riziko prenosu časti buniek na pipete pri výmene média. Kontaminovať inými typmi buniek sa môže nielen ďalšia platnička, ale i zásobný roztok bunkového média. Treba si uvedomiť, že mnohé (najmä nádorové bunky) sú schopné prežiť niekoľko dní aj v bunkovom médiu v chladničke a to dokonca aj bez prítomnosti séra. (Pri jednom FACS experimente sa autor stretol s viabilnými nádorovými bunkami po 18 (!) dňoch uskladnenia buniek v chladničke a to dokonca len v roztoku PBS s EDTA a 2% sérom). Podľa nedávnych štúdií je problém kontaminácie inými bunkami veľmi častý a na mnohých výskumných pracoviskách personál zrejme ani netuší, že pracuje s inými typmi buniek. Dôvodom je opäť chýbajúci systém pravidelnej kontroly identity buniek. Následky sú pritom veľmi závažné a okrem plytvania časom a grantovými prostriedkami nezriedka dôjde aj k strate dôveryhodnosti alebo kreditu pracoviska. Podľa doporučení bunkového repozitárového centra ATCC v USA by sa identita buniek mala kontrolovať pri i) prijatí buniek z iných laboratórií, ii) po každých cca 10 pasážach, iii) pri zakladaní biobankového depozitu alebo zakaždým, keď existuje akákoľvek pochybnosť (napr. výskyt metastáz po injikovaní zvierat bunkovou líniou, ktorá nie je metastatická, alebo pri abnormalitách vo fenotype buniek (pôvodne epiteliálne bunky sa „zmenili“ a vykazujú skôr mezenchymálny charakter)). Na testovanie identity buniek je dnes možné použiť viaceré služby, ponúkané napríklad spomenutou spoločnosťou ATCC. V rámci tzv. STR analýzy (STR – *short tandem repeat*, alebo PCR analýzy tandemových DNA sekvencií v určitých oblastiach génov (tzv. *core loci* oblasti) spoločnosť ATCC nielenže analyzuje 17 najviac polymorfných markerov ľudského genómu (plus gén amelogénín), ale výsledky porovnáva aj s najväčšou svetovou STR databázou. Toto umožní odhaliť aj zdroj kontaminujúcich buniek, niekedy aj počet kontaminovaných kultúr. Príklad takejto analýzy, ktorá odhalila kontamináciu vzorky inou líniou je na Obr.11. Samotná príprava vzorky na



takúto analýzu trvá veľmi krátko a vlastne spočíva iba v príprave jednobunkovej suspenzie s definovaným počtom buniek. Táto suspenzia sa v určitom, presne definovanom objeme kvapne na špeciálny papierový nosič (spolu s predplatenou kuriérnou službou je súčasťou kitu), nechá sa v sterilných podmienkach (v laminárnom boxe) vyschnúť a po zabalení do špeciálneho ochranného obalu so silikagélom (pohlcovačom vlhkosti) sa pošle priamo do centrály spoločnosti ATCC. Po cca 5 dňoch spoločnosť prostredníctvom e-mailu pošle pracovišku výsledky STR analýzy. Týmto spôsobom sa dá testovať aj originalita novovytvorenej bunkovej línie (pri vytváraní nových bunkových línií môže tiež dôjsť ku kontaminácii napr. komerčne dostupnou líniou).

*Poznámka:* Zaujímavosťou je rôzna kombinácia tzv. *core loci* segmentov, ktoré používajú rôzne spoločnosti resp. krajiny na STR analýzy. Napríklad v Nemecku sú *core loci* reprezentované FGA, TH01, SE33, VWA, D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11 a Amelogenínom. Interpol používa sadu týchto *core loci*: FGA, TH01, VWA, D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11 (Amelogenínom je voliteľný a SE33 chýba, zdroj: <https://strbase.nist.gov/coreSTRs.htm>.)

Kontaminácia ľudských bunkových línií bunkami rôznych živočíšnych druhov je častá napríklad v experimentoch v oblasti regeneratívnej medicíny. Práve v tejto oblasti dochádza vo výskume k použitiu myších embryonálnych fibroblastov - tzv. MEF (*mouse embryonic fibroblasts*), ktoré majú vyživovaciu funkciu a sekréciami produktami pomáhajú udržať nediferencovaný stav skúmaných kmeňových buniek (Obr.3E-G). Výrobcovia v snahe predísť kontaminácii kultúry bunkami ponúkajú tieto bunky vo forme neproliferujúcich (gama žiarením inaktivovaných (ožiarených) alebo špeciálnym cytostatikom ošetrovaných) buniek. Takto ošetrované bunky sa z kultúry po niekoľkých pasážach vytratia a nie sú naďalej v kultúre detekovateľné. Mnoho pracovísk si však MEF bunky pripravuje v rámci vlastných experimentov, pričom však nie vždy dôjde k dôkladnej mitotickej inaktivácii pomocou zvolených protokolov. To má za následok prítomnosť kontaminujúcich, kontinuálne sa deliacich myších fibroblastov v kultúre ľudských kmeňových buniek. Na zistenie prítomnosti kontaminujúcich buniek, pochádzajúcich z iných živočíšnych druhov sa používajú metódy karyotypovej analýzy (rozdielne druhy majú rozdielne počty chromozómov), PCR metódami a tzv. izoenzymovou analýzou. Izoenzymová analýza je založená na prítomnosti viacerých foriem enzýmu (katalyzujúceho rovnakú reakciu) v rôznych živočíšnych druhoch.

Pomocou tejto finančne nenáročnej metódy je možné zmeny v primárnej štruktúre izoenzýmov detekovať ako zmeny v ich mobilite v elektrickom poli (pri elektroforetickej separácii). Podobne ako v prípade STR analýzy je možné aj izoenzýmovú analýzu realizovať formou objednanej služby vo viacerých spoločnostiach.

## 5 Manipulácia hladiny génovej expresie v bunkách

Pri hľadaní biologickej funkcie génov resp. proteínov, ktoré sú kódované týmito génmi sa používajú viaceré metódy génového inžinierstva, realizované v *in vitro* ako aj v *in vivo* podmienkach. Tieto metódy sú založené na dvoch základných princípoch štúdia - i) na znížení expresie a ii) na zvýšení expresie génu s následným efektom na úrovni kódovaného proteínu. Tzv. *rescue experimenty* sú založené na opätovnom obnovení alebo zvýšení hladiny predtým inaktivovaného (alebo mutovaného) génu a popisom efektu takéhoto experimentu (Morita et al., 2012).

Zvýšenie expresie génu a s tým spojené zvýšenie koncentrácie efektorového proteínu v bunke je možné dosiahnuť viacerými spôsobmi - i) transfekciou pomocou plazmidu (Obr.3, Obr.13 a Obr.16) a ii) transdukciou pomocou virálneho vektora (Obr.14 a Obr.15), ktorý obsahuje žiadanú génovú sekvenciu. Výber metódy je závislý od samotnej povahy experimentu – napríklad pri *in vivo* testovaní bunkovej línie je zväčša potrebný transdukčný prístup prenosu génu, pri ktorom dôjde k zabudovaniu prenášanej sekvencie do genómu bunky. Nadexpresia génov pomocou transfekcie plazmidu je vhodná skôr pre krátkodobé *in vitro* experimenty, keďže mitotickou aktivitou buniek dôjde k „nariedeniu“ vektora a strate efektu dočasne zvýšenej expresie (*transient expression*).

Pri znižovaní génovej expresie sa používajú metódy založené na objave tzv. interferujúcej RNA (*RNAi*). Veľký praktický význam vo výskumných laboratóriách majú dva základné typy molekúl - siRNA a shRNA. V prvom prípade siRNA interferencie ide o použitie chemicky syntetizovanej dvojvláknovej molekuly, v prípade shRNA (Obr.17) je to tzv. *short hairpin* RNA, ktorej syntéza prebieha v jadre po prenesení shRNA-kódujúcim DNA vektorom do bunky (Rao et al., 2009). siRNA a shRNA pre konkrétne gény je možné získať napr. vo firme *Sigma-Aldrich* alebo *Thermo Fisher Scientific*.

Pri siRNA alebo shRNA experimentoch je potrebné použitie negatívnych kontrol. Veľmi častou negatívnou kontrolou, ktorá zachováva aj stechiometriu inhibičnej reakcie je tzv. *scrambled RNA*. Je tvorená molekulou RNA s rovnakým zložením, ale nie poradím sekvencie nukleotidov, takže neinhibuje žiadnu známu mRNA. Zároveň však umožňuje detekovať nepredvídateľné tzv. *off-target* efekty molekúl takýchto RNA.

*Príklad z praxe:* Pri štúdiu funkcie proteínu PEAK-1 (atypickej kinázy) v indukovaných pluripotentných kmeňových bunkách sa použila komerčne dostupná kontrolná (*scrambled*) RNA. Pri porovnávaní hladiny proteínov (Yamanakových transkripčných faktorov) medzi kontrolnými bunkami a bunkami transdukovanými s shPEAK-1 sa zistilo, že „kontrolná“ RNA veľmi signifikantne znižovala hladinu dvoch zo štyroch týchto proteínov. Išlo teda o *off-target* efekt. Vzhľadom na veľké množstvo experimentov, spojených s použitím Yamanaka faktorov v rámci celého sveta išlo teda o veľmi závažný fakt. Naše pracovisko kontaktovalo výrobcu a distribútora dodávanej shRNA a upozornilo ich na zistené skutočnosti (zástupcovia technickej podpory firmy prisľúbili skoré riešenie daného problému). Na tento fenomén boli upozornení aj ostatní pracovníci univerzity.

## 5.1 Transdukcia génov do bunky pomocou virálnych vektorov

Transdukcia je proces prenosu génu resp. génov do bunky pomocou virálneho vektora (vírusu). Využíva prirodzené schopnosti vírusov prenášať genetickú informáciu pri infekcii bunky. Niektoré virálne vektory (retrovírusy) sú schopné infikovať len deliace sa (mitotické) bunky, niektoré (lentivírusy) aj nedeliace sa bunky (*Bouard et al., 2009; Sohn et al., 2017*). Na základe schopnosti integrovať (zabudovať) prenášanú genetickú informáciu do genómu hostiteľskej bunky delíme virálne vektory na i) *integrujúce* a ii) *neintegrujúce* vektory. Medzi integrujúce vektory patria lentivirálne a retrovirálne vírusy, medzi neintegrujúce patria napr. Sendai vírus a adenovírusy (*Athanasopoulos et al., 2017*). Virálna transdukcia sa vyznačuje vysokou efektívnosťou, jej nevýhodou však ostáva pomerne vysoká cena vektorov, problémy spojené so vznikom inzerčnej mutácie a riziková práca s týmito vektormi. Po transdukcii integrujúcimi vektormi totiž často dochádza k vzniku klonov buniek, ktoré sa vyznačujú nekontrolovateľným delením. Virálne vektory na transdukcii buniek je možné si vyrobiť, ale výhodnejšie je zakúpenie už pripravených vírusov (vo forme mrazeného alikvotu, s uvedením tzv. *titra vírusu* (titer vírusu je uvedenie najmenšieho riedenia

vírusu, ktoré je ešte schopné infikovať bunky alebo počet plakov (*plaques*) v kultúre infikovaných buniek). Počet molekúl niektorých proteínov na povrchu vírusu je niekedy známy, čo sa dá využiť na kvantifikáciu vírusov pomocou ELISA metódy alebo prietokovou cytometriou (príkladom je virálny kapsidový proteín p24, prítomný na povrchu lentivírusov v počte 2000 molekúl/vírus, čo umožňuje kvantitatívne stanovenie ELISA metódou). Niekedy sa preto možno stretnúť aj s komerčne dostupnými vírusmi, ktoré majú uvedený počet viriónových častíc v danom objeme pufru. Ďalšou číselnou hodnotou, s ktorou je možné sa stretnúť pri vírusoch je hodnota MOI (*Multiplicity of Infection*). Táto hodnota predstavuje pomer počtu viriónov a buniek v definovanom objeme. Zároveň je vyjadrením percentuálneho zastúpenia buniek, transdukovaných aspoň jednou virálnou časticou. Napríklad pri hodnote MOI = 2,0 je percentuálna zastúpenie buniek, transdukovaných aspoň jedným viriónom = 86,5%, pri MOI = 8 je to už takmer 100% (Zhang et al., 2004).

*Príklad z praxe:* Pri štúdiu schopnosti ľudských iPSc-derivovaných neurálnych prekursorov diferencovať do neurónov sa mitoticky aktívne neurálne prekursor transdukovali reportérovým lentivirálnym vektorom (vírusom), označným ako SYN1-GFP lentivírus (Obr.15). Tento dokáže pod kontrolou ľudského synapsínového promotora (*SYN1*) exprimovať zelený fluorescenčný proteín (GFP). V praxi to znamená, že pokiaľ bunky diferencujú do neurónov, prejaví sa to prítomnosťou (alebo expresiou) zeleného fluorescenčného proteínu a signálu. Tento signál je potom možné zaznamenať fluorescenčným mikroskopom alebo kvantitatívne hodnotiť prietokovou cytometriou.

Bunky sa v spomínanom experimente transdukovali optimalizovaným protokolom, ktorý sa ukázal efektívnejší, ako štandardne používané postupy. V tomto protokole sa (na rozdiel od spomínaných štandardných protokolov, pri ktorých sa transdukcia realizuje jednoduchým pridaním roztoku s obsahom vírusov do kultivačného média na dobu 12 až 24 hodín) sa najprv trypsinizáciou kultúry pripravila jednobunková suspenzia, ktorá sa následne 2x premyla centrifugáciou (300 x g, 3 min., lab.teplota) so sterilným roztokom PBS. Následne sa odsal supernatant a pridal sa PBS pufor s obsahom látky, zvyšujúcej efektivitu transdukcie (*transduction enhancer*, komerčne dostupný napr. pod menom *SureEntry* (Qiagen, Germany) alebo *Viral Entry Transduction Enhancer* (ABM, USA). Bunky sa opätovne sцентриfugovali a supernatant sa odsal, pričom sa nad peletom buniek ponechalo cca 200 µL roztoku PBS

s *SureEntry* alebo *Viral Entry* reagentom. Pelet sa pipetou (1mL) jemne rozsuspendoval a k suspenzii sa pridal roztok vírusu. Keďže citlivosť rôznych typov buniek na transdukciu je rôzna, pripravili sa tri suspenzie buniek. K jednej sa pridalo 10  $\mu$ L vírusu, k druhej 30  $\mu$ L vírusu a k tretej 50  $\mu$ L vírusu (hodnota titru pre tento vírus bola  $1 \times 10^7$  IFU/mL). Skúmavky so zmesou buniek a vírusu sa jemne uzavreli tak, aby bola možná výmena plynov (použitím 15 mL Falconovej skúmavky, pričom sa vrchnák skúmavky neuzavrel úplne) a preniesli na 1 hodinu do bunkového inkubátora (37°C, 100% vlhkosť, 5% CO<sub>2</sub>). Po hodinovej inkubácii sa bunky s vírusom centrifugovali po dobu 5 minút (300 x g, RT), supernatant sa jemne odsal a vylial do odpadovej fľaše s obsahom 10% chlórnanu sodného (napr. SAVO) a pelet s dostatočným množstvom bunkového média preniesol do kultivačných platničiek. Pri ťažšie transdukovateľných bunkách (niektoré kmeňové a nádorové bunky) je možné tento krok vynechať a po hodinovej inkubácii roztok buniek a vírusu priamo zaliať bunkovým médiom a preniesť do kultivačnej Petriho misky alebo 6-jamkovej prípadne 24-jamkovej kultivačnej platničky na ďalšiu, 24 hodinovú inkubáciu. Po 24 hodinách po transdukcii sa vymenilo bunkové médium a pridalo sa tzv. diferenciálne médium (médium, stimulujúce diferenciáciu do neurónov, astrocytov a gliálnych buniek). Po cca 14 dňoch bolo možné pozorovať prvé bunky (neuróny), ktoré exprimovali GFP (Obr. 15).

Experimenty s lentivirálnymi, retrovirálnymi a inými vírusovými vektormi prebiehajú v tzv. BSL-2 podmienkach, v laminárnom boxe so vzduchom, cirkulujúcim v systéme HEPA filtrov (Obr. 35A). Pipety, špičky a plastové nádoby, ktoré prišli do styku s vírusom musia byť dezinfikované 10% roztokom chlórnanu sodného, prípadne autoklávané v špeciálnych plastových vreciach (*biohazard bags*). Vrecia, určené na autoklávanie takéhoto odpadu majú na sebe špeciálny systém indikácie toho, že boli autoklávané (napr. zmenou farby indikačného miesta na povrchu alebo objavením sa nápisu po sterilizácii).

*Poznámka:* Aj keď sú komerčne dostupné vírusy z bezpečnostných dôvodov metódami génového inžinierstva pripravené tak, aby sa nereplikovali, treba si uvedomiť, že žiadny vírus nemožno považovať za úplne bezpečný. Pri práci s lentivirálnymi, retrovirálnymi a inými virálnymi vektormi musí mať experimentátor oblečený (najlepšie jednorázový) laboratórny plášť, mať na rukách špeciálne plastové ochranné rukávy (dajú sa nahradiť aj igelitovými vreckami pozdĺžneho tvaru), na očiach

ochranné okuliare alebo ochranný štít na tvár a na ústach respirátor. V laboratóriu, kde sa pracuje s vírusovými vektormi musí byť dostupná očná sprcha (existujú aj jej prenosné a opakovane naplniteľné verzie, v ktorých sa voda na opláchnutie očí udržiava pod určitým tlakom v špeciálnej tlakovej nádobe. Jej výhodou je, že si ju užívateľ môže podľa potreby umiestniť kdekoľvek v rámci laboratória, pretože nie je viazaná na zdroj vody).

*Príklad z praxe:* Je paradoxom, že ani pri dodržiavaní všetkých zásad bezpečnosti sa pracovník niekedy nevyhne extrémne raritným, ale reálnym situáciám. Autor bol priamym svedkom expozície človeka lentivirálnym vektorom – po transdukčnom experimente chcel študent inaktivovať zvyšky vírusu v pipete nasatím roztoku chlórnanu sodného zo zásobnej kadičky. Koniec pipety pri tomto kroku jemne zavadil o kraj kadinky, pričom došlo k vymršteniu kvapky roztoku s vírusom mimo priestor laminárneho boxu. Aj keď to znie neuveriteľne, letiaca kvapka si našla cestu ponad ochranný štít a dokonca okuliare študenta a zasiahla ho do oka. Okamžite bola použitá očná sprcha na vypláchnutie očí. Našťastie sa situácia skončila iba niekoľko hodín trvajúcim pocitom podráždenia v oku.

Podobný prípad nastal na rovnakom pracovisku pri injikovaní mozgu (resp. striata) vysoko koncentrovaným roztokom vírusu, ktorý kodoval mutovaný ľudský gén (tento experiment bol realizovaný s cieľom vytvorenia chronického modelu Huntingtonovej choroby na potkanoch). Pracovník (zahraničný študent medicíny) si pri manipulácii s injektorom nevšimol extrémne tenkú ihlu a doslova si ju „zarazil“ do chrbta ruky. V ihle bol prítomný roztok koncentrovaného vírusu. Mierne krvácajúca rana sa vymyla väčším množstvom vody a postihnutý podstúpil preventívnu liečbu antivirotikami.

V laminárnom boxe triedy BSL-2 (Obr.36A) musí byť pri práci s vírusmi k dispozícii nádoba (osvedčili sa prázdne plastové fľaše od médií, napr. tzv. Gibco fľaša, (Obr.7) s čerstvo pripraveným 10% roztokom chlórnanu sodného (je vhodné nepoužívať roztok starší ako 1 deň, pretože stráca účinnosť). V tomto roztoku sa likvidujú prázdne skúmavky od vírusu, špičky použité na alikvotovanie alebo miešanie roztoku s vírusom a mikroskúmavky. Sérologické pipety s objemom 5-25 mL sterilizujeme niekoľkonásobným nasatím a vytlačením dezinfekčného roztoku a umiestnením takto vysterilizovanej pipety späť do pôvodného plastového obalu. Samozrejmosťou v laminárnom boxe by mal byť rozprašovač s obsahom 70% alebo 80% etanolu. Pokiaľ je v laminárnom boxe prítomná vákuová odsávačka, tak by jej zásobná fľaša mala tiež

obsahovať chlórnan sodný a vstup vákua do fľaše by mal byť vedený cez bezpečnostný filter (*Millipore*).

Niektoré virálne vektory obsahujú v sebe gén rezistencie voči antibiotikám (napr. puromycínu). Tento gén umožňuje cca 48-72 hodín po transdukcii tzv. selekciu klonov buniek, ktoré boli transdukované. V prítomnosti puromycínu (alebo iného antibiotika) väčšina buniek, ktoré neboli transdukované (a teda neobsahujú virálny plazmid s génom pre rezistenciu) zahynie. Takto je možné po niekoľkých dňoch získať čistú populáciu transdukovaných buniek. Následne je možné overiť účinnosť transdukcie pomocou PCR metódy, imunocytochemicky alebo pomocou Western blot metódy. Rovnako tak v prípade použitia virálneho vektora na zvýšenie hladiny proteínu v bunkách (*over-expression*) alebo prenos a expresiu shRNA (*short hairpin*) RNA, v dôsledku pôsobenia ktorej dôjde k poklesu hladiny vybraného proteínu, je možné tento pokles analyzovať na úrovni proteínu pomocou imunocytochémie alebo Western blotu. Kontrolnou vzorkou v oboch prípadoch sú bunky, transdukované „prázdny“ virálnym vektorom. V prípade shRNA kódujúcich vírusov je kontrolou vírus, kódujúci shRNA (tzv. *scrambled sequence*), ktorá nespôsobí silencing žiadneho známeho génu v bunke. Editori kvalitných vedeckých časopisov zväčša vyžadujú od autorov štúdií overenie shRNA efektu dvoma nezávislými shRNA vektormi.

Virálnu transdukciiu je možné využiť aj pri tzv. imortalizácii buniek. Imortalizáciou sa rozumie navodenie stavu, pri ktorom už nedochádza k aplikácii tzv. *Hayflickovho limitu*. Ten postuluje, že každá bunka má schopnosť iba obmedzeného počtu replikácií a neskôr dôjde do stavu tzv. *senescencie*. Transdukciou špecifických génov (napr. virálnych génov inaktivujúcich nádorové supresorové gény, génu kódujúceho enzým hTERT, SV40 Tag a pod.) do genómu bunky je možné doceliť „nesmrteľnosť“ buniek podobne ako je tomu v prípade nádorových buniek. Imortalizácia má zmysel a význam najmä v prípadoch ťažko kultivovateľných alebo izolovateľných buniek, ktoré majú esenciálnu úlohu pri vybraných experimentoch. V každom prípade však ide o nefyziologický stav bunky a pokiaľ je to možné (napr. náhradou iným modelovým systémom), je lepšie sa takýmto bunkám v experimentoch vyhnúť.

## **5.2 Transfekcia génov do bunky**

Transfer génov, kódujúcich proteíny alebo transfer interferujúcich RNA molekúl je možný aj bez použitia virálnych vektorov a bez nutnosti pracovať v BSL-2

podmienkach. Prenos génových fragmentov, RNA molekúl alebo plazmidov bez virálneho vektora sa nazýva transfekcia. Efekt takéhoto transferu (bez integrácie do genómu hostiteľskej bunky) je síce krátkodobý (aj keď vo výnimočných prípadoch môže nastať aj integrácia do genómu), ale pre mnohé typy experimentov postačujúci a finančne značne menej náročný oproti experimentom s virálnymi vektormi. Pri transfekcii sa pomocou špeciálnych lipidových molekúl vytvárajú tukové kvapôčky alebo tzv. micely, ktoré do seba naviažu prenášané molekuly a ktoré po splynutí s bunkovou membránou tieto gény prenesú do bunky. Existuje viacero typov transfekcie, ktoré delíme na základe transferu génov pomocou fyzikálnych, chemických alebo iných faktorov. Najčastejšie používané formy transfekcie sú i) transfekcia pomocou lipozomálnych častíc, ii) transfekcia pomocou elektrického poľa (elektroporácia) a iii) transfekcia pomocou nanočastíc s naviazanými molekulami, ktoré „bombardovaním“ bunky tieto molekuly prenesú do bunky.

## **6 Použitie chemických inhibítorov pri inaktivácii proteínov**

Použitie chemických inhibítorov na znefunkčnenie vybraných proteínov v bunkách (*Cabral-Pacheco et al., 2020*) alebo na inhibíciu proteín-proteínovej interakcie (*Ran et al., 2018*) je čoraz častejšie používaný postup štúdia úlohy proteínov v signálnych dráhach. Dnes sú komerčne dostupné mnohé inhibítory proteínov a firmy dokonca ponúkajú aj výrobu inhibítorov na mieru. Ako príklad je možné uviesť ROCK inhibítor (inhibíciou *Rho* kinázy zlúčeninou Y-27632 dochádza k inhibícii ROCK signálnej dráhy), ktorý sa v oblasti bunkových kultúr v regeneratívnej medicíne používa na prevenciu zvýšenej mortality buniek, ktorá súvisí s disociáciou iPSc kolónií na samostatné bunky (*single cells*), napríklad pri kryoprezervácii buniek (tento fenomén je známy pod názvom *anoikis* a dá sa voľne popísať ako typ bunkovej smrti pri bunkách, ktoré sú citlivé na stratu kontaktu, či ukotvenia k extracelulárnej matrixi).

## **7 Sterilizácia**

### **7.1 Sterilizácia roztokov a pracovných pomôcok**

V laboratóriu bunkových kultúr je potrebné pracovať so sterilnými roztokmi, pracovnými nástrojmi a skúmavkami. Akékoľvek použitie nesterilného nástroja alebo skúmavky môže viesť ku kontaminácii a následnému znehodnoteniu kultivovaných buniek. Laboratórny plast, používaný pri práci s bunkami musí byť sterilný alebo aspoň



sterilizovateľný v klasických parných sterilizátoroch. Nákup sterilného materiálu je elegantným riešením, ale treba si uvedomiť, že po otvorení obalu materiál sterilné vlastnosti stráca. V niektorých laboratóriách sa sterilné skúmavky (napr. tzv. „Eppendorfký“) po otvorení obalu v laminárnom boxe rozdelia do viacerých sterilných obalov, z ktorých sa následne jednorázovo použijú. Iné laboratória po otvorení sterilný materiál (napr. skúmavky) uskladňujú priamo v laminárnom boxe, aby došlo k zachovaniu sterility. Druhú možnosť však nemožno veľmi odporúčať z viacerých dôvodov – sterilný materiál, uskladnený v laminárnom boxe jednak zaberá miesto, bráni UV sterilizácii celého priestoru a účinkom UV žiarenia môže dôjsť k jeho degradácii a strate niektorých jeho vlastností. Preto je najlepšie sterilný materiál rozdeliť do viacerých sterilných plastových nádob alebo kontajnerov a zreteľne označiť a takto označený materiál následne uskladňovať mimo priestor laminárneho boxu. Pri používaní materiálu viacerými pracovníkmi je dobrou praxou v pravidelných intervaloch materiál v plastovom kontajneri opätovne re-sterilizovať.

V laboratóriu sa používajú špeciálne parné sterilizátory, v ktorých dochádza k sterilizácii materiálu pri teplotách 121-134°C, v prostredí nasýtenej pary (Obr.36E). Sterilizácia nasýtenou parou účinne eliminuje všetky mikroorganizmy spolu so spórmi. Sterilizovať je možné aj roztoky (na ich sterilizáciu sú určené osobitné programy), pri ich sterilizácii však fľaše nenapĺňame až po okraj a uzávery zatvárame tak, aby bol umožnený únik pary (inak môže dôjsť k roztrhnutiu fľaše a vyliatiu obsahu do priestoru sterilizátora). Uzávery fliaš uzatvoríme na doraz až po ukončení cyklu. Plastový materiál alebo nástroje sterilizujeme v špeciálnych sterilizačných vreckách, ktoré sa otvárajú až pri použití sterilného nástroja (obsahujú aj indikátor sterilizácie, ktorý zmení farbu po sterilizačnom cykle).

## **7.2 Sterilizácia roztokov biologicky aktívnych látok**

Niektoré biologicky aktívne látky sú dodávané vo forme nesterilných roztokov. Roztoky s obsahom takýchto biologicky aktívnych látok (rastových faktorov, vitamínov, cytokínov a iných proteínov) nie je možné sterilizovať v parnom sterilizátore (pri vysokej teplote dôjde k denaturácii proteínových molekúl a ich inaktivácii alebo k zničeniu neproteínových zložiek). Pre prácu s bunkovými kultúrami je však nutné takéto roztoky sterilizovať a to za pomoci špeciálnych jednorázových sterilizačných filtrov (0,45µm a 0,22µm) dodávaných najmä firmou *Millipore*. Filtre možno použiť aj

na sterilizáciu bunkového média. Treba si ale uvedomiť, že tieto typy filtrov nie sú schopné eliminovať mykoplasmu zo sterilizovaných (filtrovaných) roztokov!

## **8 Alikvotovanie roztokov protilátok a citlivých rastových faktorov**

Alikvotovanie je rozdelenie zásobného roztoku do menších objemov najmä za účelom zabránenia opakovaného rozmrazenia a zmrazenia citlivých, biologicky aktívnych molekúl (napríklad protilátok a rastových faktorov). Opakované rozmrazovanie a zmrazovanie takýchto molekúl totiž môže viesť k strate ich biologickej aktivity (rastové faktory) alebo detekčnej účinnosti (protilátky). Alikvotovanie rastových faktorov je dôležité aj z dôvodu prevencie prenosu kontaminácie medzi jednotlivými pracovníkmi bunkového laboratória. Alikvot rastového faktora by mal byť v ideálnom prípade použiteľný jednorázovo (napr. na 50 mL média) alebo použitý len jedným pracovníkom. Väčšina výrobcov na sprievodnom produktovom dokumente (*datasheet*) udáva odporúčané limitné (najmenšie) koncentrácie rastových faktorov na ich alikvotovanie a následné uskladnenie. Stabilita väčšiny biologicky aktívnych proteínových molekúl totiž klesá s klesajúcou koncentráciou, v ktorej boli zamrazené. Preto sa odporúča mraziť rastové faktory vo vyššej koncentrácii (rádovo stovky mikrogramov) a v prítomnosti stabilizačného proteínu (napr. *BSA*, *bovine serum albumin*). Citlivé rastové faktory sa zväčša mrazia pri  $-20^{\circ}\text{C}$  alebo pri  $-80^{\circ}\text{C}$ , v objemoch min. 10  $\mu\text{L}$  (menšie alikvoty sa môžu rozmraziť už pri niekoľkosekundovej manipulácii s krabičkou mimo mraziace zariadenie, resp. pri dlhšie otvorených dverách mrazničky). Dôležitá je aj forma manipulácie s alikvotmi, ktoré majú byť v mrazničke dobre označené a rýchlo prístupné, aby pri „archeologickom výskume“ mrazničky, pri zle označených krabičkách a alikvotoch nedochádzalo k ich opakovanému rozmrazovaniu.

Protilátky na imunodetekčné analýzy sa uskladňujú podľa odporúčaní jednotlivých výrobcov. Napríklad protilátky na prietokovú cytometriu (konjugované s fluorescenčnými molekulami) sa uskladňujú pri  $4^{\circ}\text{C}$  v chladničke, chránené pred svetlom. Primárne (nekonjugované) protilátky na Western blotovú analýzu sa môžu uskladniť aj pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Niektorí výrobcovia ponúkajú protilátky vo formáte roztoku s glycerolom, ktorý zabráni zmrazeniu protilátky pri  $-20^{\circ}\text{C}$  (protilátka je vďaka glycerolu permanentne v tekutom stave, okamžite pripravená na použitie). Takto pripravené protilátky sa nealikvotujú na menšie objemy, ale priamo používajú z originálneho

obalu. Sekundárne protilátky, konjugované s fluorescenčnou farbičkou a určené na imunofluorescenčnú detekciu sa môžu po dodaní do laboratória uskladniť pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ak boli dodané zmrazené na suchom ľade), ale po prvom rozmrazení sa už väčšinou uskladňujú pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Aj pri nich platí, že je potrebné ich chrániť pred priamym slnečným svetlom a uchovávať ich v tmavých krabičkách.

Pokiaľ protilátka obsahuje konzervačnú látku (napr. *azid sodný*), je možné ju alikvotovať na laboratórnom stole. Pokiaľ konzervačnú látku neobsahuje, je lepšie alikvoty pripravovať v sterilných podmienkach laminárneho boxu (*Obr.36A*).

Aj keď je to veľmi nepravdepodobné, roztoky obsahujúce toxický azid sodný sa nesmú vylievať do umývadiel s kovovými armatúrami, pretože teoreticky hrozí akumulácia výbušných foriem zlúčenín tejto látky s kovovými časťami vodovodného potrubia. Pre zaujímavosť - azid sodný sa používa aj ako aktívna látka v bezpečnostných systémoch auta – pri náraze auta špeciálna kapsula s azidom sodným exploduje a v tisícinie sekundy nafúkne airbag na volante vodiča.

## **9 Metódy *in vitro* charakterizácie buniek**

### **9.1 Karyotypová analýza (určenie karyotypu)**

Karyotypová analýza (*Obr.19*) slúži na určenie počtu chromozómov v jadre a prípadných chromozómových aberácií v kultivovaných bunkách. Výskyt chromozómových aberácií v bunkových kultúrach nie je totiž zriedkavý (*Obr.19*) a karyotypová analýza by mala byť súčasťou štandardného a rutinného protokolu na overenie kvality buniek najmä v prípadoch terapeuticky použiteľných buniek. Výskyt aberácií v bunkovej kultúre, ktorý prekročí určité povolené hodnoty frekvencie môže byť impulzom k vyradeniu bunkovej kultúry z experimentu.

Samotný protokol karyotypovej analýzy - aj keď nie je experimentálne zložitý – si vyžaduje značné množstvo expertízy a skúseností. Moderné prístrojové a softvérové vybavenie laboratórií, v ktorých sa rutinne realizuje karyotypová analýza (sú nimi napr. Ústavy lekárskej genetiky) je tiež veľmi finančne náročné. Pre výskumné laboratória je preto jednoduchšie po dohode využiť služby pracovísk, zaoberajúce sa danou metodikou (tzv. *outsourcing*).

## 9.2 Imunofluorescenčná analýza expresie proteínov

Expresia povrchových alebo intracelulárnych (vnútrobunkových) proteínov sa zvyčajne stanovuje pomocou imunocytochémie alebo prietokovej cytometrie. Výber metodiky je závislý na dostupnosti potrebnej technológie na pracovisku. Imunocytochemická detekcia je technologicky a aj finančne menej náročná a umožňuje detekovať proteín v náväznosti s jeho anatomickou lokalizáciou v bunke. Prietoková cytometria naproti tomu umožňuje rýchle a kvantitatívne stanovenie expresie proteínov v bunkách, pripravených vo forme suspenzie.

## 9.3 Imunocytochémia

Imunocytochemické stanovenie expresie proteínov v bunkách (*Obr.20*) sa väčšinou realizuje na fixovaných bunkách, aj keď existujú výnimky (napr. značenie živých buniek v kultúre (nie v suspenzii) pomocou protilátok na povrchové CD markery). Medzi najbežnejšie fixatíva patrí etanol, metanol, acetón a paraformaldehyd (PFA). Pravdepodobne najčastejšie používaným fixatívom je paraformaldehyd v oblasti koncentrácie 4-10%. Paraformaldehyd umožňuje šetrnú fixáciu bez poškodenia buniek, pokiaľ sa dodrží odporúčaný čas fixácie (5-10 minút). Kultivované bunky sa (po odsatí kultivačného média) pred fixáciou opláchnu sterilným roztokom PBS (pH=7,4) a fixujú napríklad pomocou 4% PFA po dobu 10 minút. Bunky sa následne opláchnu roztokom PBS a pridá sa blokačný roztok. Blokačný roztok obsahuje sérum z rovnakého živočíšneho druhu, z akého pochádza sekundárna, fluorescenčne značená protilátka. Sérové proteíny blokačného roztoku sa naviažu na povrchové receptory buniek, zodpovedné za nešpecifickú väzbu protilátok pri imunodetekčnom stanovení (dôjde k tzv. nasýteniu nešpecifických receptorov). Samotná blokácia trvá 45-60 minút, pri laboratórnej teplote. Po blokácii sa roztok odsaje a pridá sa zmes blokačného roztoku s primárnou protilátkou. Riedenie primárnej protilátky je väčšinou doporučené výrobcom a je možné ho nájsť v sprievodnom dokumente (*datasheet*). Napriek tomu je takmer vždy nevyhnutná určitá optimalizácia koncentrácie protilátky na zvolený modelový systém (bunky). Príliš vysoká a neoptimálna koncentrácia primárnej protilátky sa prejaví vysokým nešpecifickým signálom a zlou kvalitou imuno značenia.

Inkubácia s primárnou protilátkou najčastejšie prebieha pri teplote 4°C (v chladničke) a cez noc, ale je možná aj rýchlejšia, hodinová inkubácia pri laboratórnej teplote (táto

je však menej optimálna z dôvodu vyššieho nešpecifického signálu). Po inkubácii sa roztok primárnej protilátky trikrát premyje pomocou PBS (7,4%) s obsahom 0,3% Triton-X100 detergentu (medzi každým premytím na roztok necháva cca 5-10 minút pôsobiť („*soaking time*“) a následne sa pridá roztok sekundárnej protilátky (zriedenej v blokačnom roztoku s obsahom 0,3% Triton-X100 detergentu). Sekundárna protilátka rozpoznáva primárnu protilátku ako antigén. Ak je napríklad primárnou protilátkou protilátka *Mouse anti Oct-4 (IgG1 izotyp)*, sekundárna protilátka bude napr. *Rabbit anti Mouse IgG Alexa Fluor 488*. Sekundárna protilátka je značená v tomto prípade s Alexa Fluor 488 fluorescenčnou farbičkou, ktorá má tzv. excitačné maximum v oblasti vlnových dĺžok okolo 490 nm a tzv. emisné maximum v okolí 525 nm. Inkubácia sekundárnej protilátky prebieha pri laboratórnej teplote po dobu 1 hodiny, ale je možné ju nahradiť inkubáciou „cez noc“ pri teplote 4°C (v chladničke). Po inkubácii sa roztok sekundárnej protilátky opäť trikrát premyje s PBS (pH=7,4) s obsahom 0,3% Triton-X100 detergentu (premyvací roztok sa necháva pôsobiť cca 5-10 minút). Následne sa pridá roztok PBS alebo destilovanej vody s obsahom DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol, finálna koncentrácia cca 1 µg/mL) a nechá sa inkubovať 10-30 minút pri laboratórnej teplote. DAPI sa naviaže na DNA (na oblasti bohaté na A a T), čím dochádza k vizualizácii jadra bunky touto fluorescenčnou zlúčeninou. Toto značenie zároveň umožňuje anatomické potvrdenie expresie jadrových proteínov (DAPI značenie bude ko-lokalizované so signálom jadrového proteínu, Obr.20). Po odsatí roztoku s obsahom DAPI a pridaní malého množstva destilovanej vody alebo PBS je možné bunky ihneď vizualizovať pomocou fluorescenčného mikroskopu alebo sa bunky môžu konzervovať pomocou tzv. montovacieho média (*mounting media*). Toto médium sa po odsatí tekutiny z buniek aplikuje v jednej kvapke a bunky sa opatrne prekryjú krycím sklíčkom. Takto ošetrovaný preparát je stabilný niekoľko týždňov až mesiacov.

Kvalita záberov alebo obrázkov, získaných pomocou fluorescenčného mikroskopu je priamo úmerná kvalite protilátok, ich optimálnej koncentrácii, blokácii nešpecifických Fc receptorov a v neposlednom rade výberu materiálu, na ktorom bunky fixujeme a označujeme. V praxi môžu nastať dva prípady – bunky sú pestované na štandardných plastových kultivačných platničkách (6-jamkové, 12-jamkové, 24 a 48-jamkové alebo 96-jamkové) a na týchto jamkách prebieha aj cytochemické značenie. Plast (priehľadný polystyrén) je veľmi dobrým podkladovým materiálom pre rast buniek, na druhej strane však nemá optimálne optické vlastnosti. Oveľa lepším

materiálom z hľadiska fluorescenčného zobrazovania je sklo. Problémom ale zostáva fakt, že väčšina typov buniek na skle nerastie dobre alebo vôbec a povrch skla je nutné pred kultiváciou buniek pokryť roztokom rôznych proteínov napr. želatíny, laminínu alebo Matrigelu - zmesi extracelulárnych matrixových proteínov, vyrobenej z myšacích nádorov (sarkómov). Snímky, získané z preparátu buniek pestovaných na sklenenom povrchu sú rádovo kvalitnejšie oproti snímkam z imunocytochémie buniek, rastúcich na plastovom povrchu. Komerčne dostupné mikroskopické sklíčka majú známu hodnotu hrúbky a podľa tohto údaju je možné nastaviť (korigovať) aj objektív na mikroskope pomocou tzv. korekčného prstenca (*correction collar*) tak, aby výsledný obrázok bol v čo najlepšej kvalite - to znamená aby pomer medzi intenzitou špecifického signálu a pozadia (tzv. *background*) bol čo najväčší. Aj keď je určitá finálna úprava výsledného obrázku možná a akceptovaná, je vždy lepšie vsadiť na kvalitný experiment než na kvalitný grafický softvér. Najčastejšiou predpublikačnou úpravou obrázkov pri menej kvalitných fotografiách je zníženie intenzity pozadia (*background*). Pozor, táto operácia musí byť ale spojená so znížením intenzity pozitívneho signálu! Úprava obrázkov, pri ktorej dôjde k zvýšeniu intenzity špecifického signálu a zároveň k zníženiu intenzity pozadia nie je dovolená a editori vedeckých časopisov na to autorov upozorňujú už na webových stránkach časopisov v časti nazvanej zvyčajne ako *Instructions for authors* alebo *Submission guidelines*.

*Príklad z laboratórnej praxe:* Reprogramovaním kožných fibroblastov do indukovaných pluripotentných kmeňových buniek sa získali kolónie s typickou morfológiou. Tieto kolónie sa fixovali pomocou 4% PFA, blokovali pomocou 2% kozieho séra v PBS s 0,3% Triton X-100 detergentom a inkubovali s primárnou protilátkou, detekujúcou Nanog (pluripotentný faktor). Bola použitá protilátka: *Mouse anti human Oct-4 (IgG1 isotype)*. Ako sekundárna protilátka sa použila *Goat anti mouse IgG Alexa Fluor 488 conjugated antibody*. Na vizualizáciu jadier sa použilo DAPI. Na zobrazovanie sa použil fluorescenčný mikroskop Olympus IX-73 s naištalovaným softvérom *Cell Sense*. Úprava obrázkov (spojenie fluorescenčných kanálov, alebo tzv. *Merge channels*) bola realizovaná pomocou voľne dostupného softvéru s názvom *ImageJ*. Na výsledných obrázkoch je vidno zelený fluorescenčný signál, lokalizovaný v oblasti jadra (podľa signálu z DAPI), čím sa potvrdzuje jadrová lokalizácia tohto markeru pluripotencie (*Obr.20, Oct-4, štvrtý stĺpec*).

## 9.4 Použitie programu *ImageJ* pri spracovaní výsledkov z fluorescenčného mikroskopu

Program *ImageJ* je vhodný aj na spracovanie obrázkov z fluorescenčného mikroskopu. Aj keď už samotný softvér, ktorým sa ovláda mikroskop zväčša umožňuje viaceré analýzy a spojenie obrázkov z viacerých fluorescenčných kanálov, praktické skúsenosti hovoria v prospech ľahko a kedykoľvek dostupného softvéru vo vlastnom počítači. Nasledujúci príklad ilustruje použitie *ImageJ* softvéru na spojenie troch obrázkov, nahraných v troch rôznych fluorescenčných kanáloch, do jedného kompozitného obrázku v procese nazvanom „*channels merging*“.

*Príklad:* Pri imunofluorescenčnej analýze expresie transkripčných faktorov, použitých pri reprogramovaní kožných fibroblastov do indukovaných pluripotentných kmeňových buniek sa detekoval Oct-4 faktor pomocou protilátky, označenej pomocou PE. Cytoskelet bunky bol detekovaný pomocou faloidínu (*Phalloidin*), konjugovaného s FITC, bunkové jadrá sa detekovali pomocou DAPI fluorescenčnej sondy. Obrázky sa uložili vo formáte *tif*. Obrázky sa otvorili individuálne cez *File* a *Open* alebo naraz potiahnutím obrázka cez pracovnú lištu programu *ImageJ*. Obrázky sa konvertovali cez funkciu *Image, Type* a *8-bit*. Následne sa cez funkciu *Image, Color* a *Merge channels* spojili do jedného obrázka. Vo funkcii *Merge channels* sa otvorí tabuľka, v ktorej je možné navoliť žiadanú farbu pre jednotlivé súbory. Pred stlačením tlačidla *OK* musí byť vyznačené okienko s funkciou *Create composite*. Kontrast je možné upraviť cez funkciu *Image* a *Adjust*, pričom dovolená je len taká úprava, pri ktorej súčasne dochádza k zvýšeniu signálu zároveň so zvýšením signálu pozadia alebo k zníženiu pozadia (nešpecifického signálu) so súčasným znížením pozitívneho signálu (detekovaného proteínu).

*Poznámka:* Ako už bolo spomenuté vyššie v texte, úpravy obrázkov, ktorých výsledkom je zníženie pozadia (nešpecifického signálu) so súčasným zvýšením intenzity detekovaného signálu nie sú dovolené a môžu sa kvalifikovať ako nedovolená manipulácia obrázkov. Viaceré publikačné spoločnosti disponujú technológiou, ktorá je schopná takúto manipuláciu odhaliť alebo vyžadujú od autorov neprocesované (tzv. „surové“ (*raw*) dáta).

Kompozitový obrázok, pozostávajúci z dvoch, troch alebo viacerých jednotlivých kanálov je možné následne uložiť cez funkciu *File* a *Save as*.



### 9.4.1 Príprava kompozitových obrázkov v publikačnej kvalite

Prezentácia výsledkov vo forme obrázkov a grafov v procese publikácie vedeckej práce vyžaduje aspoň čiastočné znalosti práce s grafickými softvérmi. Tieto zároveň slúžia aj na prípravu schématických a ilustratívnych schém. Najčastejšie používanými softvérmi v tejto oblasti sú *PhotoShop*, *Adobe Illustrator* a *Corel Draw*. Na Internete je možné nájsť aj bezplatné programové balíky, ktoré dokážu väčšinou v plnej miere nahradiť komerčne dostupné produkty. Kompozitové obrázky (obrázky, zložené z viacerých obrázkov, grafov a schém) je však možné pripraviť aj pomocou ľahko dostupných programov ako *Power Point* a dokonca *Microsoft Paint*. Výhodou programu *Microsoft Paint* je jeho dostupnosť všade tam, kde je nainštalovaný operačný systém Windows. Nevýhodou je, že program si „nepamätá“ textové pole, vložené do obrázku a pri jeho prípadnej zmene je nutné text nanovo vložiť do obrázka. Príklad kompozitového obrázku, vytvoreného v programe *Paint* je na Obr.3. Kompozitný obrázok v publikačnej kvalite je teda možné vytvoriť aj v programe, dostupnom v každom osobnom počítači. Pred odoslaním publikácie, ktorej súčasťou sú aj obrázky, do recenzného konania je nutné pripraviť obrázky s dostatočným minimálnym rozlíšením. Hodnotu rozlíšenia udáva hodnota tzv. DPI (*dots per inch*) alebo počet bodov na palec (palec - dĺžková miera, cca 2,54 cm). Táto hodnota udáva počet zobraziteľných alebo (na tlačiarňach) vytlačiteľných bodov na jednotku dĺžky (1 palec alebo 2,54 cm). Čím je hodnota DPI vyššia, tým je rozlíšenie väčšie. Väčšina vedeckých časopisov vyžaduje pri tzv. *submission* (nahrávaní publikácie do publikačného systému) hodnotu rozlíšenia priložených obrázkov min. 300 resp. 400 (výnimočne aj viac) DPI. Konvertovať obrázok s nižším DPI do vyššieho DPI je možné viacerými spôsobmi. Veľmi užitočná je táto webová adresa (<https://convert.town/image-dpi>), pomocou ktorej dokáže užívateľ v priebehu sekúnd konvertovať akýkoľvek obrázkový súbor z počítača do obrázku so zvolenou hodnotou DPI.

*Príklad z praxe:* Obrázok, vytvorený v programe *Microsoft Paint* mal hodnotu DPI = 96 (hodnotu DPI obrázka je možné zistiť kliknutím pravého tlačidla myši na obrázok, potom vybraním možnosti *Vlastnosti* a následne *Podrobnosti*). Vedecký časopis vyžadoval obrázok s minimálnym DPI = 300. Na konvertovanie sa použil už spomínaný on-line nástroj, dostupný na adrese <https://convert.town/image-dpi>. Po otvorení stránky sa najprv zvolila hodnota DPI (šedá lišta) a kliknutím na zelenú ikonku *Choose*



*Image* sa nahral (*uploadoval*) zvolený súbor, ktorý sa následne automaticky konvertoval na zvolenú hodnotu DPI. Takýto obrázok bol pripravený na odoslanie do časopisu. Malé upozornenie z praxe - pokiaľ sa konvertovaný obrázok následne ešte upravuje v Microsoft Paint programe (doplnenie textu apod.), je nutné jeho opätovné konvertovanie do vyššej hodnoty DPI.

## 9.5 Prietoková cytometria povrchových markerov (CD znakov)

Prietoková cytometria (*flow cytometry*) je metóda kvantitatívneho stanovenia expresie povrchových alebo vnútrobunkových proteínov pomocou imunofluorescenčne značených protilátok. Prietokový cytometer sa skladá z niekoľkých hlavných častí – fluidiky (hydraulického systému), optiky (filtrov a optických vlákien), detektorov a elektronického systému. Na rozdiel od imunocytochémie sa pri prietokovej cytometrii pracuje so suspenznými vzorkami buniek. Po nasatí suspenzie buniek cytometrom sa suspenzia privádza prietokovým systémom v procese tzv. hydrodynamickej fokusácie (v tomto procese sa pomocou tzv. hnacej tekutiny (*sheath fluid*) bunky presúvajú až k detekčnej komore, v ktorej sa zaznamenáva fluorescenčný signál a aj tzv. rozptylové parametre SSC a FSC (SSC – *Side scatter* (rozptyl svetla v pravom uhle 90° od zdroja, týmto parametrom je možné stanoviť granularitu buniek) a FSC – *forward scatter* (rozptyl svetla v priamom smere, koreluje s veľkosťou buniek). Zdrojom excitačného svetla je laser (u fluorescenčných mikroskopov je zdrojom ortuťová fluorescenčná lampa alebo dióda). Systém detektorov zaznamenáva signál prechádzajúci cez fotonásobiče (zosilňovače alebo tzv. *photomultiplier tubes (PMTs)*) a následne je signál spracovaný do podoby elektronického signálu. Tento signál sa následne konvertuje do podoby tzv. *dot plotu* (v 2D alebo 3D grafe, Obr. 21 A,E) alebo do formy tzv. histogramu (Obr.21 B-D). Prietoková cytometria je širokospektrálna metóda, je ňou možné merať počet buniek, ich viabilitu, proliferáciu, expresiu povrchových aj vnútrobunkových markerov (proteínov alebo transkripčných faktorov), dá sa pomocou nej stanoviť fáza bunkového cyklu a špeciálne druhy prietokových cytometrov resp. sorterov (napr. FACS ARIA od firmy BD Biosciences) dokážu bunky aj sortovať (izolovať na základe jedného alebo viacerých parametrov). Protokol prípravy bunkovej suspenzie a jej následné označenie fluorescenčnými protilátkami je relatívne jednoduchý. Existuje mnoho variantov takýchto protokolov. Najjednoduchšiou verziou takého protokolu je značenie buniek jednou protilátkou, ktorá je priamo značená fluorescenčnou molekulou (napr. FITC (*Fluorescein isothiocyanate*), PE

(*Phycoerythrin*) alebo APC (*Allophycocyanin*). Fluorescenčné molekuly sa označujú aj ako fluorochrómy alebo fluorofóry, v praxi však najbežnejšie označenie predstavuje „farbička“ alebo „fluorescenčná značka“.

*Príklad z laboratórnej praxe:* Suspenzia buniek, pripravená z kolónií indukovaných pluripotentých kmeňových buniek pomocou akútázy (*accutase*) bola premytá pomocou PBS, prefiltrovaná cez bunkový filter (40µm *cell mesh*) a stanovila sa koncentrácia buniek. Bunky sa následne centrifugovali a supernatant sa odsal. K peletu so známym počtom buniek sa pridal FACS pufr (tento pufr obsahuje PBS (bez  $\text{Ca/Mg}^{2+}$ , pH=7,4), 0,5 mM EDTA (kyselinu etyléndiamíntetraoctovú) a 1% myšacie sérum (keďže primárna, priamo fluorescenčne značená protilátka je myšia protilátka) tak, aby výsledná koncentrácia buniek bola  $1 \times 10^6$  buniek v 100 µL pufru (experimentálna zostava - jeden milión buniek v 100 mikrolitroch pufru sa v prietokovej cytometrii označuje ako „test“ a výrobcovia fluorescenčne značených protilátok udávajú v manuáloch (alebo *datasheetoch*) množstvo protilátky na jeden test, zriedkavejšie udávajú hodnotu celkovej koncentrácie protilátky pri značení). Bunky sa pipetou preniesli do špeciálnej 5 mL cytometrickej skúmavky a nechali na ľade vo FACS pufri inkubovať 30 minút (blokovanie nešpecifických povrchových Fc receptorov pred značením buniek primárnou protilátkou). Následne sa priamo do suspenzie buniek pridala primárna, priamo značená protilátka proti povrchovému markeru ľudských pluripotentných kmeňových buniek (*Mouse monoclonal anti human SSEA-4 Antibody, PE conjugated*). Suspenzia buniek sa nechala s primárnou protilátkou inkubovať jednu hodinu na ľade, bez prístupu svetla (v tme). Po inkubácii sa k suspenzii pridali 4 mL PBS s 0,5 mM EDTA a roztok sa centrifugoval (3 min., 300xg, 13 °C). Supernatant sa opatrne zliat alebo odpipetoval (pozor, niekedy nie je bunkový pelet viditeľný) a opätovne sa pridalo 500 µL FACS pufru. Bunky sa pred samotným meraním jemne rozsuspendovali pipetou.

Častým prípadom je značenie suspenzie buniek pomocou dvoch a viacerých fluorescenčne značených protilátok. Typickým príkladom je kombinácia protilátok konjugovaných s FITC, PE a APC. Príprava experimentu s dvoma, troma či viacerými protilátkami vyžaduje väčšie množstvo buniek pri prvom experimente. Je tomu tak z dôvodu, že použitie viacerých typov protilátok s rôznymi konjugovanými fluorescenčnými molekulami v jednom experimente naráža na problém prieniku (tzv. *spill-over*, *crosstalk* alebo *spectral overlap*) flurescenčného signálu do iných kanálov

resp. detektorov. Dôvodom je šírka spektier jednotlivých fluorescenčných molekúl a vzájomný prienik niektorých spektier. V praxi to znamená, že pred prvým experimentom takéhoto typu musíme urobiť tzv. kompenzáciu (subtrakciu prieniku signálu). V reálnom experimente sa kompenzácia realizuje nahrávaním neoznačených buniek (kontrola), buniek označených prvou fluorescenčne značenou protilátkou, buniek označených druhou fluorescenčne značenou protilátkou a buniek označených treťou fluorescenčne značenou protilátkou (pre experiment s tromi fluorescenčnými farbami). Novšie systémy prietokových cytometrov po nahraní spomenutých kompenzačných vzoriek dokážu automaticky vykonať príslušnú subtrakciu a kompenzáciu, čo umožňuje takmer okamžité merania ďalších vzoriek.

Nešpecifická fluorescencia buniek, ktoré neboli označené protilátkami sa nazýva autofluorescencia. Rôzne typy buniek sa vyznačujú rôznym stupňom autofluorescencie. Každá bunka má určitú hodnotu autofluorescencie a táto je detekovateľná na prietokovom cytometri. Čo spôsobuje autofluorescenciu? Podľa niektorých autorov je spôsobená prítomnosťou zlúčenín ako NADPH, niektorými proteínmi (napr. kolagénom), aminokyselinami a dokonca aj niektorými bunkovými organelami (mitochondrie alebo lyzozómy). Autofluorescencia v učitom kanáli môže byť pri niektorých typoch buniek taká intenzívna, že použitie príslušného fluorescenčného kanálu je veľmi problematické pre protilátku, konjugovanú s fluorochrómom s emisiou v rovnakej oblasti fluorescencie. Veľmi vysokú mieru autofluorescencie majú napr. nádorové bunky, čerstvo izolované z tkaniva nádoru. Autofluorescencia má vplyv aj na tzv. *gating*, alebo proces vytvorenia hranice resp. množiny alebo *cut-off* hladiny fluorescencie pre neznačenú kontrolu. Bunky izolované z viacerých vzoriek rovnakého typu ľudských nádorov môžu vykazovať rôznu mieru autofluorescencie, čo má za následok posun hranice medzi negatívnou a pozitívnou vzorkou. Mnohokrát je však nutné vykonať individuálny gating pre každú vzorku samostatne, pretože určenie hranice negativity v jednej vzorke nemusí korelovať s hranicou negatívneho (autofluorescenčného) signálu druhej vzorky.

V prietokovej cytometrii sa používa viacero typov negatívnych kontrol. Prvou a najpoužívanejšou kontrolou je vzorka neoznačená protilátkou, konjugovanou s fluorescenčnou molekulou. Táto kontrola umožňuje stanoviť hranice negativity na základe autofluorescencie buniek. Nie je však úplne ideálnou kontrolou. Tej sa skôr približuje tzv. *izotypová kontrola* (*isotype control*). V tejto kontrole sa testované bunky

označia protilátkou, ktorá má rovnaký izotyp (rovnaký typ molekuly, napr. IgG<sub>1</sub> pre IgG<sub>1</sub>) a konjugovanú fluorescenčnú molekulu ako primárna protilátka, použitá v experimente. V ideálnom prípade je použitá aj v rovnakej koncentrácii, ako primárna protilátka. Izotypová protilátka je protilátka, pripravená napr. proti rastlinným antigénom (alebo antigénom, ktoré sa nevyskytujú v skúmaných bunkách). Použitie takejto protilátky umožňuje určiť mieru nešpecifickej väzby primárnej protilátky (napr. na už spomínané Fc receptory) a vhodne tomu prispôbiť stratégiu *cut-off* hranice. Existuje ešte iný typ negatívnej kontroly pre prietokovú cytometriu, najmä v prípade viacfarebnej (*multicolor*) cytometrie alebo stanovenia. Ide o tzv. FMO kontrolu (*Fluorescence Minus One control*), ktorá spočíva v tom, že sa v danom fluorescenčnom kanáli odmeria aj vzorka, ktorá je značená protilátkami s ostatnými fluorescenčnými molekulami. Pokiaľ je zaznamenaný signál, ide o spomínaný *spill-over* alebo *crosstalk* do testovaného kanála.

Artefakt spojený s falošnou pozitivitou je niekedy zapríčinený absorpciou alebo adsorpciou neviazanej resp. uvoľnenej fluorescenčnej molekuly. Pri veľmi citlivých meraniach sa preto nevylučuje a testuje aj tento jav. K identickému alikvotu buniek sa pridá okrem primárnej protilátky, konjugovanej s fluorescenčnou molekulou aj identická, neznačená protilátka. Ak z dôvodu kompetície protilátok o antigén napriek tomu nedôjde k poklesu signálu oproti kontrole, obsahujúcej len primárnu protilátku, konjugovanú s fluorescenčne značenou molekulou, nárast signálu je nutné interpretovať ako nešpecifickú väzbu voľnej alebo uvoľnenej fluorescenčnej molekuly na povrch alebo celý objem bunky.

## 9.6 Prietoková cytometria intracelulárnych antigénov

Prietoková cytometria sa dá použiť aj na určenie miery expresie intracelulárnych (vnútrobných) antigénov pomocou špecifických protilátok, konjugovaných s fluorescenčnou molekulou. Intracelulárne značenie je možné po predchádzajúcej šetrnej fixácii buniek s 0,01-0,02% paraformaldehydrom (doba fixácie - 10 minút) a perforácii fixovanej membrány detergentmi, ktoré umožňujú vstup protilátky do bunky. Na detekciu cytoplazmatických proteínov je vhodný detergent *saponín*, *Tween-20* alebo *digitonín*. Naopak, na detekciu nukleárných (jadrových) proteínov je nutné použitie agresívnejších detergentov (napr. *NP-40* alebo *Triton X100*, v koncentrácii 0,2-1%).

*Príklad z praxe:* Na detekciu a kvantifikáciu expresie proteínu Oct-4 po transfekcii primárnych kožných buniek syntetickým polycistronickým RNA vektorom a reprogramovaní buniek do indukovaných pluripotentných buniek sa reprogramované bunky manuálne izolovali (zoškrabnutím kolónií pod mikroskopom), fixovali a permeabilizovali pomocou komerčne dostupnej sady chemikálií. Ako kontrolné bunky sa použili netransfekované primárne bunky (fibroblasty). Výsledky prezentované vo forme histogramov ukázali v prípade indukovaných pluripotentných buniek posun signálu v danom fluorescenčnom kanáli oproti netransfekovaným bunkám. Počet buniek s pozitívnym fluorescenčným signálom sa následne kvantifikoval v programe FACS Diva.

### **9.7 Detekcia programovanej smrti (apoptózy)**

Pravdepodobne najčastejšie používanou metódou na stanovenie schopnosti kandidátnej chemickej zlúčeniny indukovať v bunkách (napr. nádorových) programovanú smrť (apoptózu) je tzv. annexínová esej (*Annexin V assay*). Táto rýchla, jednoduchá a zároveň relatívne lacná metóda je založená na poznatku, že skoré štádiá programovanej smrti sú asociované s tzv. externalizáciou (objavením sa na povrchu) fosfolipidu fosfatidylserínu, za normálnych okolností prítomného na vnútornej strane bunkovej membrány. Pokiaľ sa k bunkám v skorom štádiu apoptózy pridá fluorescenčne značený (konjugovaný s fluorescenčnou zlúčeninou) annexín, dôjde k jeho naviazaniu na fosfatidylserínové zvyšky a k označeniu buniek. Takéto bunky je potom možné analyzovať na prietokovom cytometri. Keď sa bunky v rámci annexínovej eseje označia aj fluorescenčnými sondami na detekciu mŕtvych buniek (napr. PI (*propidium iodide*) alebo 7-AAD (*7-aminoactinomycin D*), ide o tzv. DNA interkalačné sondy), je možné v rámci jedného experimentu kvantifikovať množstvo buniek v skorých aj neskorých štádiách apoptózy spolu s počtom mŕtvych (nekrotických) a aj živých buniek. Apoptické bunky v skorom štádiu apoptózy vykazujú pozitivitu vo fluorescenčnom kanáli, prislúchajúcom pre Annexín. Neskoré štádiá apoptózy vykazujú signál v Annexínovom kanáli a aj v PI alebo 7-AAD kanáli. Mŕtve (nekrotické bunky) majú signál len v PI alebo 7-AAD kanáli, naopak – živé bunky sú negatívne aj v Annexínovom kanáli a aj PI alebo 7-AAD kanáli (*Obr.21E*)

Pri realizácii experimentu, založenom na využití Annexínovej eseje sa pre skúmaný typ buniek do experimentu pridáva aj pozitívna kontrola, ktorou je vzorka buniek,

inkubovaná s *kamptotecínom* (inhibítor enzýmu topoizomerázy, izolovanej z kôry čínskeho stromu *Camptotheca acuminata*). Finálna koncentrácia kamptotecínu sa pohybuje od 3-7 $\mu$ M a je potrebné ju pre daný typ testovaných buniek otestovať z dôvodu rozličnej miery senzitivity.

Samotná realizácia annexínovej eseje je pritom veľmi jednoduchá. Pripraví sa rozličné riedenia a inkubačné časy skúmanej testovanej látky na vhodnej bunkovej línii. Bunky sa následne trypsinizujú a pripraví sa jednobunková suspenzia. Protokol značenia je tvorený inkubáciou s fluorescenčne značeným Annexínom a následnými premývacími krokmi a môže sa mierne líšiť v závislosti od dodávateľa Annexínového kitu. Pri samotnej analýze na prietokovom cytometri sa v rámci tzv. gating stratégie (vymedzenia množiny skúmaných buniek) zahrňujú všetky bunky (na rozdiel od klasických fenotypizačných experimentov, v ktorých sa mŕtve bunky a bunkové fragmenty (*cell debris*) vynechávajú z analýzy - Obr.21A).

## 9.8 Multiplexová analýza protilátkovými čipmi

Multiplexová analýza (stanovenie viacerých analytov v rámci jedného experimentu) založená na použití tzv. protilátkových čipov (*antibody array chips*) je ekonomickou a užívateľsky nenáročnou metódou charakterizácie bunkových antigénov. Jeden čip resp. membrána obsahuje miesta (spoty) s naviazanými primárnymi protilátkami proti rôznemu množstvu proteínov (ich počet sa pohybuje v desiatkách). Membrána obsahuje aj spoty pozitívnej a negatívnej kontroly, ktoré predstavujú vnútornú kontrolu správne realizovaného experimentu. Realizácia experimentu pomocou antibody array proteínových čipov je jednoduchá a zvládnu ju aj menej skúsení pracovníci. Táto metóda technicky predstavuje kombináciu ELISA metódy a Western blotu (s ELISOU má spoločný sendvičový systém detekcie a imobilizácie antigénu, s Western blotom ju spája podobný chemiluminiscenčný alebo fluorescenčný detekčný systém). Metóda prakticky nevyžaduje prítomnosť sofistikovaných prístrojov v laboratóriu, snáď len s výnimkou CCD kamery na digitálnu detekciu svetelného signálu. Vždy je však možné použiť manuálnu detekciu signálu pomocou svetlocitlivého filmu (podobne ako pri Western blote) a následné použitie skeneru na prevedenie výsledkov do digitálnej podoby). Možnosť detekcie a následnej semikvantitatívnej (chemiluminiscenčné kity) alebo kvantitatívnej analýzy (pri použití fluorescenčných kitov) viacerých parametrov naraz je výhodná najmä v prípade, keď je dostupnosť alebo množstvo vzorky

limitované (napr. pri analýze transkripčných faktorov v minoritnej populácii nádorových kmeňových buniek, izolovaných z ľudského nádorového tkaniva). Zo skúsenosti je možné metódu odporučiť najmä na detekciu proteínových produktov po transfekcii alebo transdukcií génov, napr. pri reprogramovaní ľudských fibroblastov do indukovaných pluripotentných kmeňových buniek (Strnadel et al., 2020). V takomto prípade nahradí jeden čip niekoľko desiatok Western blotových analýz. Menej vhodná (aj keď formálne odporúčaná aj výrobcom) je táto metóda na detekciu antigénov v plazme alebo sére. Koncentrácia väčšiny analytov je totiž v krvnom sére alebo plazme prítomná v koncentrácii v oblasti nano až pikogramov na 1mL séra alebo plazmy. Aj keď je táto oblasť koncentrácie ešte v rámci detekčného limitu proteínových čipov, prítomnosť efektu proteínovej matrice (*protein matrix effect*) väčšinou vedie iba k nevýrazným detekovaným signálom. Výnimkou sú séra a plazmy alebo bunkové lyzáty zo zvierat, ktoré boli inokulované nádorovými bunkami. V takýchto prípadoch dôjde k navýšeniu koncentrácie niektorých látok, produkovaných nádorovými bunkami a ich výraznej manifestácii na proteínovom čipe. V oblasti bunkového inžinierstva a prípravy nových bunkových kultúr je metóda proteínových čipov významná, pretože umožňuje charakterizáciu expresného profilu transkripčných faktorov novej bunkovej línie (Zahumenska et al., 2022; Strnadel et al., 2020).

## 9.9 ELISA

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) je metóda, umožňujúca kvantitatívne stanovenie koncentrácie analytu pomocou systému protilátok. Pri tzv. sendvičovej ELISA metóde (ktorá patrí k najpoužívanejším ELISA metódam vôbec) sa používa systém dvoch alebo troch protilátok, z ktorých jedna (*capture antibody*) je adsorbovaná na povrch priehľadnej 96-jamkovej polystyrénovej platničky (rozvoj ELISA metódy nastal vďaka objavu vysokej nešpecifickej adsorpčnej vlastnosti polystyrénu voči bielkovinovým molekulám). V čom spočíva princíp ELISA metódy? Po nasýtení povrchu platničky roztokom primárnej protilátky a blokovaní nepokrytých miest blokačným roztokom sa aplikuje analyzovaná tekutina (môže ňou byť sérum, plazma, tkanivový mok, moč, bunkový lyzát, bunkové médium a podobne) a táto sa nechá inkubovať (inkubačný čas je rôzne dlhý a môže prebiehať pri laboratórnej teplote, v chladničke alebo pri 37°C v inkubátore. Po následnom opakovanom premytí sa aplikuje roztok sekundárnej protilátky, ktorá je buď priamo alebo nepriamo konjugovaná s HRP (*horse radish peroxidase*) enzýmom. Pri nepriamej konjugácii je

sekundárna (detekčná) protilátka konjugovaná s biotínom a tento sa následne v ďalšom inkubačnom kroku naviaže na streptavidín-HRP komplex. Po premytí a pridaní chromogénneho (alebo fluorescenčného) substrátu dôjde vplyvom enzýmu peroxidázy k rozštiepeniu molekuly chromogénneho činidla a zároveň k zmene farby roztoku. Intenzita zafarbenia roztoku je priamo úmerná množstvu naviazanej sekundárnej protilátky a teda aj analytu. Po niekoľkých minútach sa vyvíjanie farebného zafarbenia roztoku zastaví vhodným zastavovacím roztokom (*stop solution*), ktorým môže byť napr. roztok kyseliny sírovej. Následne sa intenzita zafarbenia roztoku zmeria spektrofotometricky pri danej vlnovej dĺžke (napr. 405 nm alebo 450 nm). Z nameraných hodnôt absorbancie pre známe hodnoty koncentrácií štandardov kalibračnej krivky sa vytvorí krivka, pomocou ktorej sa odčítajú pre známe hodnoty absorbancie jednotlivé koncentrácie analytu v testovaných vzorkách. Väčšina ELISA metód využíva oblasť lineárnej závislosti absorbancie od koncentrácie a žiadanú hodnotu koncentrácie vzorky je tak možné získať cez rovnicu lineárnej regresie ( $r^2$  koeficient by mal byť väčší ako 0,95 – menšia alebo veľmi malá hodnota hovorí o slabej lineárnej závislosti, čo môže byť spôsobené nedodržaním metodických postupov v ELISA protokole). Tzv. polynomiálna regresná analýza je ďalšou analýzou používanou v ELISA protokoloch na predikovanie závislej premennej a na určenie polynomiálneho vzťahu medzi závislou a nezávislou premennou. V praxi to znamená, že takáto analýza lepšie popisuje krivku s tvarom saturačnej krivky, ktorá je typická pre väčší rozsah meraných koncentrácií pri ELISA metóde. ELISA je jedna z najcitlivejších imunodetekčných metód, umožňuje totiž kvantifikáciu analytov až na úrovni 100-200 pg/mL (1 pikogram =  $10^{-12}$  gramu). Existuje veľké množstvo komerčne dostupných ELISA kitov, ktoré obsahujú všetky potrebné komponenty (štandardy, roztoky a pufre) a platničku, už pokrytú primárnou protilátkou (v prípade tzv. sendvičovej ELISA metódy). Veľkou výhodou pri ELISA metóde je možnosť automatického premývania jamiek platničky robotickou premývačkou v prípade, že je dostupná (lepšia reprodukovateľnosť, rýchlejšia realizácia, menšie odchýlky merania a podobne).

Pri kvantifikácii proteínových analytov (napr. cytokínov) v rôznych biologických vzorkách sa môže experimentátor stretnúť s veľmi zaujímavým, hoci nepriaznivým javom, pri ktorom je absorbanca vzorky paradoxne menšia ako nulová hodnota koncentrácie kalibračnej čiary. Ako je možné, že vzorka s nenulovou koncentráciou analytu ukáže hodnotu absorbancie menšiu, ako štandardná vzorka s nulovou



koncentráciou? Zdanlivo paradoxný jav má svoje vysvetlenie v už spomenutom tzv. efekte matrice vzorky (*matrix effect*) (Stavnsbjerg et al., 2022). Niektoré biologické vzorky majú sklon ku gélovateniu resp. vytváraniu gélovej konzistencie. Gélová konzistencia vzorky spôsobí, že analyt je vo vzorke „nepohyblivý“ a ani účinkom trepania „nenájde“ cestu k primárnej protilátke. Pri vyššom nariedení takejto vzorky je možné pozorovať (opäť na prvý pohľad paradoxný) nárast hodnoty signálu (absorbancie) až do určitej, hraničnej hodnoty, pri ktorej dôjde k poklesu signálu z dôvodu dosiahnutia podlimitnej koncentrácie. Efekt matrice vzorky je teda možné čiastočne eliminovať vyšším ako odporúčaným riedením vzoriek vzorkovým pufrom (je súčasťou ELISA kitov) alebo zvýšením hodnoty *rpm* (*revolutions per minute*) pri trepaní 96-jamkovej platničky pri inkubácii so vzorkou na orbitálnej trepačke. Pri ELISA metódach je lepšie vyhnúť sa používaniu vzoriek, ktoré sú lipemické a hemolyzované (pri hemolýze sa do vzorky uvoľňujú endogénne peroxidázy, ktoré môžu interferovať s ELISA stanovením (výsledkom sú netypické, až enormne vysoké hodnoty absorbancie).

Existuje ešte jeden zaujímavý artefakt, s ktorým sa človek môže stretnúť pri ELISA metóde – namerané absorbancie okrajových jamiek na obvode 96-jamkovej platničky sú spravidla vyššie ako v ostatných jamkách. Tento jav sa vysvetľuje odlišným koeficientom prestupu tepla v okrajových jamkách oproti jamkám vo vnútri platničky. Pri veľmi citlivých analýzach (napr. pri detekcii cytokínov) preto niektorí odborníci odporúčajú tieto jamky jednoducho vynechať.

### **9.10 Western blotová analýza expresie proteínov**

Western blot (alebo aj SDS-PAGE) je veľmi rozšírená metóda detekcie a semikvantitatívnej analýzy expresie proteínov pomocou vertikálnej elektroforetickej separácie proteínov v akrylamidovom géli (Obr.25), spojenej s prenosom separovaných proteínov na nitrocelulózovú prípadne PVDF (*polyvinylidene fluoride*) membránu (Obr.26) a následnou detekciou proteínov pomocou protilátok. Pri separácii proteínov rozličnej veľkosti využíva princíp tzv. „molekulárneho sita“. Pri detekcii sa používa systém primárnej a sekundárnej, enzýmom peroxidázou (*HRP*, *horse-raddish peroxidase*) značenej sekundárnej protilátky (existujú aj systémy s fluorescenčne značenou sekundárnou protilátkou, analýza signálu v takýchto prípadoch zabezpečuje

fluorescenčný skener). Pri SDS-PAGE metóde sa skúmaná vzorka prevedie do formy lyzátu.

### 9.11 Príprava lyzátu z buniek

Pre mnohé typy experimentov sa kultivované a ošetrované alebo neošetrované bunky musia ďalej spracovávať vo forme proteínového lyzátu. Lyzát je možné pripraviť chemickými alebo fyzikálnymi metódami. Chemické metódy využívajú špeciálne lyzačné pufre (napr. *RIPA pufor*), ktoré obsahujú rôzne typy detergentov (napr. *SDS*, *Triton X-100*, *Tween-20*). Fyzikálne metódy využívajú napríklad cyklus opakovaného zmrazenia a rozmrazenia vzorky alebo rezonančné vlastnosti ultrazvuku. Väčšinou je príprava bunkového lyzátu kombináciou týchto faktorov. Pri príprave bunkového lyzátu je dôležité vzorku spracovávať na ľade a vždy v prítomnosti inhibítorov proteáz (napr. *Complete inhibitor cocktail, Roche*), aby nedošlo k degradácii skúmaných proteínov. Aj sonikácia (lýza buniek účinkom ultrazvuku) by mala za ideálnych podmienok prebiehať v podchladenom vodnom roztoku (najmä ak trvá dlhšie ako 1-2 minúty). Špeciálnou formou prípravy proteínových lyzátov je príprava lyzátu z rezov, nakrájanných na mikrotome (*Obr.23A-I*). Táto forma prípravy sa využíva napr. v experimentoch, pri ktorých sa skúma mikroprostredie (*microenvironment*) tkaniva, napríklad nádorového ložiska. Možnosť korelácie výsledkov z imunohistochemie s výsledkami Western-blotovej alebo inej imunodetekčnej analýzy v rámci tkaniva je v takýchto prípadoch veľmi dôležitá.

Posledným krokom pri samotnej príprave bunkových lyzátov je centrifugácia vzorky (hodnoty až 15 000xg – 20 000xg). V rámci tejto procedúry sa pevné bunkové elementy (časti buniek) oddelia od samotného lyzátu a lyzát (supernatant, roztok nad peletom) sa vyčíri (napr. pri príprave bunkového lyzátu z melanómu sa pôvodne čierny roztok premení na číry roztok proteínového lyzátu (*Obr.23CH,I*). Tento lyzát sa následne použije v experimente alebo rozdelí do čistých (najlepšie sterilných) skúmaviek a zamrazí na -80°C.

Aká je stabilita takto pripraveného lyzátu? Lyzát je pri teplote -80°C stabilný niekoľko mesiacov, ale už po roku sú evidentné zmeny v množstve detekovaných proteínov. Pokiaľ povaha experimentov vyžaduje dlhodobý zber biologického materiálu, je lepšie bunky zamrazovať vo forme peletu (t.j. po trypsinizácii sa bunky premyjú s PBS (pH = 7,4) pufrom, ten sa následne odsaje a zamrazí sa len samotný bunkový pelet). Na

základe praktických skúseností sú takéto vzorky zväčša oveľa stabilnejšie. Z takto zamrazených vzoriek sa následne lyzáty pripravujú spoločne, zo všetkých vzoriek naraz.

### 9.12 Príprava vzoriek na Western blot

Pre porovnanie hladiny expresie proteínov v rôznych vzorkách je dôležité, aby bolo porovnávané rovnaké množstvo každej nanesej vzorky. V praxi to znamená, že v každej jamke akrylamidového gélu sa bude nachádzať rovnaké množstvo buniek (lyzovaných lyzačným pufrum) alebo rovnaké množstvo celkových proteínov, zistené niektorou zo štandardných metód zisťovania koncentrácie proteínov (*Bradfordova metóda* alebo metóda *BCA Protein assay*).

*Príklad z praxe:* Pri lyzovaní kompaktných kolónií ľudských indukovaných pluripotentných kmeňových buniek, ktoré boli zoškrabané z povrchu platničky sa nemohol určiť počet jednotlivých buniek, preto sa pristúpilo k určeniu množstva resp. koncentrácie proteínov. Bunky sa lyzovali v komerčne dostupnom RIPA pufrí (obsahuje 30mM HEPES, pH 7,4, 1% Nonidet P40, 0,5% sodium deoxycholát, 150mM NaCl, 0, 1% sodium dodecyl sulfát, 1mM NaVO<sub>4</sub>, 50mM NaF, 1mM PMSF, 5mM EDTA, 10% pepstatin A, 10 µg/ml aprotinín a 10 µg/ml leupeptín) na ľade a po centrifugácii sa v supernatante, zbavenom zvyškov bunkových membrán určila koncentrácia proteínov na spektrofotometri pomocou BCA metódy (*Pierce, USA, Obr.23*). Zistilo sa, že vzorka č.1 obsahuje 2x väčšie množstvo proteínov než vzorka č.2 (resp. bola 2x koncentrovanejšia, obsahovala 2 µg proteínu v jednom mikrolitri (2µg/µL). Celkový objem vzorky, ktorý bolo možné naniesť na jednu jamku v géli bol 50 µL. Celkové množstvo proteínov, nanesených na jednu jamku mal byť podľa odporúčaní výrobcu max. 30 µg (30µg/well). Keďže sa detekovaný proteín (Oct-4) na základe imunofluorescenčnej analýzy javil ako abundančný, do celkovej vzorkovej zmesi, ktorá sa mala naniesť do jamky sa teda pridal objem vzorky, ktorý obsahoval 20 µg celkového proteínu (to znamená, že pre vzorku č.1 zmes určená na naniesenie do gélu obsahovala 10µL vzorky č.1, 10µL vzorkového pufru (5x *SDS sample buffer*) a 30 µL lyzačného pufru). Zmes pre vzorku č.2 obsahovala 20µL vzorky č.2 (s koncentráciou 1µg/µL), 10µL vzorkového pufru (5x *SDS sample buffer*) a zvyšok sa doplnil s 20 µL lyzačného pufru (celkový objem bol (pre obe vzorky jednotlivo) 50 µL. Vzorky sa pred

nanášaním na gél povarili 5 minút pri 95°C (na vodnom kúpeli alebo suchom termobloku s nastaviteľnou teplotou).

Po separácii proteínov v polyakryamidovom géli v elektroforetickej aparátúre nasleduje ich transfer z gélu na nitrocelulózovú membránu alebo PVDF (*polyvinylidene difluoride*) membránu. Tento prenos sa principiálne realizuje dvoma spôsobmi – „mokrým“ transferom (tzv. *wet blot transfer*) alebo polosuchým transferom (*semi-dry blotting*, Obr.26). Druhý spôsob si v poslednom čase získal mimoriadnu obľubu kvôli rýchlosti, efektívnosti a malej spotrebe blotovacích roztokov (pufrov). Postup prípravy na blotovanie je principiálne veľmi podobný. Hrubý blotovací filtračný papier sa nechá dôkladne nasiaknuť pufrom na dobu cca 5 minút. Následne sa preniesie na spodnú časť aparátúry, kde sa nachádza anóda (+ elektróda). Bublinky, ktoré dokážu účinne zabrániť transferu proteínov z gélu na membránu (vytvoria sa kruhové biele miesta v časti membrány, kde majú byť proteíny) sa odstránia malým rolerom alebo aspoň Pasterovou pipetou. Pri práci je nutné mať rukavice. Nitrocelulózová membrána s rovnakou veľkosťou ako filtračný papier sa nechá inkubovať v transferovom pufri na dobu 5 minút a položí sa na filtračný papier na aparátúre. Následne sa na membránu opatrne položí akrylamidový gél (po 5 minútach tzv. ekvilibrácie v transferovom pufri). Na gél sa položí filtračný papier a vzniknutý „sendvič“ sa priklopí vrchným vekom aparátúry (tvorí ho katóda). Na pripojenom zdroji napätia sa nastaví hodnoty prúdu podľa plochy membrány (max. však 5 mA na cm<sup>2</sup> membrány) a čas (spravidla 25-30 minút je postačujúca doba, nevyhnutná na úspešný transfer proteínov na membránu). *Poznámka:* Je výhodné použiť aparátúru s možnosťou chladenia alebo samotný transfer realizovať s aparátúrou, umiestnenou v chladničke, keďže pri blotovaní dochádza k zahrievaniu aparátúry, čo môže ovplyvniť kvalitu preblotovaných proteínov.

### 9.13 Detekcia chemiluminiscenčného signálu

Chemiluminiscenčný signál je možné detekovať a zaznamenať pomocou chladenej CCD kamery alebo starším spôsobom za pomoci expozície svetlocitlivého filmu. Použitie CCD kamery je značne rozšírené a obľúbené a dnes sa len zriedkavo možno stretnúť s tradičným spôsobom, ktorý využíval svetlocitlivý materiál. Je však zaujímavé, že tradičný spôsob pomocou expozície na svetlocitlivý materiál je stále citlivejší spôsob detekcie, čo môže mať význam pre detekciu veľmi slabých signálov.

Expozícia svetlocitlivého materiálu sa realizuje v tmavej komore, osvetlenej len slabým červeným svetlom (*Obr.27*). Svetlocitlivý film sa nastrihá na potrebnú veľkosť, pravý okraj sa označí zastrihnutím a pripraví sa filmy, exponované rôzne dlhými časovými intervalmi (priložením na membránu, umiestnenú v špeciálnej kazete). Podľa intenzity signálu tieto časové intervaly môžu byť 1-60 sekúnd, niekedy aj viac. Po expozícii sa film umiestni do nádoby s vývojkou na 5 minút. Potom sa premiestni do nádoby s destilovanou vodou na cca 2 minúty. Následne sa film preniesie pinzetou do nádoby s ustaľovačom na dobu 5 minút. Po 5 minútach sa film vyberie, vloží do nádoby s destilovanou vodou na opláchnutie a následne sa nechá vysušiť na stojane. Skenujú sa len dôkladne vysušené filmy, predčasná manipulácia môže na filmoch zanechať zreteľné odtlačky.

## **10 Denzitometrická analýza**

Výsledkom analýzy expresie proteínov pomocou protilátkových čipov (antibody array) alebo Western blotovej analýzy je (v prípade použitia fotocitlivých filmov a manuálnej detekcie signálu) exponovaný fotografický materiál. Fotocitlivé filmy sú exponované chemiluminiscenčným svetelným signálom, ktorý vzniká enzymatickým štiepením chemiluminiscenčného substrátu. Najčastejšie používaným enzýmom je peroxidáza, konjugovaná so sekundárnou protilátkou. Exponovaný fotocitlivý film je možné po vysušení oskenovať pomocou kancelárskeho skeneru. Následná denzitometrická analýza umožňuje semikvantitatívne porovnanie expresie na základe veľkosti škvŕn exponovaných miest (v prípade fluorescenčnej detekcie signálu fluorescenčným skenerom je možné aj kvantitatívne porovnanie). Vychádza sa pritom z predpokladu, že veľkosť tmavej škvŕny na fotocitlivom filme je priamo úmerná množstvu svetelného signálu a tým aj množstvu naviazanej detekčnej protilátky. Táto priama úmera platí len v určitom rozsahu a nie je možné ju využiť napríklad pri veľmi abundantných proteínoch (v takýchto prípadoch väčšinou dôjde k nasýteniu signálu resp. k prekročeniu detekčnej kapacity fotocitlivého materiálu, následkom čoho sa veľkosť škvŕny od určitého momentu už nezväčšuje (na fotocitlivom materiáli je možné v takýchto prípadoch pozorovať bielu škvŕnu, doslova „vypálenú“ silným svetelným signálom). Preto je dôležité pri manuálnej detekcii svetelného signálu fotocitlivým materiálom zvoliť rôzne dlhé časy expozície filmu (v praxi sa tieto časy pohybujú od 5 sekúnd do niekoľkých minút (5,10, 15 minút). V špeciálnych prípadoch (v prípade nižšej expresie proteínov) sa používa aj 24 hodinová expozícia pri zníženej teplote

(fotocitlivý materiál je exponovaný v špeciálnych kovových kazetách, ktoré zabraňujú nežiadúcej expozícii denným svetlom).

Denzitometrickú analýzu je možné realizovať pomocou komerčne dostupných programových balíkov. Ich zakúpenie kedysi predstavovalo relatívne veľkú investíciu, dnes je však možné ich využívať podstatne lacnejšie, a to vo forme predplatených ročných licencií. Na internete je však možné nájsť aj množstvo tzv. *freeware* produktov (pri ich inštalácii si však treba dôkladne overiť stránku, z ktorej sa inštalujú). Niektoré softvérové balíky sú produktom výskumných inštitúcií – napr. už spomínaný softvér *ImageJ* je výsledkom spolupráce s NIH (*National Institute of Health*) a Univerzity vo Wisconsin (USA). *ImageJ* softvér je systém nezaťažujúci program, ktorého inštalácia je veľmi jednoduchá (napr. z webovej lokality: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Pri inštalácii si užívateľ najskôr zvolí typ operačného systému a program môže ihneď používať. *ImageJ* obsahuje množstvo funkcií, pokrývajúcich takmer všetky potreby bežného užívateľa. Nasledujúci modelový príklad (Obr.37) ilustruje použitie programu *ImageJ* pri denzitometrickej analýze signálu z Western blotovej analýzy exprese proteínov. Vstupným materiálom na analýzu je obrázok (sken) fotografického filmu, na ktorom sú viditeľné tzv. *bandy* alebo škvrny, vytvorené pri expozícii nitrocelulózovej membrány s naviazanou sekundárnou protilátkou, konjugovanou s peroxidázou (podrobnosti je možné nájsť v kapitole *Western blotová analýza exprese proteínov*). V modelovom (imaginárnom) experimente boli použité bunky, ktoré boli inkubované s rôznymi koncentráciami špecifického inhibítora detekovaného proteínu. Kontrolnú vzorku predstavovali bunky, ktoré neboli inkubované s inhibítorom. Oskenovaný obrázok sa konvertoval do *jpeg* formátu (toto je možné aj pomocou veľmi jednoduchého programu *Paint*) a otvoril v programe *ImageJ* (cez funkciu lišty *File* a *Open* alebo jednoduchým posunutím ikonky obrázku na lištu programu *ImageJ*). Následne sa obrázok konvertoval na 8-bitový (cez lišty *Image*, *Type* a *8-bit*) a invertoval cez funkciu lišty *Edit* a *Invert*. Samotná analýza sa realizovala výberom vhodnej ohraničujúcej množiny (*Selection*). Pri dot blotových signáloch (kruhových) je vhodné zvoliť *Oval* selection, v našom prípade (kvôli tvaru škvŕn) je vhodnejšie zvoliť *Rectangular* selection. Pohybom kurzora ohraničíme prvú škvrnu (*band*) a zvolíme funkciu *Analyze* a následne *Measure*. Objaví sa tabuľka, ktorú je možné následne konvertovať do programu *Microsoft Excel* (pozor, niekedy je po konvertovaní do *Excelu* (cez *File* a *Save as*) nutné nahradiť bodky desatinnou čiarkou). Pred analýzou

d'alšej škvrny presunieme kurzor myši do stredu ohraničujúcej množiny a posunieme myšou na pozíciu ďalšej škvrny (týmto spôsobom ostane veličina *Area* v tabuľke konštantná). Pokračujeme rovnakým spôsobom aj pri ostatných škvrnách. Následne tabuľku uložíme vo formáte *.xls* (cez *File* a *Save as*) a otvoríme v programe *Microsoft Excel*. Zvolíme grafický výstup a výsledky uložíme (Obr.37). Výsledky môžeme prezentovať vo forme „*fold change*“, pri ktorej si zvolíme hodnoty jednej vzorky ako referenčnú hodnotu. Ostatné vzorky podelíme hodnotou zvolenej vzorky (kontrolná vzorka tak nadobudne hodnotu = 1) a vzorky prezentujeme v grafe (na y-psilonovej osi bude následne uvedené „*fold change*“ alebo „*relative ratio*“).

## 11 *In vivo* charakterizácia buniek

### 11.1 Experimenty s použitím laboratórnych zvierat

Použitie zvierat vo výskume je stále veľmi dôležitou súčasťou niektorých experimentov najmä v onkologickom výskume, ale aj v ostatných odvetviach biomedicíny. Na Slovensku je orgánom schvaľujúcim experimenty na zvieratách Štátna veterinárna a potravinová správa. Plánované experimenty na zvieratách musia byť pripravené podľa tzv. zásady 3R (*replacement, reduction a refinement*). Tieto zásady, predstavené *W.M.S Russellom* and *R.L Burchom* už v roku 1959 predstavujú v podstate návod na etické použitie zvierat v laboratórnom výskume. Plánované experimenty na zvieratách musia byť schválené aj etickou komisiou inštitúcie, v ktorej sa experimenty majú vykonávať. V rámci zasadnutia etickej komisie riešiteľ projektu predstaví svoj projekt a odpovie na prípadné otázky zo strany členov komisie.

Niektoré *in vivo* experimenty nie je stále možné nahradiť alternatívnymi *in vitro* metódami. Napríklad experimenty, pri ktorých sa skúma vplyv alebo interakcia imunitného systému s nádorovými bunkami, inokulovanými do organizmu pokusného zvieraťa stále nie je úplne možné nahradiť *in vitro* alternatívami. Aj tzv. bioreaktorové vlastnosti živého organizmu nie je možné vždy efektívne nahradiť modelovaním týchto podmienok *in vitro*, pretože nie sú známe všetky parametre a interagujúce zložky, ktoré sú súčasťou živého organizmu.

Príkladom môže byť prípad z praxe: Pri resekcii neuroendokrinného nádoru z pankreasu pacienta sa nádor histologicky spracoval na patológii. Nevyužitá časť tkaniva sa preniesla do laboratória, v ktorom sa jedna časť tkaniva spracovala



enzymaticky na jednobunkovú suspenziu a vysadila do kultivačnej misky s médiom za účelom generovania novej bunkovej línie. Druhá časť tkaniva sa v celkovej anestézii transplantovala do podkožia imunodeficientnej myši. Po cca 6 týždňoch kultivácie buniek *in vitro* bolo zistené, že nedošlo k efektívnej izolácii nádorovej bunkovej línie a v kultivácii sa objavili len prežívajúce stromatické bunky. *In vivo* experiment bol naopak úspešný – nádor, transplantovaný do podkožia atymickej myši zväčšil svoj objem takmer dvojnásobne. Na ďalšie experimenty sa preto využila metóda *in vivo* pasážovania nádorového tkaniva (séria po sebe nasledujúcich transplantácií nádorového tkaniva).

## 11.2 Transplantácia buniek do imunodeficientných myší

Existuje niekoľko druhov transplantácií v závislosti od pôvodu transplantovaných buniek. Pri transplantácii buniek, ktoré boli izolované z toho istého zvierat'a, ide o tzv. *autológnu transplantáciu* (príkladom môže byť transplantácia iPSc-derivovaných neurálnych prekursorov do organizmu toho istého jedinca, z ktorého boli izolované primárne bunky na ich reprogramovanie do iPSc). Pri transplantácii buniek z jedného jedinca do jedinca toho istého druhu (napríklad pri transplantácii nádorovej bunkovej línie, odvodenej z nádoru potkana do potkanov) hovoríme o *alogénnej* transplantácii alebo skráteno o *alotransplantácii*. O *xenotransplantácii* hovoríme v prípade, keď sú transplantované bunky odvodené z iného živočíšneho druhu (príkladom môže byť transplantácia ľudských nádorových buniek do organizmu laboratórnej myši (Obr.29) alebo transplantácia ľudských nádorových alebo prekursorových buniek do kuracieho embrya (Obr.31 - Obr.34) alebo do skorého vývojového štádia experimentálnej ryby (*Danio rerio*) (Obr.35). Pri alogénnej transplantácii a xenotransplantácii je nutné zabrániť imunitnej reakcii transplantátu (niekedy nazývaného aj „*graft*“) použitím imunosupresív (látok, potláčajúcich imunitnú odpoveď) alebo použitím tzv. imunodeficientných laboratórnych zvierat (zvierat, v ktorých je v dôsledku spontánnej alebo génovým inžinierstvom indukovanej mutácie potlačená imunitná odpoveď, príkladom je myš línie *Crl:NU(NCr)-Foxn1nu* (Obr.29). Práca s imunodeficientnými živočíšnymi modelmi je finančne náročná v dôsledku nevyhnutnosti použitia sterilných kliebok, sterilnej podstielky a sterilnej vody a krmiva. Kliebky na použitie takýchto zvierat sa musia sterilizovať a musia byť vybavené filtrom, ktorý zabraňuje prieniku mikroorganizmov zo vzduchu, ale nebráni výmene plynov. Podstielka (najčastejšie piliny) sa tiež musí sterilizovať alebo zakúpiť už sterilizovaná gama žiarením.



Špeciálne sterilné krmivo je tiež možné zakúpiť, sterilná voda sa pripravuje čerstvá, niekoľko hodín pred použitím. Manipulácia s imunodeficientnými zvieratami (najčastejšie nimi sú atymické myši a potkany) prebieha v sterilnom prostredí laminárneho boxu (*laminar hood*) po predchádzajúcom vyčistení (sterilizácii boxu) UV žiarením (aspoň 20 minút) alebo po dezinfekcii povrchu laminárneho boxu 70% roztokom etanolu alebo izopropanolu. Pri manipulácii s imunodeficientnými zvieratami musí mať pracovník oblečený čistý laboratórny plášť (prípadne jednorázový oblek) a na rukách gumenné rukavice, ktoré sa pred manipuláciou so zvieratom povrchovo sterilizujú 70% etanolom.

Bunky sa transplantujú najmä vo forme suspenzie v sterilnom PBS (pH 7,4) vo vopred určenej koncentrácii a objeme. Pred samotnou transplantáciou sa určí viabilita buniek (pomer množstva živých buniek ku celkovému počtu buniek), určí sa ich počet a zvolí sa vhodná koncentrácia na transplantáciu. Koncentrácia buniek na transplantáciu závisí od povahy samotného experimentu, napríklad pri indukovaní nádorov v myšiach sa aplikuje množstvo buniek v rozmedzí 100 000 – 1 000 000 buniek na 100-300µL pufru. Množstvo transplantovaných buniek závisí aj od charakteru buniek a ich schopnosti rásť po injekčnej aplikácii do živého organizmu zvieratá. Niekedy sa na zlepšenie tzv. *engraftmentu* (schopnosti vytvoriť transplantát) bunky zmiešajú s PBS s prídavkom špeciálneho extraktu (zmesi extracelulárnych proteínov, izolovaných z myšacích sarkómov). Tento v texte už niekoľkokrát spomínaný extrakt, tiež známy pod obchodným názvom *Matrigel*, vytvára transplantovaným bunkám prostredie, v ktorom dôjde k efektívnejšej tvorbe transplantátu a jeho prídavok je vhodný najmä pre problematicky transplantovateľné bunky. Samotná koncentrácia *Matrigelu* v suspenzii buniek sa líši medzi jednotlivými protokolmi, ale bežne používané koncentrácie sa pohybujú od 5-50%. Pri práci s *Matrigelom* je však nutné pracovať na ľade, resp. s podchladenými roztokmi, pretože Matrigel pri teplote nad 10°C mení svoje skupenstvo z kvapalného na tuhé (gélovatie). Aj pipety a špičky, ktorými sa *Matrigel* pipetuje je nutné podchladiť (vložením do sterilnej 50 mL plastovej skúmavky a umiestnením na 15-30 minút do chladničky alebo mrazničky), alebo aspoň pred použitím prepláchnuť sterilným ľadovým roztokom PBS. Injekčné striekačky a ihly, ktorými sa zmes buniek transplantuje je tiež nutné vychladiť (autorovi sa osvedčilo umiestnenie striekačky s ihlou do ľadového roztoku PBS na 3-5 minút). Pri samotnej transplantácii sa pracuje rýchlo, aby sa minimalizoval stres zvieratá a zabránilo sa

ohrevu zmesi buniek, *PBS* a *Matrigelu* nad teplotu, pri ktorej dochádza k zmene skupenstva *Matrigelu* (v takom prípade dôjde k upchatiu injekčnej striekačky so suspenziou buniek). Samotná teplota injikovanej zmesi čiastočne znecitlivuje miesto aplikácie, takže zvieru zväčša vpich ihly ani nespozoruje (nezaregistruje).

*Príklad z laboratória:* Pri testovaní pluripotencie novovytvorených indukovaných pluripotentných kmeňových buniek sa používa metóda tzv. indukcie teratómu (*teratoma assay*), ktorá spočíva v xenotransplantácii ľudských iPSc buniek do podkožia imunodeficientných myší (tzv. *nude* myši). Ak sú reprogramované bunky skutočne pluripotentné, tak po transplantácii do *nude* myši po niekoľkých týždňoch vytvoria teratóm – nádor, pozostávajúci z buniek resp. tkanív všetkých troch zárodočných vrstiev (*endoderm*, *mezoderm* a *ektoderm*). V uvedenom prípade išlo o kožné fibroblasty, reprogramované do indukovaných pluripotentných kmeňových buniek syntetickým, polycistronickým RNA vektorom. Vychladenou pipetou sa  $1 \times 10^6$  buniek zmiešalo s 200  $\mu$ L sterilného PBS, obsahujúceho 30% *Matrigelu*. Zmes sa vychladenou injekčnou striekačkou aplikovala bilaterálne (na dvoch miestach) do podkožia atymickej myši. Po aplikácii sa myši nechali prežívať 6 až 9 týždňov. Teratóm bol vizuálne detekovateľný po cca 4-5 týždňoch. Myši sa následne usmrtili (*eutanázovali*) cervikálnou dislokáciou (spôsob rýchleho a humánneho usmrtenia najmä menších zvierat prerušením miechy - hlava zvieraťa sa fixuje jednou rukou a druhou sa potiahnutím za chvost preruší miecha v oblasti krku), tkanivo teratómu sa vypreparovalo chirurgickým skapelom a nechalo fixovať v 50mL skúmavke s obsahom 10% paraformaldehydu na dobu 24 hodín. Po fixácii sa tkanivo histologicky spracovalo a zafarbilo eozínom a hematoxylínom (*Strnadel et al.*, 2020).

### 11.3 Testovanie metastatickej schopnosti buniek v embryách

Kuracie embryá sú veľmi vďačným modelovým systémom pre niektoré *in vivo* aplikácie, spojené s xenograftovaním fluorescenčne označených ľudských nádorových buniek. Pokiaľ sa použijú nádorové bunky, ktoré majú schopnosť metastázovať do mozgu (tzv. *brain-tropic cells*), je možné pomocou tejto metódy študovať vplyv knock-outovaného génu alebo naopak - zvýšenej expresie génu na schopnosť metastázovania buniek. Metóda je finančne veľmi efektívnou *in vivo* metódou, umožňujúcou štúdium na veľkom súbore vtáčích resp. kuracích embryí.

*Príklad z praxe:* Pomocou *in vivo* metódy na kuracích embryách sa študoval vplyv transkripčného faktora *Twist* na schopnosť ľudských nádorových buniek, izolovaných z karcinómu prsníka (bunky s označením *MDA-BR-231*), kolonizovať mozgové tkanivo. Kvôli vizualizácii nádorových buniek pod konfokálnym fluorescenčným mikroskopom sa nádorové bunky transdukovali virálnym vektorom tak, aby stabilne exprimovali zelený fluorescenčný proteín (*GFP*, kapitola 11.4).

Pred začatím experimentu sa zakúpili čerstvé, fertilizované kuracie vajcia (tieto je možné získať z voľných farmových chovov). Na škrupinu sa označil dátum znášky a vajcia sa preniesli do inkubátora (37°C), v ktorom bola zabezpečená 100% vlhkosť. Inkubátor obsahoval zariadenie, ktoré automaticky a periodicky menilo polohu vajec rotáciou (otáčaním). Vajíčka sa v inkubátore nechali inkubovať štrnásť dní. Pomocou silného svetelného zdroja sa následne identifikovali vajíčka, obsahujúce mŕtve zárodoky (tieto sa javili ako homogénne, žlté sfarbené – *Obr.31F*), ktoré sa vyradili. Pri živých embryách (po presvietení silným zdrojom svetla, napr. bodovým operačným svetidlom alebo silnou LED baterkou) je viditeľný živý zárodok (*Obr.31E*), ktorý sa môže pohybovať (reagovať na osvetlenie)) sa identifikovalo miesto v oblasti „pupočnej šnúry“ (tzv. CAM krvnej cievy, prechádzajúcej z povrchu škrupiny vajíčka do jeho vnútra až k samotnému zárodok) a pomocou frézy s kamenným kotúčom (je možné ju zakúpiť v „hobby“ predajni) sa vyfrézovalo štvorcové okno o veľkosti približne 0,5cm x 0,5cm (*Obr.31I,J*). Pozor - frézovanie škrupiny je nutné vykonať veľmi opatrne a s častými prestávkami, pretože pokiaľ sa pri frézovaní objaví kvapka krvi, embryo zväčša neprežije. Odfrézovaná časť sa jemne odstránila pinzetou tak, aby nedošlo k prepichnutiu membrány pod škrupinou ostrou časťou odfrézovanej škrupiny (*Obr.31*). Membrána sa jemne navlhčila vatovou tyčinkou, namočenou do minerálneho oleja (*Obr.32N*), aby sa vizualizovala hlavná, tzv. CAM cieva. Do cievy sa pomaly pomocou inzulinovej striekačky aplikovala suspenzia buniek (cca 100 000 buniek v 100µL PBS pufru, *Obr.32O-S*). Po aplikácii buniek sa vyfrézované okno prelepilo (*Obr.32U,V*) kúskom kancelárskej lepiacej pásky (bez prelepenia zväčša dôjde ku kontaminácii povrchu membrány plesňami) a vajcia sa preniesli do inkubátora. Po niekoľkých (1, 2, 3 alebo 7) dňoch (keďže liahnutie kurčiat nastáva na 21. deň od znášky, je potrebné vajcia spracovať najneskoršie do 7 dní od injikovania buniek) sa odstránila ochranná lepiaca páska z odfrézovanej časti škrupiny a injekčnou striekačkou sa aplikovalo 200µL roztoku lektínu, značeného fluorescenčným

rodamínom (*rhodamine-lectin*, koncentrácia = 0,7mg/mL), ktorý slúžil na vizualizáciu krvných ciev v mozgu kuracieho zárodka. Po cca 10 minútach sa vajce opatrne rozbilo naklepnutím o okraj sklenenej nádoby (Obr.33) a zárodok kurčat'a sa usmrtil prestrihnutím krčnej chrbtice. Z hlavy sa jemne (po nastrihnutí kože a chrupkovitej lebky) preparoval mozog a preniesol na podložné mikroskopovacie sklíčko. Sklíčko sa následne prenieslo po mikroskop a bunky sa vizualizovali pomocou konfokálneho mikroskopu (Obr.33). Príklad vizualizácie fluorescenčne značených ľudských nádorových buniek na pozadí rodamínom farbených mozgových ciev je na Obr.34.

#### 11.4 Tropická ryбка ako transplantačný model

Hoci je praktické použitie malej ryбки – zebričky (*Danio rerio*) viazané na prítomnosť chovných zariadení, špeciálnych akvárií a filtračných systémov, v mnohých svetových laboratóriách je možné sa s týmto modelom stretnúť a preto ho pre zaujímavosť uvádzame. Dôvodom je nízka cena tohto živočíšneho modelu, nenáročnosť, rýchlosť rozmnožovania, dostupnosť rôznych typov transgénnych foriem a hlavne optická priehľadnosť tejto ryбки, ktorá umožňuje *in vivo* zobrazovanie (*in vivo imaging*) transplantovaných buniek. Transgénna ryбка, exprimujúca *GFP* proteín (zelený fluorescenčný proteín (*green fluorescent protein*), izolovaný z morskej medúzy *Aequorea victoria*) pod *fli1* promótorom (marker endoteliálnych buniek) v endoteliálnych bunkách je vhodná napríklad na štúdium metastatickej schopnosti ľudských nádorových buniek (Stoletov and Strnadel et al., 2013). Anestézovaná ryбка v skorom vývojovom štádiu, imobilizovaná v agarózovom géli umožňuje niekoľkohodinovú mikroskopickú analýzu pohybu fluorescenčne značených ľudských nádorových buniek. Príklad použitia tohto modelu pri štúdiu nádorových a nenádorových buniek, modifikovaných metódami génového inžinierstva je uvedený v týchto citovaných prácach (Stoletov and Strnadel et al., 2013; Strnadel et al., 2018).

Včasný vývojový štádium tejto ryбки je možné použiť aj na xenograftovanie ľudských nádorových (Obr.35) alebo kmeňových buniek a v určitom časovom intervale (pred maturáciou (dozrievaním) imunitných buniek) aj bez použitia toxického imunosupresie. Príkladom je čiastočne chimerický model, zameraný na štúdium prežívania neurálnych prekursorových buniek (Strnadel et al., 2018). Pre zaujímavosť - v priebehu projektu pôvodne autori plánovali do včasného rybšieho embrya implantovať ľudské pluripotentné kmeňové bunky. Uvedomili si ale, že v tomto prípade by išlo o vytvorenie

pravej chiméry. Etickú otázku tohto experimentu preto konzultovali s Etickou komisiou Kalifornskej univerzity v San Diegu. Aj keď boli závery komisie nejednoznačné, napokon sa autori rozhodli na transplantáciu použiť bunky, ktoré boli prediferencované do neurálnych prekursorov a nehrozil teda vznik – aj keď veľmi dočasný - chiméry s genómom „morskej panny“ (*mermaid chimera*). Na porovnanie, keď podobný experiment (ale s použitím opičích buniek) v roku 2021 urobil v Číne španielsko-americký tím (aby sa vyhol legálnym problémom), vyvolalo to značnú vlnu nevôle a vypukla doslova búrka etických debát (*Benites et al., 2021*).

### **11.5 Eutanázia laboratórnych zvierat**

Ukončenie experimentu, v ktorom sa použili laboratórne zvieratá má byť cieľným a predikovaným procesom. Náhle úmrtie pokusného zvieraťa nie je žiadúcim javom, aj keď sa mu v niektorých typoch experimentov nedá úplne zabrániť. Ukončenie pokusu je za ideálnych podmienok plánovaným procesom, ktorý zabraňuje utrpeniu zvierat. Humánne usmrtenie zvierat v pokuse sa nazýva eutanázia a je vždy realizovaná preškoleným pracovníkom. Existuje viacero spôsobov eutanázie pokusných zvierat a výber najvhodnejšej metódy je niekedy závislý od charakteru samotného experimentu. Napríklad jednu z najčastejšie používaných metód (predávkovanie anestetikami) nie je vždy možné použiť, napríklad v prípadoch, v ktorých je predikovaná interakcia anestetika alebo jeho možný vplyv na skúmaný parameter. Ďalšie najčastejšie formy eutanázie sú cervikálna dislokácia (prerušenie miechy v oblasti krku) a eutanázia pomocou CO<sub>2</sub>.

## **12 Modelovanie Huntingtonovej choroby pomocou iPSc technológie**

Na príklade nasledujúceho projektu (projekt je modelovou kombináciou dvoch reálnych projektov) si ukážeme praktické využitie vyššie spomenutých *in vitro* a *in vivo* techník. Kvôli komplexnosti celej technológie a aj terminológie budú na začiatku opäť zopakované niektoré informácie a historické skutočnosti, ktoré už boli uvedené v predchádzajúcom texte.

Indukovaná pluripotencia patrí medzi tzv. *state-of-the-art* metódy získavania pluripotentných kmeňových buniek. Fakt, že somatická (telová), finálne diferencovaná bunka obsahuje všetky potrebné genetické komponenty ostatných buniek organizmu a je možné ju reprogramovať do štádia pluripotencie dokázal v experimente so žabími

embryami už sir J.B. Gurdon v roku 1962 (Gurdon, 1962). V tomto experimente odstránil jadro neoplozeného vajíčka žaby a nahradil ho jadrom izolovaným z bunky tráviaceho traktu žubrienky. Experiment vyvrátil domnienku, že finálne diferencovanú somatickú bunku nie je možné vrátiť späť do štádia pluripotencie a že osud takejto bunky je už daný jej fenotypom. Okrem toho, tento experiment potvrdil existenciu tzv. epigenetických regulačných mechanizmov. Cytoplazma bunky, ktorá bola príjemcom bunkového jadra dokázala jadro „reprogramovať“ do štádia pluripotentnej bunky, schopnej ďalšieho vývoja vo forme rozličných typov buniek organizmu.

Skutočnú revolúciu pre oblasť regeneratívnej medicíny a *in vitro* modelovania chorôb však spôsobili už spomínané experimenty Dr. Shinya Yamanaku. Tento mladý japonský lekár so svojím tímom veľmi zaujímavým spôsobom (sériovou selekciou kandidátnych génov) dokázal, že na reprogramovanie somatickej bunky stačí sada štyroch transkripčných faktorov (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, and *Klf4*), na jeho počesť dnes nazvaných ako Yamanaka faktory. Na prenos génov kódujúcich tieto štyri faktory použil retrovirálny vektor (retrovírus), ktorým infikoval (transdukoval) somatické bunky kože myši. Po transdukcii tieto bunky vytvorili bunky, rastúce v tzv. kolóniách a exprimujúce znaky embryonálnych kmeňových buniek. Po transplantácii takýchto buniek do organizmu atymických myší došlo k vytvoreniu nádorov (teratómov), pozostávajúcich z buniek troch zárodočných vrstiev (ektodermu, endodermu a mezodermu), čím sa potvrdil pluripotentný charakter pôvodne diferencovaných buniek. Pluripotencia indukovaných pluripotentných kmeňových buniek bola potvrdená aj inými experimentmi – napr. už spomínanými protokolmi *in vitro* diferenciácie do rozličných druhov buniek organizmu alebo vytvorením chiméry (*chimera assay*, pre zaujímavosť - v gréckej mytológii je chiméra netvor, ktorého telo tvorí kombinácia viacerých zvierat).

*Poznámka:* V rámci protokolu, známom aj ako *tetraploid complementation assay* účinkom elektrického prúdu na dvojbunkové embryo myši (so sadou chromozómov 2N) dôjde k vytvoreniu jednobunkového embrya (so 4N sadou chromozómov), ktoré normálne pokračuje vo vývine. Ak sa do takéhoto embrya v štádiu blastocysty sklenenou mikropilárkou injikujú pluripotentné bunky, dôjde k vytvoreniu kompletného organizmu. Keďže tetraploidné bunky takéhoto embya sú schopné vytvoriť zväčša len extraembryonálne tkanivá (napr. placentu), výsledný organizmus chimérickej myši je tvorený bunkami, odvodenými z reprogramovaných buniek. To

znamená, že pokiaľ k vytvoreniu chiméry došlo, potvrdzuje to pluripotentný charakter injikovaných reprogramovaných buniek. Táto technológia sa používa aj pri príprave tzv. transgénnych živočíšnych modelov.

Význam objavu indukovanej pluripotencie je enormný (v roku 2012, necelých 6 rokov po objave bola za tento objav udelená Nobelova cena (rozdělili sa o ňu Dr.Shinya Yamanaka spolu so sirom J.B Gurdonom) a to nielen pre oblasť regeneratívnej medicíny, ale aj pre *in vitro* modelovanie chorôb, pri ktorých je prístup k študovaným bunkám veľmi komplikovaný alebo nemožný. V oblasti regeneratívnej medicíny je obrovským prínosom technológie reprogramovania buniek možnosť prípravy imunologicky autológnych terapeutických buniek. Čo to znamená v oblasti terapie? Znamená to, že pomocou tejto technológie vieme pripraviť terapeutické bunky pre pacienta priamo z jeho kožných buniek. Ak je pacientovo ochorenie spôsobené mutáciou, prítomnou v každej (a teda aj kožnej) bunke, v budúcnosti bude možné tieto mutácie odstrániť a nahradiť mutovanú časť génu opravenou časťou. Už dnes sú k dispozícii technologické možnosti takejto opravy (napr. *Crisper-Cas9* technológia), pre ich použitie v klinických aplikáciách je však potrebné dôkladne otestovať ich efektivitu a bezpečnosť. Možnosť transplantovať pacientovi jeho vlastné bunky je veľmi prínosná z už uvedených, imunologických dôvodov – pri autológnej transplantácii nie je nutná imunosupresívna liečba, ktorá predstavuje značnú záťaž pre pacienta (imunosupresívna liečba je okrem toho spojená s nárastom incidencie nádorov u takýchto pacientov), nehovoriac o finančnej záťaži s ňou spojennej.

V *in vitro* modelovaní chorôb predstavila technológia reprogramovania buniek možnosti, ktoré až doposiaľ neboli technicky uskutočniteľné. Poďme si to prakticky ilustrovať na konkrétnom príklade z laboratória.

V projekte, zameranom na skúmanie elektrofyziológických vlastností striatálnych neurónov pri pacientoch s Huntingtonovou chorobou (neurodegeneratívne, autozomálne dominantné ochorenie, spôsobené zvýšenou frekvenciou CAG oblastí v DNA molekule a výskytom mutovaného proteínu – huntingtínu) sa používali neuróny, izolované z vytvoreného transgénneho potkanieho modelu. Po objave indukovanej pluripotencie vznikla požiadavka na vytvorenie striatálnych neurónov, odvodených z ľudských pacientov.

Prvým krokom bola príprava informovaného súhlasu (*Príloha č.1*), ktorý sa následne poslal na schválenie príslušnou Etickou komisiou. Vyšetrujúci lekár (neuroológ) predstavil pacientom možnosť participovať na výskumnom projekte formou darovania malej, cca 2 mm kožnej biopsie. Pacienti boli oboznámení o možnosti zmeniť svoje rozhodnutie a zo štúdie kedykoľvek odísť a zároveň boli ubezpečení, že ich vzorka bude pseudoanonymizovaná (prístup ku klinickým dátam bude mať len ošetrojúci lekár, samotní výskumníci budú pracovať so vzorkou pod kódovým označením). Po dohode s kolegami z Chirurgickej kliniky sa pacient dostavil na odber kožnej biopsie. Tá mu bola odobraná a následne uložená v skúmavke, obsahujúcej bunkové médium DMEM/F12 Glutamax (Gibco, USA), 10% FBS (Sigma-Aldrich, USA) a kombináciu 1% antibiotík a antimykotík (Antibiotic/Antimycotic, Gibco, USA, zmes obsahuje penicilín, streptomycín a amfotericín B). Kožná biopsia sa na ľade preniesla do bunkového laboratória, v ktorom sa následne spracovala v laminárnom boxe triedy BSL-2. Keďže biopsia bola relatívne malej veľkosti, pri jej sterilizácii ponorením do 50% etanolu sa postupovalo opatrne a rýchlo (1-2 sekundy v etanole a následne niekoľkonásobný oplach sterilným PBS pufrom). Biopsia sa potom sterilnou pipetou jemne nasala na koniec špičky a preniesla do 6-jamkovej kultivačnej platničky. Následne sa prevrstvila malým množstvom bunkového média tak, aby neplávala, ale ostala na dne jamky (pokiaľ vzorka kože pláva, nedôjde k migrácii fibroblastov z explantátovej vzorky. V takomto prípade sa vzorka môže „zaťažiť“ sterilným krycím mikroskopickým sklíčkom. Pri väčších vzorkách je preto možné po prenesení vzorky pipetou na platničku nechať tkanivo jemne „prischnúť“ k platničke (cca 5 minút) a potom opatrne zaliať jamku kultivačným médiom).

Po niekoľkých dňoch boli viditeľné proliferujúce bunky, obklopujúce kožnú biopsiu. Médium sa vymieňalo opatrným odsatím starého média a pridaním nového média po kvapkách. V čase, keď konfluencia (percentuálna miera kolonizácie platničky bunkami) dosiahla cca 80%, sa bunky preniesli na nové platničky pomocou trypsinizácie. Jedna platnička sa po trypsinizácii preniesla na tri nové platničky podobnej veľkosti (pomer pasážovania bol teda 1:3). Časť buniek sa kvôli archivácii zamrazila v tekutom dusíku.

Reprogramovanie buniek na indukované pluripotentné kmeňové bunky sa uskutočnilo v siedmej pasáži fibroblastov, pri cca 70% konfluencii buniek. Ešte pred samotným reprogramovaním buniek sa uskutočnil test citlivosti buniek na selekčné antibiotikum



(*puromycín*) v tzv. *killing curve* teste. Gén, kódujúci rezistenciu na puromycín je totiž súčasťou reprogramovacieho vektora. Na jamky 6-jamkovej platničky sa vysadilo rovnaké množstvo buniek (cca 100 000) a tieto bunky sa ďalej kultivovali. Pri konfluencii cca 90% sa k bunkám pridal puromycín v rôznych celkových koncentráciách (1 µg/mL, 0,75 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL atď.). Ako optimálna koncentrácia puromycínu bola (na základe doporučenia výrobcu) vybraná polovičná hodnota koncentrácie, ktorá po 4 dňoch spôsobila usmrtenie cca 50% buniek v jamke (to znamená, že v našom prípade bola evidentná 50% úmrtnosť buniek v jamke, v ktorej bola koncentrácia puromycínu 1 µg/mL, nami hľadaná koncentrácia je jej polovica, čiže 0,5 µg/mL).

Tesne pred transfekciou sa bunky inkubovali v médiu (DMEM, high glucose), obsahujúcom 200 ng/mL B18R proteínu. Tento proteín účinne inhibuje interferónovú odpoveď - reakciu bunky na prítomnosť cudzorodej RNA molekuly (reprogramovacieho vektora). Samotná transfekcia RNA vektora, kódujúceho reprogramovacie faktory (Glis1, Oct-4, Sox-2 a Klf-4) prebiehala nasledovne:

Najprv sa pripravila transfekčná zmes, ktorá pozostávala z týchto komponentov: 250 µL *Opti-MEM* média (Life technologies, USA), 4 µL *Ribojuice™ mRNA Boost Reagent*, 4 µL *RiboJuice™ mRNA Transfection Reagent* (oba produkty sú súčasťou kitu *EMD Millipore RiboJuice™ mRNA Transfection kit (TR1013)*), 0,5 µL *VEE-OXS-iG RNA* (1 µg/ul) a 0,5 µL *B18R RNA* (1 µg/ul) (posledné dve položky sú súčasťou kitu *Simplikon* od firmy Merck). Celkový objem transfekčnej zmesi bol 259 µL. Zmes sa nechala na laboratórnej teplote stáť cca 3-5 minút a následne sa opatrne prikvapkala do jamky 6-jamkovej platničky. Objem média v platničke bol 2,5 mL.

Transfekcia prebiehala po dobu 2-4 hodín v bunkovom inkubátore. Po cca dvoch hodinách sa bunky skontrolovali pod mikroskopom. V prípade, že bola zaznamenaná vysoká mortalita buniek, transfekcia sa ukončila už po 2 hodinách odsatím transfekčnej zmesi a pridaním kultivačného média, ktoré obsahovalo DMEM (high glucose) médium, 10% FBS, 100X Glutamax (Gibco, USA) a B18R proteín (vo finálnej koncentrácii = 200 ng/mL).

Bunky sa následne kultivovali v tomto médiu až dovtedy, kým nedosiahli konfluenciu približne 80-90%. Pri dosiahnutí tejto hodnoty sa pristúpilo k selekcii buniek puromycínom. Bunky, u ktorých bola transfekcia (prenos RNA vektora) úspešná, sú

proti účinkom puromycínu rezistentné. Prídavok puromycínu teda spôsobí úhyn netransfekovaných buniek a tým aj navýšenie percentuálneho zastúpenia transfekovaných (reprogramovaných) buniek. K médiu sa v tomto kroku pridal puromycín tak, aby jeho výsledná koncentrácia bola experimentálne zistená koncentrácia - 0,5 µg/mL.

Počas nasledujúcich dní sa bunky a ich reakcia na prítomnosť selekčného antibiotika pozorovala. Pokiaľ bola zaznamenaná úmrtnosť buniek pod 20%, účinnosť selekcie sa zvýšila pridaním väčšej koncentrácie puromycínu (napr. 0,75 µg/mL). Pokiaľ sa úmrtnosť buniek pohybovala na úrovni 30-60%, koncentrácia puromycínu sa ponechala na úrovni 0,5 µg/mL. Pokiaľ úmrtnosť buniek dosiahla 80-90%, puromycín sa z média odstránil (výmenou média) a v selekcii sa nepokračovalo.

Bunky sa následne kultivovali až do dosiahnutia 70-90% konfluencie, pri ktorej sa mohli pasážovať. Bunky sa pasážovali pomocou enzýmu (trypsín) a premyli sterilným roztokom PBS. Pri tzv. *feeder-free* alebo *xeno-free* variante kultivácie sa bunky zmiešali s komerčne dostupným médiom na kultiváciu indukovaných pluripotentných kmeňových buniek (*mTESR*, *StemCell Technologies*) a následne vysadili na plastové kultivačné platničky, ktoré boli pokryté tenkou vrstvičkou Matrigelu (*hESC-approved Matrigel*, *Corning*). Reprogramované bunky je možné vysadiť aj na platničky, ktoré sú pokryté vrstvou želatíny a porastené myšacími embryonálnymi fibroblastami (*MEF feeder cells*), ktoré sú schopné sekréciou určitých faktorov (napr. *LIF*) udržať pluripotentný charakter reprogramovaných buniek. Platničky sa pripravili minimálne v predstihu dvoch dní pred plánovaným pasážovaním pluripotentných buniek. Pred samotným pasážovaním sa médium, v ktorom sa MEF bunky pasážovali odsalo, bunky sa opatrne premyli PBS pufrom a následne sa aplikovalo kultivačné médium s reprogramovanými bunkami. Médium obsahovalo DMEM/F12 Glutamax, 1% P/S, 10% KOSR (*knock out serum replacement*), 1% NEAA (*non essential amino acids*), merkaptotanol a 20 ng/mL bFGF. Výmena média sa realizovala každý deň, pričom bolo nutné zachovať opatrnosť pri odsávaní a pridávaní média tak, aby nedošlo k odlúpnutiu vrstvy MEF buniek z povrchu platničky.

Viditeľné kolónie pluripotentných buniek sa začali objavovať po cc 7-10 dňoch po pasáži (podobný príklad je na *Obr.3E,F*). Kolónie sa nechali dorásť do veľkosti viditeľnej voľným okom (cca niekoľko mm). Pri manuálnom pasážovaní kolónií sa

postupovalo nasledovným spôsobom. Najprv sa pod invertovaným svetelným mikroskopom našli oblasti s kolóniami, ktoré nevykazovali znaky diferenciácie (Obr.30, tieto kolónie sú viditeľné ako hnedasté oblasti, obsahujúce niekedy aj mechúrikovité 3D objekty) a miesto ich výskytu na platničke sa na mikroskope zospodu označilo pomocou čierneho označovača. V laminárnom boxe sa miesta s označenými kolóniami manuálne zoškrabali (sklenenou kapilárkou, sterilnou špičkou a podobne) a následne sa médium s obsahom zoškrabaných kolónií odsalo a plávajúce kolónie nechali usadiť (sedimentovať). Z takto usadených kolónií sa opatrne odsalo médium a pridalo sa nové médium a bunky sa vysadili na neprilňavé (*ultra-low attachment*) platničky. V týchto platničkách bolo možné po niekoľkých dňoch pozorovať vznik tzv. embryonálnych teliesok (*embryoid bodies*). V platničkách sa embryonálne telieska kultivovali po dobu 9 dní, potom sa médium obsahujúce telieska odsalo a tieto sa nechali voľne sedimentovať. Po sedimentácii teliesok sa supernatant odsal, pridalo sa nové kultivačné médium a embryonálne telieska sa vysadili na platničky, pokryté ornitínom a laminínom. Po niekoľkých dňoch boli v okolí prisadnutých embryonálnych teliesok viditeľné malé epiteliálne bunky s tzv. rozetovým (*rosette*) fenotypom (rozeta je koláč zvláštneho, akoby hviezdicového tvaru, podľa ktorého sa pomenoval fenotyp resp. usporiadanie malých neurálnych prekursorov v okolí embryonálneho telieska). Neurálne prekursory sa nechali expandovať a následne sa pasážovali a ďalej expandovali.

Samotná diferenciácia do neurónov prebiehala v komerčne dostupnom diferenciačnom médiu (táto možnosť je finančne výhodnejšia, ako príprava vlastného diferenciačného média). Média na diferenciáciu neurálnych prekursorov do neurónov ponúka mnoho firiem, napr. firma *Stem cell Technologies* z Kanady. Výsledkom diferenciácie boli funkčné neuróny, ktorých aktivita sa potvrdila metódou *patch clamp* (táto metóda meria akčné potenciály neurónov, na Slovensku je zavedená napr. na Neurobiologickom ústave SAV v Košiciach).

## 13 Etické a právne súčasti práce s bunkovými kultúrami

### 13.1 Informovaný súhlas pacienta s experimentálnou štúdiou

Akýkoľvek experiment, ktorý zahŕňa použitie pacientov, ľudských vzoriek alebo laboratórnych zvierat musí byť predložený a schválený tzv. etickou komisiou (Príloha 1). Bez súhlasu etickej komisie nie je možné experimenty realizovať. To isté platí o modifikácii pôvodného výskumného zámeru resp. protokolu. Každá takáto zmena musí byť opätovne posúdená príslušnou (napr. fakultnou) etickou komisiou. Realizácia experimentov, ktoré neboli posúdené a odsúhlasené takouto komisiou môže vyústiť až do trestoprávneho konania.

Vytvorenie informovaného súhlasu nie je veľmi zložitý, napriek tomu má svoje špecifiká a niekedy je to značne dynamický proces. V každom prípade je dobré jeho príprave venovať dostatočne dlhý čas a zvážiť všetky okolnosti, ktoré môžu v riešení projektu nastať. Veľkou pomocou je rada skúsenejších kolegov, prípadne členov príslušnej etickej komisie. Niekedy sa však nie je možné úplne vyhnúť opätovnému predloženiu informovaného súhlasu etickej komisii z iných resp. ďalších objektívnych dôvodov.

*Príklad z laboratória:* V projekte prípravy indukovaných pluripotentných kmeňových buniek z kožných excízií pacientov s amyotrofickou laterálnou sklerózou (ALS) sa pripravil nový bunkový model (bunková línia), ktorá bola následne plne charakterizovaná a manuskript pripravený na zaslanie do recenzného konania v zahraničnom časopise s IF\*. Pri nahrávaní manuskriptu do tzv. *submission* systému boli autori vyzvaní k predloženiu kópie prekladu informovaného súhlasu, podpísaného samotným pacientom, a obsahujúceho položku, že pacient súhlasí, že pluripotentné kmeňové bunky s jeho genómom budú transplantované do organizmu laboratórneho zvieratá. Keďže originálny informovaný súhlas takúto klauzulu neobsahoval, autori sa rozhodli publikovať v inom vedeckom časopise. Následne však pripravili upravený informovaný súhlas a predložili ho na schválenie príslušnou etickou komisiou, aby už nič nebránilo publikovať budúce štúdie v pôvodne vybranom vedeckom časopise.

\*IF (alebo *Impact Factor*) je prostriedok hodnotenia kvality vedeckého časopisu. Jeho hodnota v danom roku sa vypočítava podľa nasledujúceho vzorca: **IF (2021) = počet citácií v roku 2021 pre články, publikované v roku 2020 a 2021 delený počtom**

*citovateľných publikácií za rok 2020 a 2019.* Meria frekvenciu citovanosti časopisu v danom roku. Aj keď sa názory na IF ako indikátor kvality časopisu rôznia (napr. sú známe raritné, extrémne zvýšenia IF v inak priemerne impaktovaných časopisoch (<https://www.nature.com/articles/466179b>) a problémom ostáva organizované, cielené citovanie v rámci tzv. predátorských časopisov), vo všeobecnosti je považovaný za jeden z najlepších doteraz vyvinutých indikátorov. Informácie o IF daného časopisu poskytuje spoločnosť Clarivate Analytics (Thomson Reuters) cez stránku ISI Journal Citation Reports. Informácie o IF, uverejnené na webových stránkach menej známych resp. neznámych časopisov je potrebné vždy overiť resp. na publikovanie uprednostniť overené vedecké časopisy.

### **13.2 Etické problémy v regeneratívnej medicíne**

Príprava terapeutickej bunkovej línie, ktorá má byť následne transplantovaná do pacienta je značne komplexný a komplikovaný proces. Aj keď technologicky je takáto príprava už zvládnutá a prebieha v špeciálnych, tzv. GMP (*Good Manufacturing Practice*) laboratóriách, v prípade niektorých terapií, ktoré sú založené na použití embryonálnych, či fetálnych buniek (alebo aj tkanív) trvalým problémom ostáva naša neschopnosť predikovať vznik mutácií, ktoré môžu viesť až k vytvoreniu nádoru v mieste transplantácie. Okrem toho, transplantácia buniek, odvodených z pluripotentných kmeňových buniek v sebe nesie určité riziko vzniku nádoru (teratómu), zloženého z troch zárodočných vrstiev (ektodermu, endodermu a mezodermu). Z týchto a iných dôvodov (hlavne etických) je výskum takýchto terapeuticky aplikovateľných buniek veľmi problematický. V roku 2011 sa spoločnosť GERON (známa prvými klinickými testami s použitím embryonálnych kmeňových buniek) vyjadrila, že končí s klinickými testami a zastavuje svoj výskumný program terapeuticky využiteľných kmeňových buniek (Scott *et al.*, 2014).

Diferenciačný potenciál pluripotentných kmeňových buniek je však možné využiť aj bez použitia eticky problematických embryonálnych kmeňových buniek, ktoré sa získavajú z nepoužitých embryí, pripravených v rámci *in vitro* fertilizácie. Tieto bunky sa totiž dajú v plnej miere nahradiť už skôr spomenutými indukovanými pluripotentnými kmeňovými bunkami. Objav Dr. Shinya Yamanaku ukázal, že ak existuje vôľa, vo vede vždy existuje aj cesta alebo alternatíva v prospech pacienta.

S akými etickými otázkami sa však môžu stretnúť študenti v rámci projektu diplomovej alebo doktorskej (PhD) práce? Pár príkladov z praxe a spôsob, akým sa nasledujúce situácie vyriešili sú uvedené v nasledujúcom texte:

*Príklad číslo 1:* Pacient (darca) kožnej biopsie, z ktorej sa derivovali indukované pluripotentné kmeňové bunky sa pri prezentácii projektu dozvedel, že bunky, odvodené z jeho kože budú súčasťou experimentov, v ktorých sa budú transplantovať do miechy prasaťa. Pacient sa z religióznych dôvodov (bol moslimom) rozhodol svoju účasť na projekte ukončiť (takáto možnosť musí byť zakotvená v každom informovanom súhlase). Keďže išlo o mimoriadne zaujímavú bunkovú líniu s unikátnym mutačným genetickým pozadím, poprosili sme pacienta o zváženie a uistili ho o tom, že na *in vivo* testovanie jeho buniek budú použité len myši. Pacient súhlasil a štúdia mohla pokračovať.

*Príklad číslo 2:* Pri darovaní reziduálneho nádorového tkaniva (tkanivo, nevyužitú patológom pri príprave vzorky na histologickú evaluáciu ochorenia) sme sa (najmä v prípade mladších pacientov) pri podpise informovaného súhlasu stretli s prípadmi, v ktorých takíto pacienti vyjadrili svoju ľútosť nad faktom, že bunkové línie derivované z takýchto nádorov budú testované *in vivo*, na malom množstve laboratórnych myší (za účelom overenia schopnosti derivovaných bunkových línií vytvoriť nádor, ekvivalentný s pôvodným ľudským nádorom).

Vyjadrená ľútosť nad použitím laboratórnych zvierat je veľakrát iba dôsledok neúplnej informovanosti pacienta a jeho skreslených informáciách o tom, aká je skutočná realita. V mnohých prípadoch však ide o skutočné presvedčenie a súčasť životnej filozofie, súčasťou ktorej sú zvieratá vnímané ako „spolupútnici“ a nie ako nižšie formy života, ktoré má človek právo kedykoľvek využiť vo svoj prospech. Vedecký tím sa (opäť aj vzhľadom na unikátnosť darovanej vzorky) rozhodol uistiť pacientov, že v ich prípade na testovanie bunkovej línie nebudú použité *žiadne* zvieratá a potrebné histologické testy budú realizované na nádoroch, kultivovaných *in vitro* vo forme 3D nádorových sféroidov pomocou optimalizovaných protokolov. Dá sa povedať, že na prvý pohľad - z vedeckej stránky - absurdná požiadavka napokon viedla k optimalizácii 3D kultivačných protokolov tak, aby sa celkovo znížil počet použitých laboratórnych zvierat aj v budúcnosti.

*Príklad č.3:* V praxi je možné stretnúť sa aj s pacientmi, ktorí zásadne odmietajú poskytnúť svoju biologickú vzorku na výskum. Ide najmä o prípady nevyliciteľne chorých pacientov, ktorí už stratili akúkoľvek nádej na vyliečenie. V takýchto prípadoch je potrebné pristupovať veľmi citlivo a je veľkým umením lekára presvedčiť pacienta o tom, aké je dôležité bojovať (aj formou podpory vedeckého výskumu) s chorobou až do konca.

V niektorých prípadoch je dôvodom pacientovho odmietnutia aj strach z invazívneho zákroku (takým možno nazvať aj odber malej kožnej vzorky). Tí istí pacienti však bez problémov darovali vzorku krvi. Riešenie danej situácie spočívalo v úprave reprogramovacích protokolov tak, aby sa reprogramovanými bunkami stali T a B lymfocyty, NK bunky, monocyty a dendritické bunky. Zhodou okolností sa rovnaký protokol následne použil v projekte, v ktorom hlavnú úlohu hrali detskí pacienti (u ktorých je požiadavka kožnej biopsie na vedecké účely nemožná a neetická).

## 14 Štruktúra a vybavenie bunkového laboratória

Typické minimalistické vybavenie bunkového laboratória je možné popísať prítomnosťou niektorých základných prístrojov. Takým je napríklad laminárny box (*laminar hood*), ktorého HEPA filtrovací systém a cirkulácia zabezpečuje sterilné prostredie, nevyhnutné na prácu s bunkovými kultúrami (Obr.36A). Laminárny box triedy BSL-2 (*biosafety level – 2*) okrem toho pracuje v režime negatívneho tlaku vzduchu (nasáva vzduch z miestnosti a vedie ho cez systém HEPA filtrov), čím zároveň chráni pracovníka pred expozíciou rôznymi formami biologických hrozieb (vírusy, baktérie). Laminárny box obsahuje ľahko čistiteľnú nerezovú plochu a jeho súčasťou je zväčša automatický pipetor. Krabičky so špičkami, odpadové nádoby a iné položky nevyhnutné pre prácu sa skladujú ľahko prístupné, ale mimo priestor laminárneho boxu (najlepšie v skrinkách, kde sú chránené pred prachom. Krabičky je možné proti náhodnému otvoreniu zabezpečiť kúskom lepiacej pásky). Skladovanie krabičiek mimo priestor laminárneho boxu je doporučené z dôvodu efektívnej sterilizácie UV žiarením pomocou zabudovanej UV žiarivky (pohľad na laminárne boxy, zaplnené krabičkami so špičkami, pipetami a pomocným materiálom nesvedčí o veľkej profesionalite používateľov a sterilite pracovného prostredia). Laminárny box môže obsahovať odpadovú sklenenú fľašu, napojenú na zdroj vákua, pričom vstupná hadička odsávania je chránená pred kontamináciou vákuového systému vymeniteľnými filtrami. Odpadová fľaša musí byť ľahko vyberateľná (rýchle odpojenie z pripojených hadičiek) z dôvodu jej vyprázdnenia a vyčistenia.

Ďalším esenciálnym prístrojom, potrebným na prácu v bunkovom laboratóriu je bunkový inkubátor (*cell incubator*, Obr.36F). Tento prístroj, ktorého meno je odvodené od latinského slova *Incubus* (desivý démon) v skutočnosti mimikuje podmienky v živom organizme (teplotu, koncentráciu O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> a 100% vlhkosť), čím zabezpečuje rast buniek v *in vitro* podmienkach. Prístroj je napojený na tlakovú CO<sub>2</sub> bombu s obsahom plynu medicínskej (nie technickej) kvality, pričom hadička prívodu plynu do inkubátora je opäť zabezpečená (chránená) filtrom. Vo vnútri má prístroj nádobku s vodou, ktorej odparovanie zabezpečuje podmienku 100% vlhkosti. Vodu v tejto nádobke je potrebné dopĺňať sterilizovanou destilovanou vodou a je dobré, pokiaľ nádobka zároveň obsahuje samosterilizačnú „lodičku“ (dostupnú komerčne) alebo aspoň kúsok medeného materiálu (ten po čase zoxидуje za vzniku zelenej vrstvy, ktorá sterilizuje vodu v nádobke).



Vnútrotný priestor inkubátora je vyrobený z nerezovej ocele alebo samosterilizujúceho medeného plechu. Väčšina pracovníkov preferuje nerezový priestor, keďže medené prevedenie inkubátora po čase získa zvláštnu drsnú, zelenú patinu (tzv. medenku), ktorá pri vyberaní platničiek dokonca vydáva nepríjemný „škrípavý“ zvuk. Je to však práve táto patina, ktorá chráni inkubátor pred kontamináciou pri častom otváraní dverí. Niektorí výrobcovia vsadili na kompromis a predstavili inkubátor, vyrobený zo zmesi medi a nerezu. Takýto inkubátor si čiastočne uchováva vlastnosti medeného inkubátora, ale s estetickými vlastnosťami nerezového inkubátora.

Väčšina kvalitných bunkových inkubátorov je vybavená samosterilizačným parným prípadne chemickým (pomocou  $H_2O_2$ ) cyklom. Tento cyklus je dobré v pravidelných intervaloch (alebo v prípade kontaminácie) aktivovať. Pokiaľ to povaha experimentov nedovoľuje (napr. pri dlhodobých alebo pomaly rastúcich kultúrach), je potrebné inkubátor občas vyčistiť aspoň 70% roztokom etanolu (pri čistení je potrebné vybrať všetky kultivačné nádoby a aj poličky, vymeniť vodu aj vo vaničke a vaničku predtým vyčistiť). Inkubátor je citlivým a esenciálnym zariadením, preto sa odporúča jeho napojenie na elektrickú sieť cez tzv. *UPC* batériový zdroj, ktorý v prípade výpadku prúdu dokáže prístroj ochrániť a prípadne udržať bunky v optimálnych podmienkach do doby skončenia výpadku.

Ďalším zo základných prístrojov, potrebným na prácu v bunkovom laboratóriu je centrifúga (*Obr.36D*), najlepšie s možnosťou chladenia a s rôznymi typmi vymeniteľných rotorov (tie umožňujú centrifugovať bunky v rôznych typoch skúmaviek a zároveň centrifugáciu proteínových lyzátov pri vysokých hodnotách preťaženia (násobkoch gravitačného zrýchlenia).

Ďalším prístrojom, potrebným pre prácu v bunkovom laboratóriu je invertovaný optický mikroskop (*Obr.36B*) s objektívami so zväčšením 4x, 10x, 20x a 40x. Mikroskop umožňuje pozorovanie buniek, sledovanie priebehu trypsinizácie buniek pri pasážovaní a ak je napojený na digitálnu kameru a riadiaci počítač, tak aj fotodokumentáciu buniek v rozličných štádiách. Pracovná plocha mikroskopu musí umožniť upevnenie a následné pozorovanie aspoň základných typov kultivačných nádob (napr. 10 cm Petriho misky, 6-jamkovej, 12-jamkovej alebo 24-jamkovej platničky, menších kultivačných fliaš (*culture flasks*) a 96-jamkovej mikrotitračnej platničky. Veľkou výhodou je, ak je mikroskop vybavený filtrami a objektívmi na

pozorovanie buniek v tzv. fázovom kontraste (*phase contrast*, takto pozorovaná bunka sa javí ako 3D objekt v čiernobielej farbe, *Obr.3C-F*).

Dewarova nádoba (*Obr.9A*) je zariadenie, umožňujúce dlhodobé uskladnenie mrazených alikvotov buniek v parách tekutého dusíka pri teplote až  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ide v podstate o akúsi sofistikovanú „termosku“, ktorej hrubá izolácia a dizajn vnútorného plášťa umožňuje bez potreby elektrickej energie dlhodobo uskladňovať alikvoty buniek. Jedinou podmienkou je pravidelné dopĺňanie hladiny tekutého dusíka v nádobe. Jedno bunkové laboratórium by malo disponovať minimálne dvoma Dewarovými nádobami (*Obr.9A*) – jedna (s užším hrdlom), sa používa na transport a uskladnenie zásoby tekutého dusíka, druhá nádoba (s hrdlom s väčším priemerom a so stojanmi) slúži na samotnú archiváciu buniek (táto nádoba je statická, neprenáša sa a je umiestnená v uzamknutej miestnosti s dobrým vetraním). Pokiaľ nie je možné Dewarovu nádobu uskladniť v dobre vetranej miestnosti, je nutné na vstupné dvere pripevniť oznam o nevyhnutnosti vyvetrania miestnosti otvorením dverí na dobu niekoľkých minút pred vstupom do miestnosti (*Obr.9E,F*). Kapacita Dewarovej nádoby je závislá na jej objeme, ale prakticky je možné v štandardných Dewarových nádobách uskladniť stovky až tisíce 1mL kryoskúmaviek. Pri výbere Dewarovej nádoby sa riadime jej kapacitou a denným odparom dusíka. Hladina tekutého dusíka sa v Dewarovej nádobe kontroluje pomocou dlhého plastového meradla (po jeho vložení do nádoby a následnom vybratí dôjde ku kondenzovaniu vzdušnej vlhkosti v mieste kontaktu s tekutým dusíkom, čo umožňuje optické odčítanie výšky hladiny dusíka v nádobe). Plnenie Dewarovej nádoby sa realizuje pumpami (ručnými alebo elektrickými), alebo jednoduchým preliatím z inej nádoby (pri tomto postupe je nevyhnutná veľká opatrnosť). Pri práci s tekutým dusíkom je potrebné si chrániť oči okuliarmi a ruky hrubými rukavicami, určenými na tento účel. Miestnosti obsahujúce Dewarovu nádobu musia byť označené upozornením na prítomnosť potenciálne nebezpečného (dusivého) plynu (*Obr.9E,F*).

## **15 Bezpečnosť pri práci v laboratóriu bunkových kultúr**

Realizácia experimentov v bunkovom laboratóriu je spojená s expozíciou pracovníkov s niektorými chemickými látkami a biologickými faktormi, ktoré môžu predstavovať zdravotné riziko rôznej závažnosti. Aj keď v porovnaní s chemickými laboratóriami je miera expozície nebezpečnými látkami podstatne nižšia, riziká spojené s ďalšou

formou nebezpečenstva biologickej povahy (tzv. biohazardu) nemožno vôbec podceňovať. V laboratóriu bunkových kultúr a pri charakterizácii buniek pomocou *in vitro* metód sa študent môže stretnúť s fyzikálnymi, chemickými a biologickými faktormi, ktoré majú potenciál ohroziť zdravie pri každodennej práci. Medzi fyzikálne faktory patrí napr. expozícia UV žiarením pri sterilizácii miestnosti alebo priestoru laminárneho boxu. Niektorí výrobcovia garantujú nepriepustnosť uzavretého čelného skla pri UV sterilizácii laminárneho boxu, nie vždy je však rozumné sa na to spoliehať. Dôvodom je, že v mnohých prípadoch čelné sklo úplne netesní (po uzatvorení laminárneho boxu) a časť žiarenia tak môže prenikať do priestoru miestnosti. Je preto nutné sterilizovať laminárne boxy iba v neprítomnosti personálu v miestnosti. To isté platí aj pre sterilizáciu miestností stropnými UV žiaričmi – pri ich náhodnom zapnutí sa počas silného denného svetla niekedy ani nedajú vstupujúcim personálom vizuálne zaregistrovať, čo môže viesť k expozícii kože a hlavne očí nebezpečným UV žiarením s veľmi nepríjemnými následkami. Riešením je inštalácia programovateľnej zásuvky, ktorá aktivuje UV sterilizáciu miestnosti iba v neskorých nočných alebo veľmi skorých ranných hodinách, keď je miestnosť prázdna. Ďalším riešením je krytý UV sterilizátor, ktorý je vybavený ventilátorom, nasávajúcim sterilizovaný vzduch z miestnosti do krytom chránenej časti, v ktorej prebieha samotná sterilizácia. V každom prípade je nutné o prítomnosti UV zariadenia v miestnosti informovať varovným nápisom na dverách a UV zariadenie resp. jeho časový spínač občas skontrolovať (stali sa prípady, keď pri výpadku prúdu došlo k posunu naprogramovaných hodín automatického žiariča a ten sa zapínal v čase, keď už boli v miestnosti prítomní pracovníci).

Ďalšie fyzikálne riziko predstavujú elektrické aparatúry (elektroforézy), v ktorých je prítomná nebezpečná kombinácia – silne vodivá kvapalina (pufor) a elektródy pod napätím. Aj keď sú tieto aparatúry dizajnované ako maximálne bezpečné, nie je úplne možné vylúčiť riziko zásahu elektrickým prúdom (najmä v prípade poškodených alebo svojpomocne opravených aparatúr). Riziko elektrického šoku hrozí aj pri práci s prietokovými cytometrami alebo sortermi (platničky, ktoré vychylujú sortovací lúč kvapaliny sú pod napätím niekoľkých tisícov voltov. Podľa svedectva operátorov, ktorí sa v „nevhodnej“ chvíli platničiek dotkli ide skutočne o „spomienku na celý život“.

Expozícia laserovým žiarením hrozí opäť najmä operátorom prietokových cytometrov. Cytometre sú dizajnované tak, aby došlo k samočinnému vypnutiu zdroja laserového žiarenia pri otvorení krytu prístroja, ale opäť sú známe prípady, keď došlo

k zablokovaniu poistky a následnej expozícii operátora (v jednom prípade dokonca k expozícii servisného pracovníka, ktorý následkom expozície UV laserom dočasne stratil zrak). Je preto dôležité, aby takéto prístroje boli používané iba preškoleným personálom a v súlade s odporúčaním výrobcu.

Expozícia fluorescenčným žiarením môže nastať pri práci s fluorescenčným mikroskopom alebo konfokálnym mikroskopom. Pri manipulácii so sklíčkom je preto dôležité prerušiť zdroj žiarenia na to určenou clonou (*shutter*), pretože je možný odraz žiarenia kovovými náramkami hodínok alebo prsteňmi. Najmä v prípade fluorescencie v UV oblasti žiarenia môže ísť o nebezpečnú expozíciu.

Prietokový cytometer môže byť zdrojom aj tzv. *infrazvuku* (mechanického vlnenia v oblasti 16-20 Hz). Infrazvuk nie je ľudské ucho schopné zachytiť, jeho negatívny vplyv na ľudský organizmus však už bol dokázaný v prípade iných zdrojov (napr. v okolí veterných elektrární). Keďže niektoré (hlavne sortovacie) experimenty môžu trvať až niekoľko hodín, ide pravdepodobne o nezanedbateľnú expozíciu týmto fyzikálnym faktorom.

Fyzikálne nebezpečenstvo predstavuje aj možná expozícia kože alebo očí tekutým dusíkom s veľmi nízkou teplotou (-196°C). Je zaujímavé, že pokiaľ ide o expozíciu nechránenej kože, vrstva potu dokáže okamžite pri kontakte s dusíkom vytvoriť ochrannú vrstvu a človek takmer nezaregistruje účinky takéhoto popálenia. Pokiaľ však dôjde k expozícii tekutým dusíkom na tenkej vrstve oblečenia, toto oblečenie dokáže zvýšiť expozičný čas a účinok tekutého dusíka za súčasného vzniku bolestivých popálenín.

Expozícia nebezpečnými chemickými látkami v laboratóriu bunkových kultúr tiež nie je zanedbateľná a je reprezentovaná najmä nasledujúcimi toxickými a karcinogénnymi zlúčeninami:

*Trypan Blue* (trypanová modrá, farbička používaná pri určovaní viability buniek), *paraformaldehyd* (fixatívum, používané pri imunocytochémií), *metanol* (súčasť blotovacích pufrov pri western blote), *etídium bromid* (interkalačné činidlo pri UV vizualizácii DNA fragmentov na agarózovom géli), *akrylamid* (najmä monoména forma, pri príprave polyakrylamidových gélov), *merkaptetoetanol* (súčasť niektorých

vzorkových pufrov pri western blote) a *fenol* (súčasť roztokov na extrakciu RNA). Pri práci s týmito chemikáliami je vždy nutná zvýšená opatrnosť.

### 15.1 Stupne biologickej bezpečnosti v bunkovom laboratóriu

Biologická bezpečnosť infekčných mikroorganizmov a vírusov je vyjadrená zaradením do tzv. stupňov biologickej bezpečnosti (*biosafety levels, BSL*). Existujú štyri hlavné kategórie alebo BSL stupne (BSL-1, BSL-2, BSL-3 a BSL-4). BSL-1 je najnižším stupňom a takto označený pracovný priestor môže byť tvorený otvoreným laboratórnym stolom, na ktorom sa pracuje napr. s baktériou *Escherichia coli*. Stupňom BSL-1 sú označené mikroorganizmy a vírusy, ktoré u zdravého jedinca nespôsobujú ochorenie. BSL-2 stupňom označujeme patogény, ktoré dokážu preniknúť rôznymi cestami do ľudského organizmu a spôsobiť ochorenie. Príkladom patogénov v tejto kategórii je baktéria tetanu a vírus hepatitídy. Pracovisko označené triedou BSL-2 už musí spĺňať minimálne technické požiadavky na prístrojové vybavenie (napr. laminárny box triedy BSL-2). Triedou BSL-3 označujeme nebezpečné infekčné organizmy (napr. baktérie antraxu), na pracovisku BSL-3 triedy musí byť pracovný priestor filtrovaný systémom HEPA filtrov (HEPA – High Efficiency Particulate Air filters) a musí byť zabezpečená aj ochrana pracovníkov špeciálnymi respirátormi. Do najvyššej triedy (BSL-4) patria extrémne nebezpečné infekčné mikroorganizmy a vírusy – napr. vírus *Ebola* alebo *Herpes B* vírus. Pracovisko s certifikáciou BSL-4 musí byť hermeticky uzavreté, aby nedošlo k úniku patogénov, pracovníci musia používať špeciálne pretlakované oblečenie a po skončení práce musia prejsť cez dekontaminačnú sprchu. Príkladom takéhoto pracoviska je Centrum pre kontrolu a prevenciu chorôb v Atlante (USA) alebo Štátny virologický a biotechnologický výskumný ústav v Kolčove (Ruská federácia).

Pre oblasť bunkových kultúr a bunkového inžinierstva majú najväčší význam pracoviská BSL-1 a najmä BSL-2, v ktorých je prítomný laminárny box triedy BSL-2. Súčasťou BSL-2 laboratória by mala byť aj očná a celotelová sprcha. Materiál, ktorý prišiel do styku s biologicky potenciálne nebezpečnými patogénmi sa musí pred opustením laboratória dekontaminovať (sterilizovať) v parnom autokláve alebo pomocou chemických roztokov. Samozrejmosťou by mali byť pravidelné školenia (bezpečnosť, nakladanie s odpadmi, zmeny v legislatíve) pracovníkov v týchto laboratóriách.

## 16 Záver

Výskum v oblasti bunkových kultúr a bunkového inžinierstva je fascinujúcou cestou k poznaniu bunkovej biológie a patológie ľudských ochorení. Svojou komplexnosťou a množstvom používaných metód umožňuje študentom získať praktické skúsenosti takmer vo všetkých, v laboratóriách používaných experimentálnych technikách. Keďže túto časť výskumu zatiaľ nie je možné úplne automatizovať, zohráva v nej ľudský faktor (alebo „*human touch*“), nadšenie a motivácia veľmi veľkú rolu. Nadšení mladí ľudia so silnou motiváciou sú v tejto oblasti najväčšou zárukou objavov, kompatibilných so svetovou vedou.

## 17 Zoznam použitej literatúry

- Ambrose C. T. (2019). An amended history of tissue culture: Concerning Harrison, Burrows, Mall, and Carrel. *Journal of medical biography*, 27(2), 95–102. <https://doi.org/10.1177/0967772016685033>
- Athanasopoulos, T., Munye, M. M., & Yáñez-Muñoz, R. J. (2017). Nonintegrating Gene Therapy Vectors. *Hematology/oncology clinics of North America*, 31(5), 753–770. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.06.007>
- Benitez, R., Martinez Martinez, L., Nuñez Delicado, E., Berggren, W. T., Schwarz, M., Ai, Z., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2021). Chimeric contribution of human extended pluripotent stem cells to monkey embryos ex vivo. *Cell*, 184(13), 3589. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.011>
- Bouard, D., Alazard-Dany, D., & Cosset, F. L. (2009). Viral vectors: from virology to transgene expression. *British journal of pharmacology*, 157(2), 153–165. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.349>
- Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuña, J. M., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., Martinez-Avila, N., & Martinez-Fierro, M. L. (2020). The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9739. <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>
- Carrel, A., & Burrows, M. T. (1911). CULTIVATION OF TISSUES IN VITRO AND ITS TECHNIQUE. *The Journal of experimental medicine*, 13(3), 387–396. <https://doi.org/10.1084/jem.13.3.387>
- Gähwiler B. H. (1999). Nerve cells in culture: the extraordinary discovery by Ross Granville Harrison. *Brain research bulletin*, 50(5-6), 343–344. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(99\)00097-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(99)00097-0)
- Gurdon J.B. (1962) The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology*, 10, 622-640.
- Malinin T. I. (1996). Remembering Alexis Carrel and Charles A. Lindbergh. *Texas Heart Institute journal*, 23(1), 28–35.
- Mather J. P. (2012). In vitro models. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 30(2), 95–99. <https://doi.org/10.1002/stem.774>
- Morita, E., Arai, J., Christensen, D., Votteler, J., & Sundquist, W. I. (2012). Attenuated protein expression vectors for use in siRNA rescue experiments. *BioTechniques*, 0(0), 1–5. <https://doi.org/10.2144/000113909>
- Ran, X., & Gestwicki, J. E. (2018). Inhibitors of protein-protein interactions (PPIs): an analysis of scaffold choices and buried surface area. *Current opinion in chemical biology*, 44, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.06.004>

- Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N., & Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Advanced drug delivery reviews*, 61(9), 746–759. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.004>
- Scott, C. T., & Magnus, D. (2014). Wrongful termination: lessons from the Geron clinical trial. *Stem cells translational medicine*, 3(12), 1398–1401. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0147>
- Sohn, J., Takahashi, M., Okamoto, S., Ishida, Y., Furuta, T., & Hioki, H. (2017). A Single Vector Platform for High-Level Gene Transduction of Central Neurons: Adeno-Associated Virus Vector Equipped with the Tet-Off System. *PloS one*, 12(1), e0169611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169611>
- Stavnsbjerg, C., Jørgensen, J. S., Engel, T. B., Brus, A., Ringgaard, L., Hansen, A. E., Kjaer, A., & Andresen, T. L. (2022). Matrix effect in tumor lysates - Does it affect your cytokine ELISA and multiplex analyses? *Journal of immunological methods*, 500, 113177. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113177>
- Strnadel, J.; Woo, S.M.; Choi, S.; Wang, H.; Grendar, M.; Fujimura, K. 3D Culture Protocol for Testing Gene Knockdown Efficiency and Cell Line Derivation. *BIO-PROTOCOL* 2018, 8, 78. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2874>
- Strnadel, J., Wang, H., Carromeu, C., Miyanochara, A., Fujimura, K., Blahovcova, E., Nosal, V., Skovierova, H., Klemke, R., & Halasova, E. (2018). Transplantation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Precursors into Early-Stage Zebrafish Embryos. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 65(3), 351–358. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1109-z>
- Strnadel, J., Carromeu, C., Bardy, C., Navarro, M., Platoshyn, O., Glud, A. N., Marsala, S., Kafka, J., Miyanochara, A., Kato, T., Jr, Tadokoro, T., Hefferan, M. P., Kamizato, K., Yoshizumi, T., Juhas, S., Juhasova, J., Ho, C. S., Kheradmand, T., Chen, P., Bohaciakova, D., ... Marsala, M. (2018). Survival of syngeneic and allogeneic iPSC-derived neural precursors after spinal grafting in minipigs. *Science translational medicine*, 10(440), eaam6651. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam6651>
- Strnadel, J., Zahumenska, R., Nosal, V., Smolar, M., Marcinek, J., Kalman, M., Juhas, S., Juhasova, J., Studenovska, H., Dumortier, H., Chromec, T., Skovierova, H., Mitruskova, B., Kapralik, I., Mersakova, S., Brany, D., & Halasova, E. (2020). Generation of ORIONi001-A induced pluripotent stem cell line for in vitro modeling of sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis. *Stem cell research*, 48, 101981. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101981>
- Strnadel, J., Dumortier, H. M., Hajduchova, D., Zahumenska, R., Nosal, V., Smolar, M., Marcinek, J., Kalman, M., Mersakova, S., Brany, D., Juhas, S., Juhasova, J., Studenovska, H., Mitruskova, B., Suroviakova, S., Novakova, S., Skovierova, H., Kurca, E., Pecova, R., Plank, L., ... Halasova, E. (2022). In vitro modeling of amyotrophic lateral sclerosis with induced pluripotent stem cell technology-derived cell line ORIONi002-A. *Stem cell research*, 63, 102870. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2022.102870>



Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Zahumenska, R., Kalman, M., Marcinek, J., Mersakova, S., Kertys, M., Pindura, M., Palkoci, B., Kycina, R., Vojtko, M., Chromec, T., Dumortier, H. M., Skovierova, H., Novakova, S., Mitruskova, B., Kapralik, I., Loderer, D., Grendar, M., Brany, D., Mokry, J., Bouvet, M., ... Strnadel, J. (2022). Establishment of PANDA - a new human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line with 3D cell culture technology. *Neoplasma*, 69(1), 165–173. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2021\\_210924N1360](https://doi.org/10.4149/neo_2021_210924N1360)

Zhang, B., Metharom, P., Jullie, H., Ellem, K. A., Cleghorn, G., West, M. J., & Wei, M. Q. (2004). The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. *Genetic vaccines and therapy*, 2(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-2-6>

## 18 Obrazová príloha

### Príloha č.1 Príklad informovaného súhlasu a informácie pre pacienta

#### INFORMÁCIA PRE PACIENTA

Vážená pani/ Vážený pán

Ďakujeme Vám za Vaše rozhodnutie prispieť k biomedicínskemu výskumu formou darovania biologickej vzorky. Keďže biologické vzorky sú nevyhnutným predpokladom ďalšieho vedeckého výskumu, veľmi si Vaše rozhodnutie vážime.

Projekt pod názvom „**Vytvorenie nových bunkových línií 3D technológiou a reprogramovaním buniek a ich charakterizácia na úrovni *in vitro* a *in vivo***“ je zameraný na vytvorenie nových diferencovaných, nediferencovaných a pluripotentných bunkových modelov ľudských ochorení metódami indukovanej pluripotencie a 3D kultivácie, s ich následným použitím pri vývoji nových terapeutických prípravkov a liečiv u nás, i v zahraničí. V prípade úspešnej izolácie sa novovyvinuté bunkové modely stanú súčasťou biobankového depozitára Jesseniovej lekárskej fakulty v Martine a zároveň sa ponúknu domácim a zahraničným spolupracujúcim vedeckým pracoviskám, svetovým biobankovým centráram (napr. ATCC) a charitatívnym organizáciám, ktoré pracujú v tejto oblasti výskumu.

Svojím súhlasom s účasťou na projekte formou darovania biologickej vzorky, ktorou môže byť i) **moč** alebo ii) **krv** (do 10mL), (iii) **sliny** prípadne (iv) **ster z ústnej dutiny**, (v) **malá vzorky vlasov**, (vi) **vypadnutý alebo extrahovaný zub**, vzorka (vii) **patologického tkaniva**, alebo (len v ojedinelých prípadoch a len v prípade dospelých pacientov) **malá** (viii) **biopsia kože** (cca 3-5mm), môžete významne prispieť k výskum rôznych ochorení. Odber kožnej vzorky v prípade potreby u dospelých pacientov zrealizuje chirurg vyšíknutím malého množstva kožného tkaniva (vzorka o rozmeroch 3-5mm v priemere). Pri alebo po odbere kožnej biopsie nie je predpoklad vzniku väčších komplikácií, môže sa výnimočne vyskytnúť mierne krvácanie alebo bolesť miernej až strednej intenzity, vo veľmi zriedkavých prípadoch infekciu v mieste rany. Pri darovaní patologickej vzorky tkaniva Vás chceme ubezpečiť, že použitie takejto vzorky nijakým spôsobom neohrozí samotný proces diagnostiky a liečebného procesu Vášho ochorenia a prístup k danému typu vzorky bude vždy závisieť na rozhodnutí patológa.

Vaše osobné údaje budú použité v súlade so zákonom č. 428/2002 Z.z. NR SR „o ochrane osobných údajov“. Prístup k anonymizovaným informáciám spojených s diagnostikou Vášho ochorenia bude výhradne cez Vášho šetrujúceho lekára.

Za Vašu ochotu a pomoc Vám ďakujem v mene celého riešiteľského kolektívu. Je pre nás cťou, že ste sa rozhodli bojovať s Vašou chorobou aj týmto spôsobom a zároveň prispieť k vedeckému poznaniu patológie ochorení. Zároveň pripomíname, že máte právo svoju účasť na štúdiu kedykoľvek ukončiť na základe Vášho rozhodnutia.

.....

Martinské centrum pre biomedicínu, JLF UK v Martine

Zodpovedný riešiteľ

## INFORMOVANÝ SÚHLAS

Podpísaný/á/(meno a priezvisko) .....

bytom v (adresa) .....

som bol/a podrobne informovaný/á o zameraniach a cieľom tejto štúdie a súhlasím s účasťou v tomto projekte s názvom „**Vývoj nových bunkových línií 3D technológiou a reprogramovaním buniek a ich charakterizácia na úrovni *in vitro* a *in vivo***“, ktorého cieľom je vývoj nových bunkových modelov na výskumné účely. Projekt umožní vývoj nových bunkových línií, ktoré sa ďalej použijú na testovanie nových liekov a prispievajú aj k lepšiemu pochopeniu molekulárnej podstaty ochorenia. Všetkému som porozumel/a a súhlasím s darovaním malého množstva biologickej vzorky – ktorou môže byť podľa situácie i) **moč** alebo ii) **krv** (do 10mL), (iii) **sliny** prípadne (iv) **ster z ústnej dutiny**, (v) **malá vzorky vlasov**, (vi) **vypadnutý alebo extrahovaný zub**, vzorka (vii) **patologického tkaniva**, alebo (len v ojedinelých prípadoch a len v prípade dospelých pacientov) **malá** (viii) **biopsia kože** (cca 3-5mm), môžete významne prispieť k výskumu rôznych typov ochorení.

Pri alebo po odbere kožnej vzorky nie je predpoklad vzniku väčších komplikácií, môže sa veľmi zriedka vyskytnúť mierne krvácanie alebo bolesť miernej až strednej intenzity, vo veľmi zriedkavých prípadoch infekcia v mieste rany. V projekte použijeme Vami darované tkanivo alebo nadbytočné tkanivo z procesu patologickej charakterizácie na základe predchádzajúceho rozhodnutia patológa. Chceme Vás ubezpečiť, že použitie vzorky zvyšného tkaniva nijakým spôsobom neohrozí samotný proces diagnostiky a charakterizácie Vášho ochorenia.

Súhlasím s tým, aby sa v prípade úspešnej izolácie bunkovej kultúry táto kultúra charakterizovala a testovala *in vitro* na prítomnosť bunkových patogénov (mykoplazmy,

baktérie, vírusy) a *in vivo* (na malom množstve laboratórnych zvierat, v rámci schváleného projektu) a použila podľa uváženia vedeckého tímu a poskytla na vedecké účely spolupracujúcim pracoviskám, svetovým bunkovým depozitovým centrám (napr. ATCC, hPSC<sup>reg</sup> a pod.) a charitatívnym organizáciám (napr. NETRF), ktoré pracujú v oblasti výskumu týchto typov ochorení. Súhlasím s možnosťou patentovania biologických produktov, odvodených z darovanej vzorky. Súhlasím s tým, že v prípade vzniku patentovateľného produktu z darovanej vzorky budú výhradnými vlastníkmi patentových práv členovia výskumného tímu, t. j. že darovaním vzorky Vám nevznikajú práva na potenciálne patentovateľný produkt.

Súhlasím s použitím mojich osobných údajov v súlade so zákonom č. 428/2002 Z.z. NR SR „o ochrane osobných údajov“ a použitím zistených výsledkov tohto výskumu na vedecké a publikačné účely na úrovni vedeckej obce doma i v zahraničí. Súhlasím s tým, aby som bol v prípade potreby znova kontaktovaný cez môjho ošetrojúceho lekára. Som si vedomá/ý, že svoju účasť na štúdiu môžem ukončiť na základe vlastného rozhodnutia. Všetky mne neznáme pojmy mi boli vysvetlené a v primeranom rozsahu som im porozumel/a.

Martin, dňa .....

podpis účastníka projektu

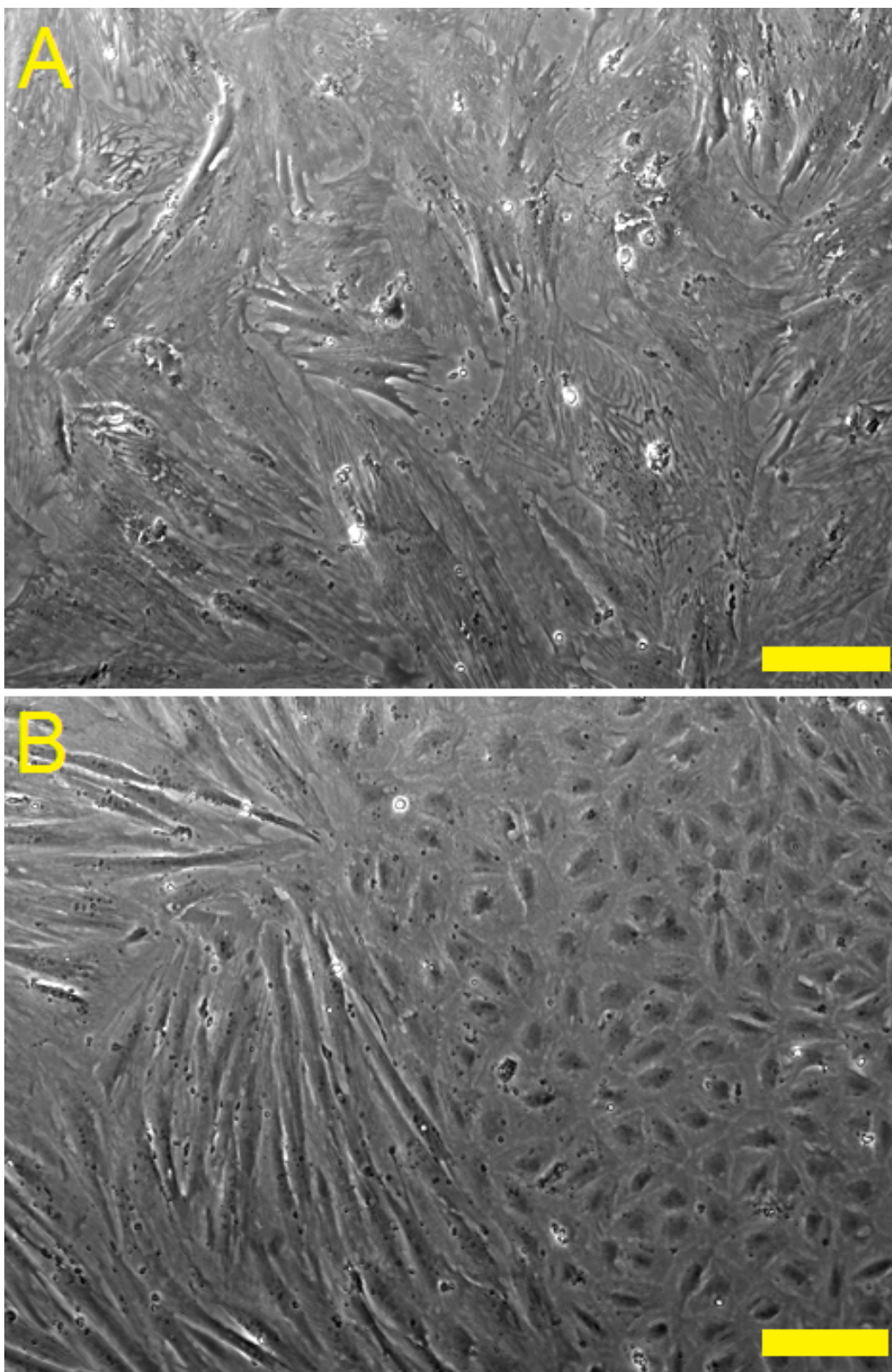
resp. zákonného zástupcu (v prípade detských pacientov)

Účastníka projektu som informoval/a/ o účeloch a cieľoch

Martin, dňa .....

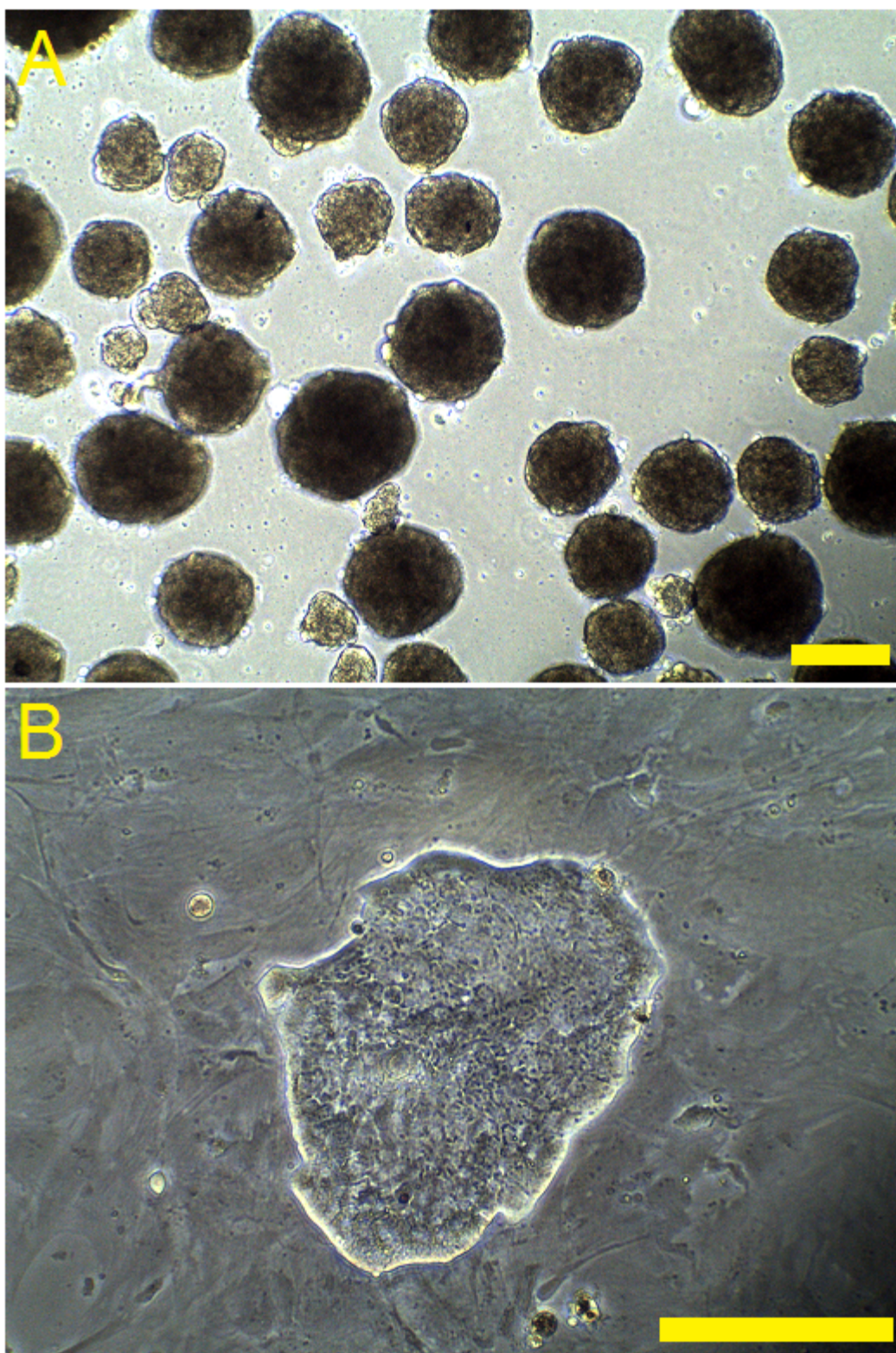
podpis vyšetrujúceho lekára

## OBRAZOVÁ PRÍLOHA



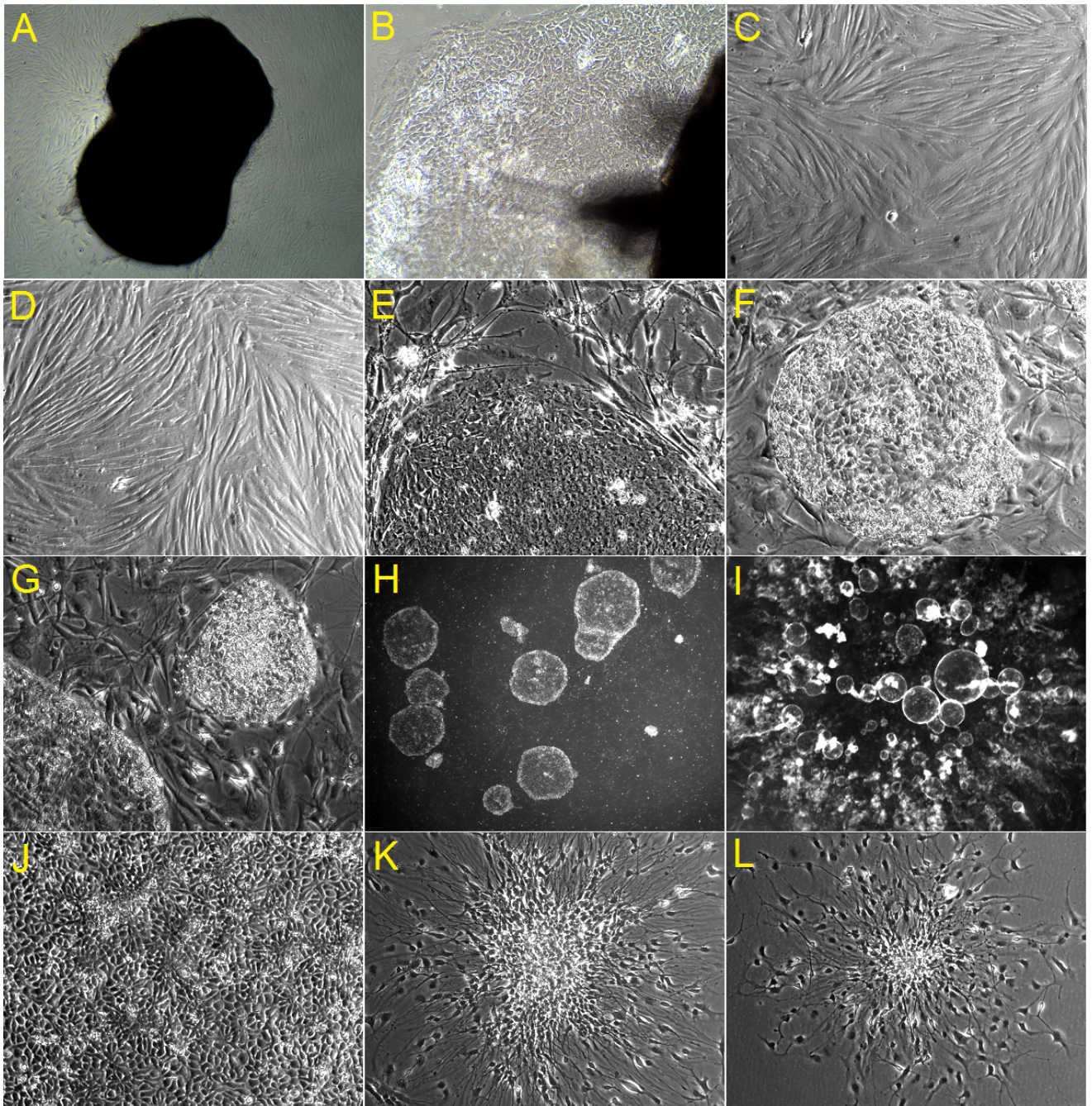
Obr.1 Primárne bunky 2D kultúry, izolované z kožnej excízie (A) a tkaniva nádoru (B). Mierka predstavuje 50  $\mu\text{m}$ . (C) autor





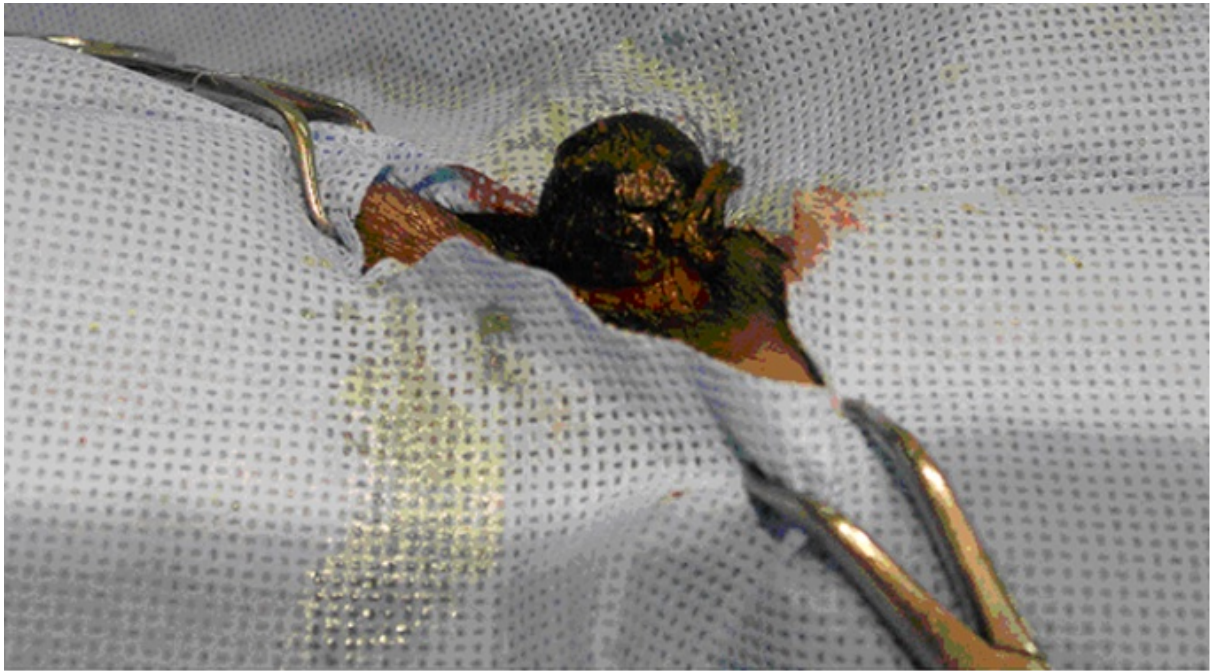
Obr.2 Príklady 3D kultúry. (A) suspenzná 3D kultúra (sféroidy), tvorená primárnymi nádorovými bunkami z nádoru pankreasu, a (B) kolónie buniek, izolované z duktálneho adenokarcinómu a rastúce vo viacerých vrstvách na sebe. Okolo kolónie sú viditeľné aj stromálne bunky z nádorového tkaniva. Mierka predstavuje 500  $\mu\text{m}$ . (C) autor





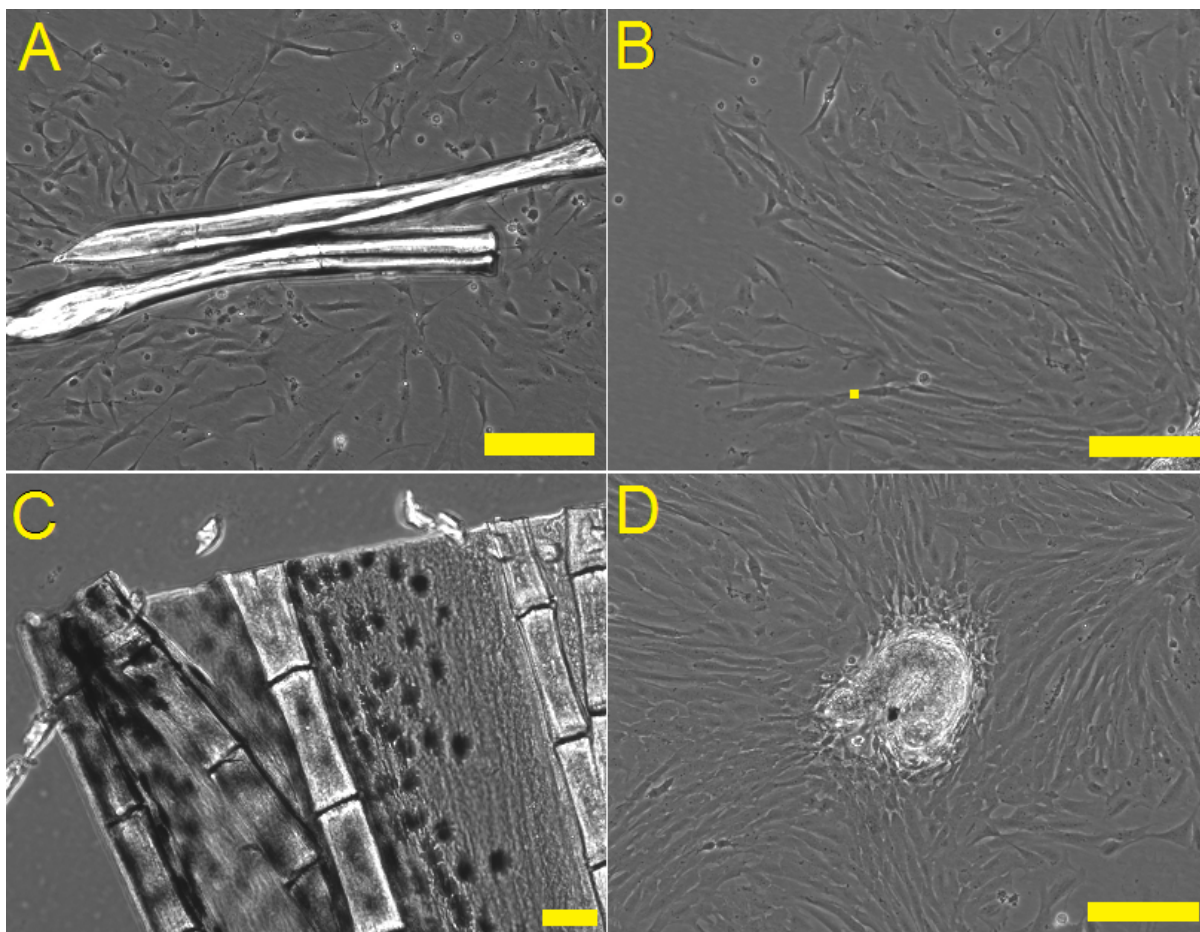
Obr.3 Jednotlivé štádiá (fázy) kultivácie indukovaných pluripotentných kmeňových buniek. Kožná biopsia, kultivovaná vo forme explantátu (A, B) predstavuje primárny zdroj buniek – fibroblastov (C,D), následne reprogramovaných pomocou syntetického RNA vektora do iPSc (indukovaných pluripotentných kmeňových buniek). Reprogramované bunky tvoria typické kolónie (E-G), ktoré po prenesení do špeciálnych kultivačných platničiek vytvoria tzv. 3D embryoidné telieska (I,J). Tieto sa po čiastočnej diferenciácii v 3D kultúre a prenesení na platničky, pokryté ornitínom a laminínom stanú zdrojom tzv. neurálnych prekursorov (J). Derivované neurálne prekursory je následne možné diferencovať (K,L) do rôznych typov buniek (napr. neurónov a astrocytov). (C) autor



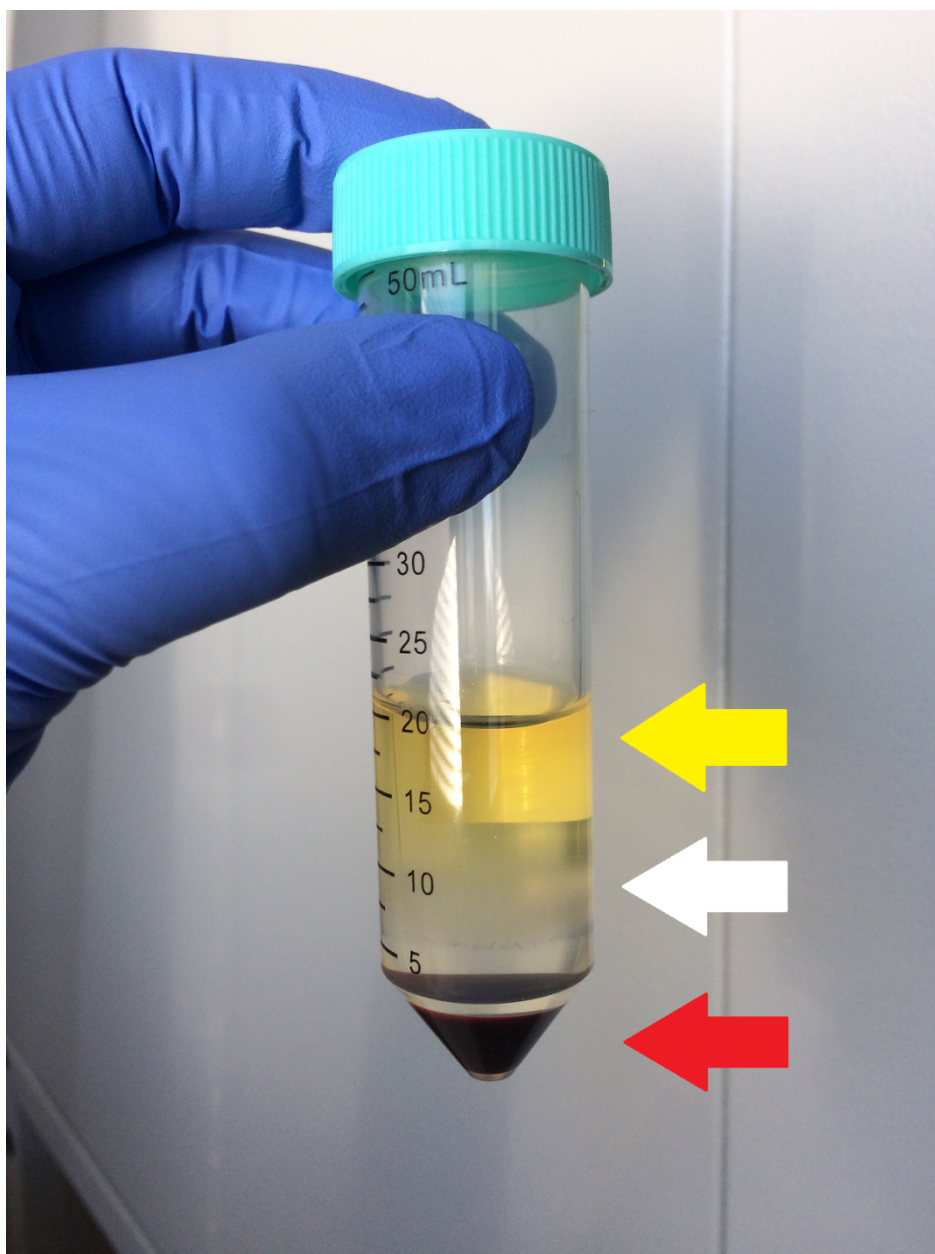


Obr.4 Nádorové tkanivo, použiteľné na izoláciu primárnych buniek alebo bunkovej línie. Na obrázku je uvedený príklad kožného melanómu, rastúceho na prasati línie MeLiM (Melanoma bearing Libechov Minipig). (C) autor a RNDr. Vratislav Horák, CSc. (Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, Liběchov, ČR)





Obr.5 Izolácia primárnych buniek (fibroblastov) z experimentálnej ryby (*Danio rerio*). Rybke sa v anestézii nožničkami, prípadne skalpelom odobral kus plutvy a pomocou explantátovej kultúry sa tkanivo kultivovalo niekoľko dní pri teplote 22°C. Okolo tkaniva sa objavili pomaly proliferujúce kožné bunky, ktoré sa následne expandovali a použili na ďalšie experimenty. Mierka predstavuje 50  $\mu\text{m}$ . (C) autor

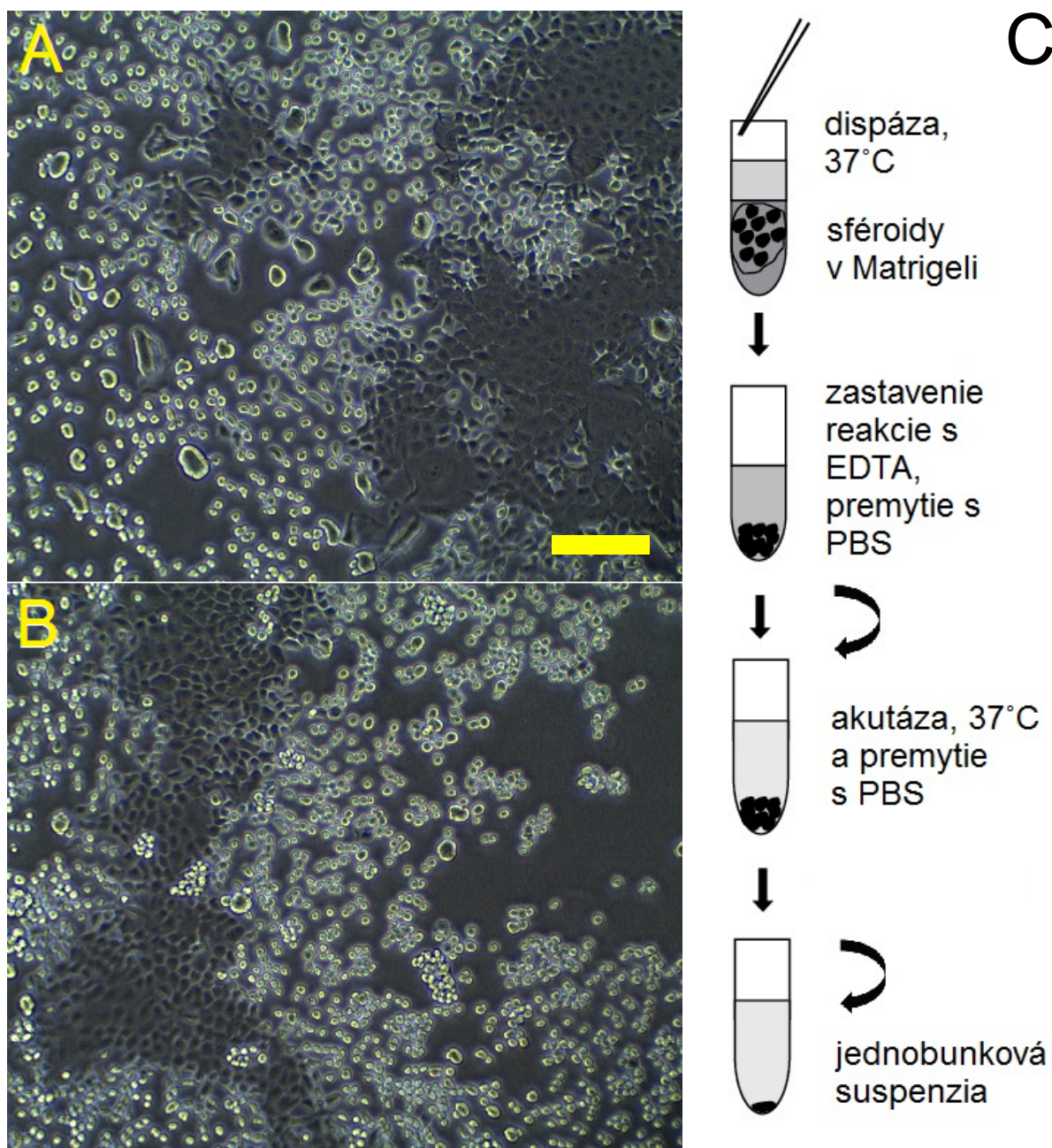


*Obr.6* Izolácia nukleárných buniek z periférnej krvi pomocou centrifugácie krvi v gradientovom roztoku (Ficoll-Paque). Čerstvo odobraná krv (odber sa vykonáva do skúmavky pokrytej antikoagulantom (EDTA)) sa zmieša v pomere 1:1 s PBS pufrom a opatrne napipetuje na povrch Ficoll-Paque roztoku. Po centrifugácii dôjde k separácii krvných zložiek (vrstva plazmy je označená žltou šípkou, biela šípka označuje difúzny prstenec obsahujúci biele krvinky, červená šípka označuje sediment tvorený červenými krvinkami a granulocyty. Metóda separácie buniek z krvi pacienta sa používa napríklad pri reprogramovaní bielych krviniek na indukované pluripotentné kmeňové bunky. (C) autor

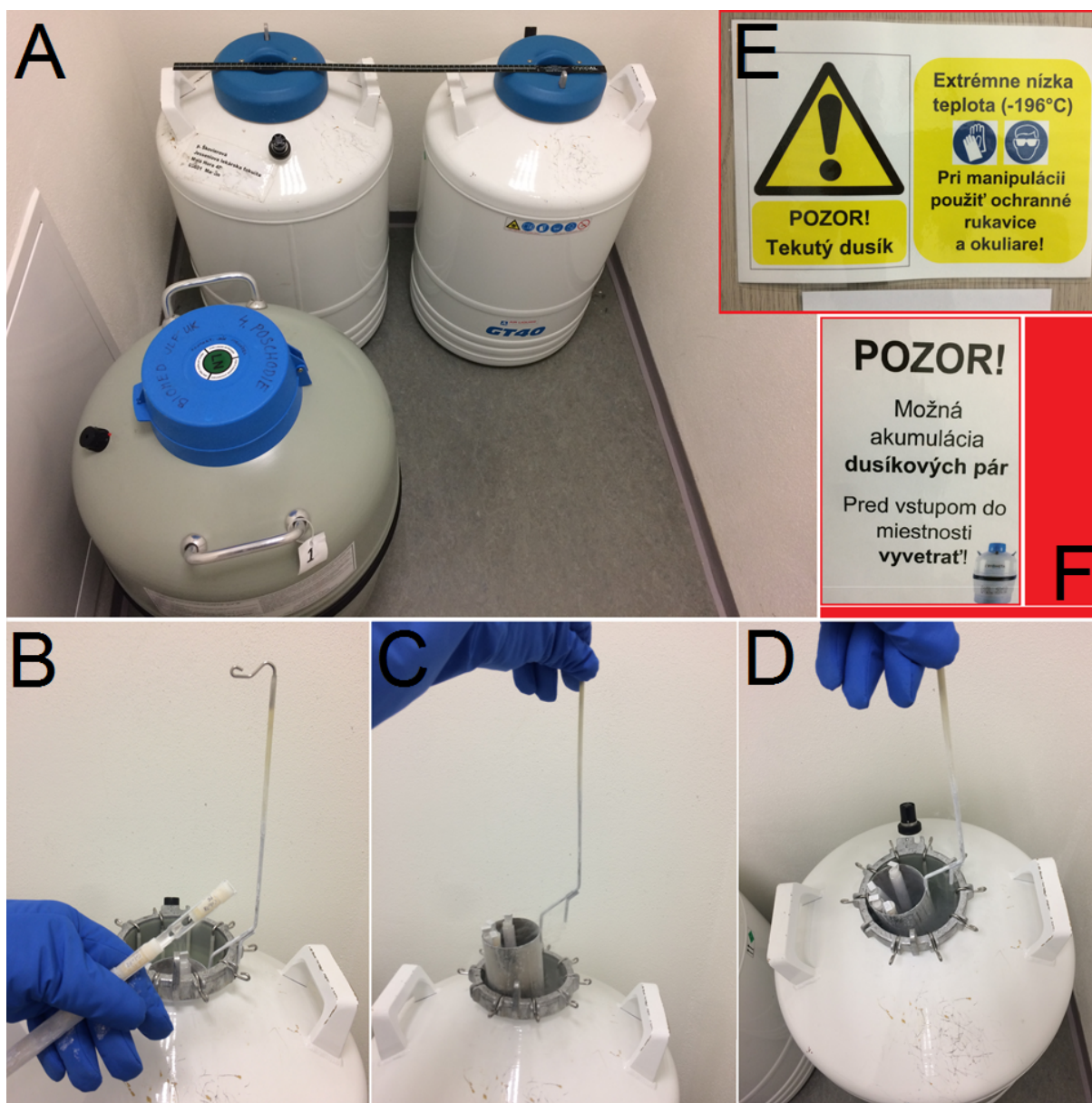


*Obr.7* Základné súčasti (komponenty) bežne používaného kultivačného média i) fetálne teľacie sérum, ii) bunkové médium a iii) roztok antibiotík. Fetálne teľacie sérum je finančne najnáročnejšou súčasťou bunkových médií, uskladňuje sa pri teplote -20 °C v mrazničke. Samotný roztok média, ktorého existuje množstvo variácií, sa uskladňuje pri 4°C, roztok antibiotík (typický je napr. 100x koncentrovaný roztok) sa zvyčajne alikvotuje na menšie objemy (napr. 5 ml) a tiež uchováva v mrazničke. (C) autor



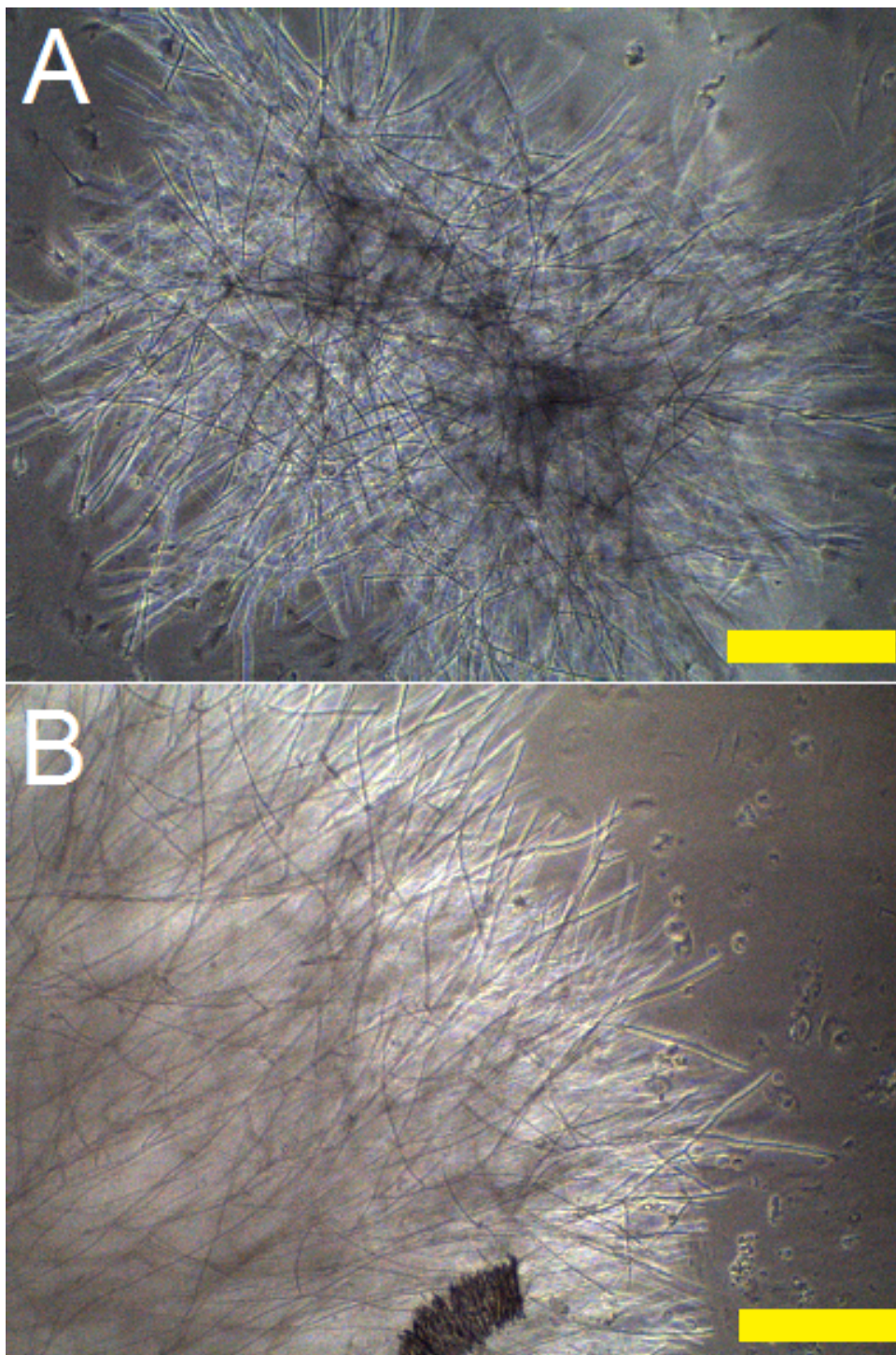


Obr.8 Trypsinizácia bunkovej kultúry (A,B) a jej efekt na fenotyp buniek. Na obrázku vľavo vidno bunky v rôznych štádiách trypsinizácie – okrúhle, plávajúce bunky predstavujú bunky, uvoľnené trypsínom z povrchu platničky. Reakciu je možné zastaviť prídavkom média s obsahom séra, prípadne samotným sérom. Obrázok (C) zobrazuje schématicky postup pri izolácii jednobunkovej suspenzie zo sféroidov z 3D nádorovej kultúry. Podrobný postup je uvedený v texte. Mierka predstavuje 50 μm. (C) autor, upravené podľa Strnadel et al., 2018 (*Bioprotocol*).



Obr.9 Depozit bunkových línií, zamrazených v tekutom dusíku v dvoch Dewarových nádobách (A). Nádoba, označená zeleným kruhom na vrchnáku je prepravná Dewarova nádoba, ktorú periodicky dopĺňa dodávateľská firma tekutým dusíkom. Táto nádoba má užší priemer hrdla, čo znižuje denné straty dusíka v dôsledku odparovania. Bunky sú zamrazené v špeciálnych kryoskúmavkách, uložených v hliníkových stojanoch v plastovom kryte (B). Tieto stojany sú voľne uložené v nerezových nádobách s drôteným úchytom (C,D). Miestnosť, v ktorej sú Dewarove nádoby uložené by mala byť uzamykateľná a zreteľne označená výstrahou pred popálením tekutým dusíkom a nebezpečenstvom udusenía. (C) autor



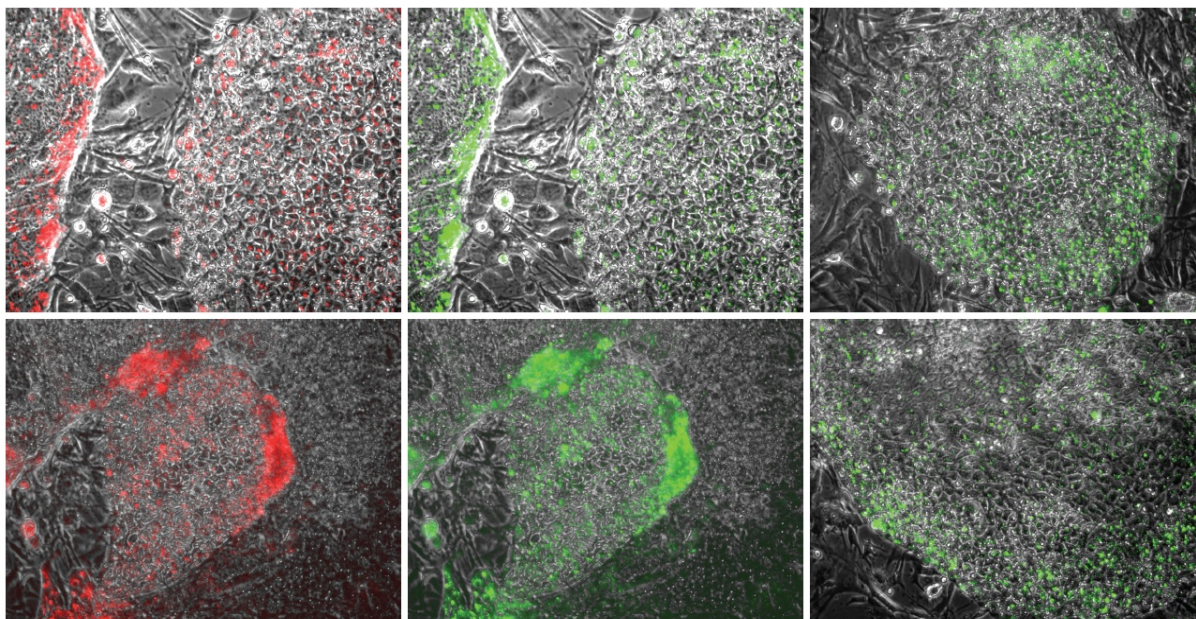


Obr.10 Kontaminácia bunkovej kultúry vláknitými hubami (plesňami). Pod svetelným mikroskopom sa tento typ kontaminácie prejaví ako prítomnosť rýchlo rastúcich vláknitých štruktúr. Kontaminácia plesňami je relatívne ľahko riešiteľnou záležitosťou, pokiaľ sa zachytí v skorých štádiách. Tento typ kontaminácie je častejší v letných mesiacoch vďaka prítomnosti spór plesní vo vzduchu. Mierka predstavuje 1 mm. (C) autor

Test Results for Submitted Sample				ATCC Reference Database Profile			
Locus	Query Profile:			Database Profile:			
D3S1358							
TH01	9	9.3					
D21S11							
D18S51							
Penta_E							
D5S818	10	11					
D13S317	9	12					
D7S820	10						
D16S539	8	9	11				
CSF1PO	9	10					
Penta_D							
Amelogenin	X	Y					
vWA	16	17	18	19			
D8S1179							
TPOX	8	9					
FGA							
D19S433							
D2S1338							

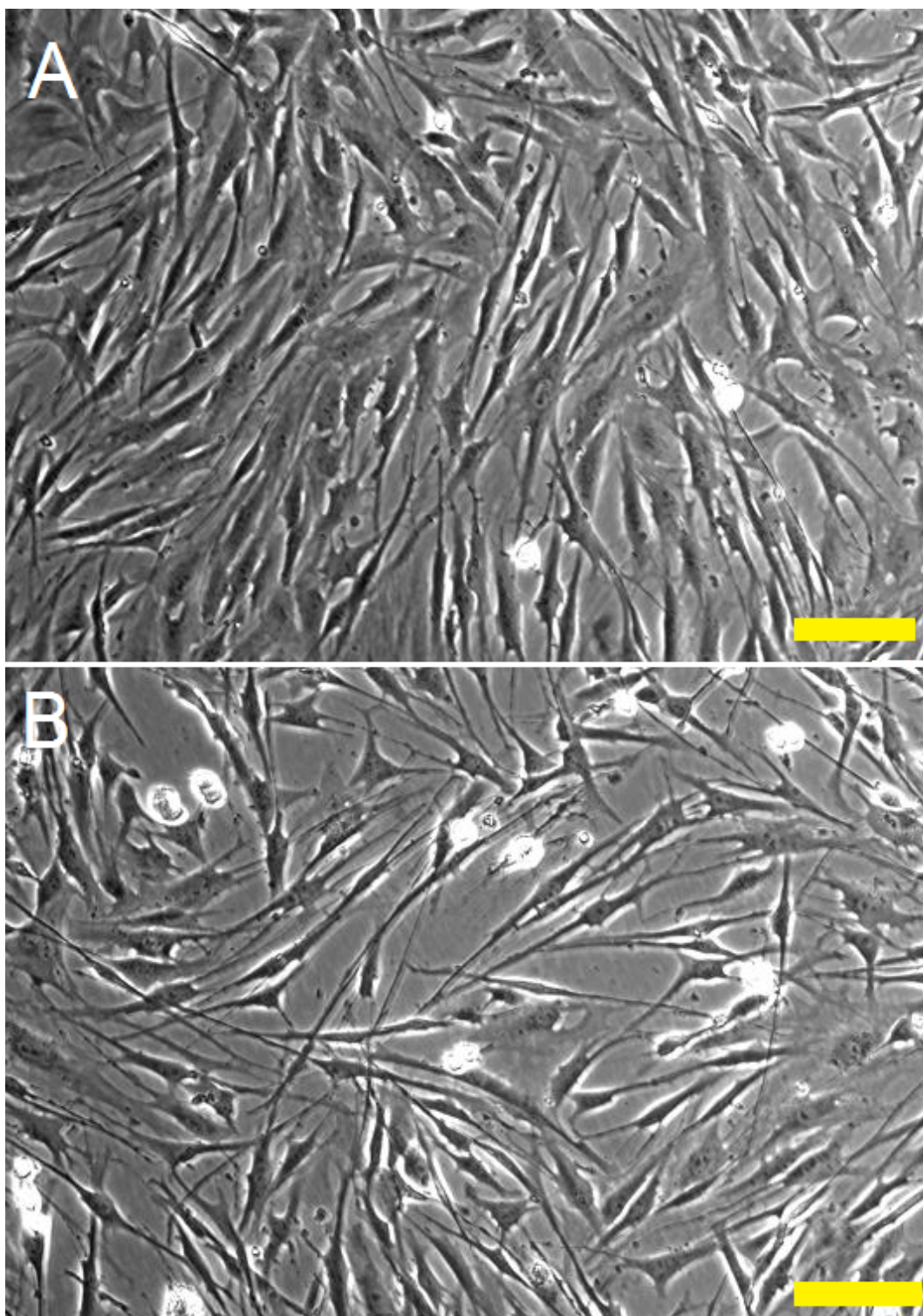
Obr.11 STR analýza (fingerprinting) primárnej bunkovej kultúry, pravdepodobne kontaminovanej iným typom buniek. Z dôvodu ochrany identity pacienta sú uvedené len základné typy detekovaných aliel. Červenými šípkami je zobrazený výskyt viacpočetných aliel. Príčinou môže byť práve kontaminácia inými bunkami resp. iným typom buniek. (C) autor



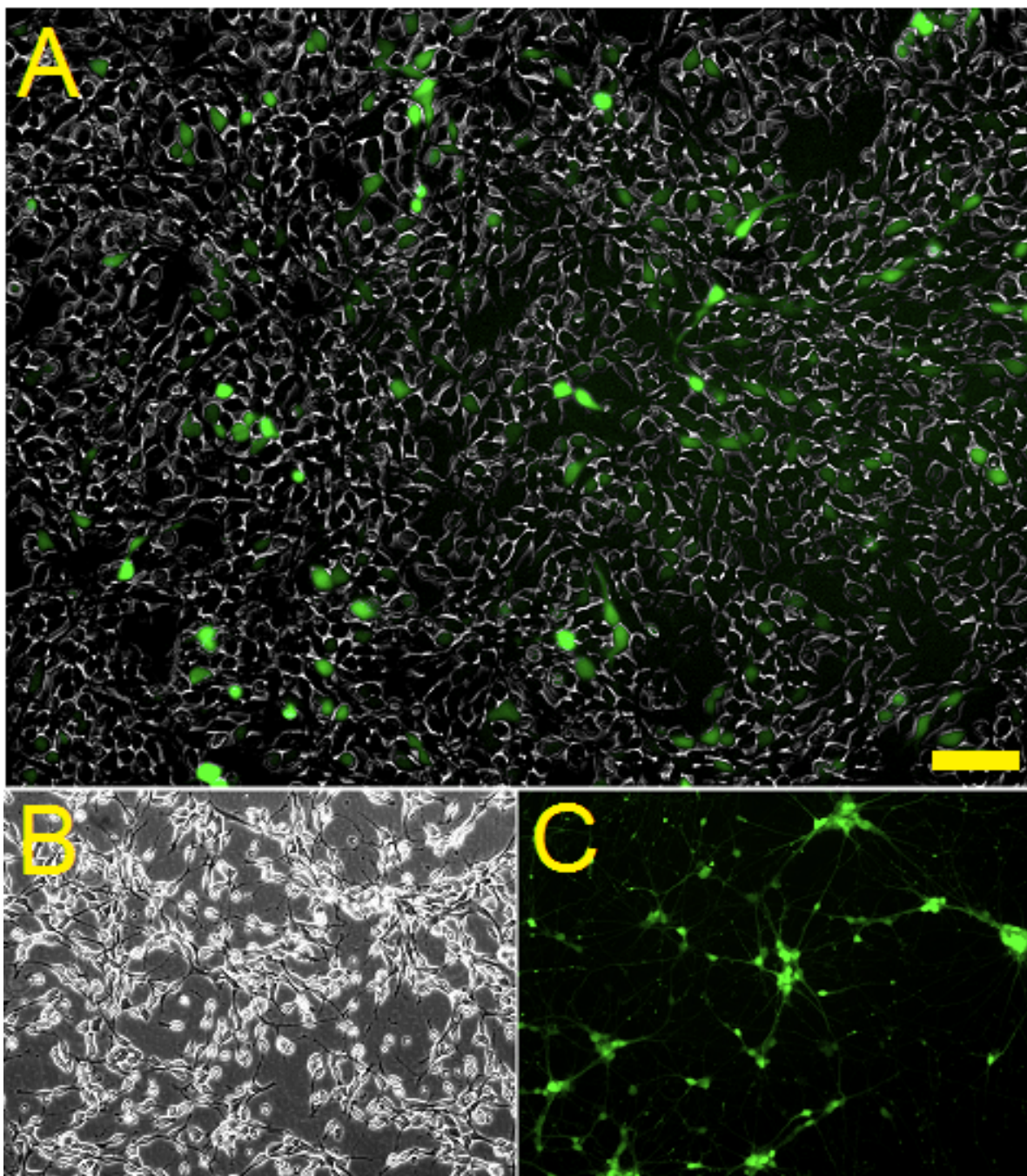


Obr. 12 Príklad použitia NanoFlare technológie pri detekcii prítomnosti mRNA molekúl v bunkách pri zachovaní ich viability (na živých bunkách). Technológia je založená na nanočasticiac zlata, ktoré sú pokryté tzv. *antisense DNA* úsekmi a tzv. reportérovou fluorescenčnou sekvenciou (*reporter flare sequence*), hybridizovanou na antisense DNA sekvencii. Po pridaní do kultúry buniek sa nanočastice dostanú do bunky a v prípade, že sa v bunke nachádza mRNA (napr. pre Nanog, marker pluripotencie kmeňových buniek), dôjde k hybridizácii mRNA s antisense DNA úsekom za súčasného uvoľnenia fluorescenčne označenej sekvencie, dovtedy „tlenenej“. Prítomnosť mRNA sa tak prejaví prítomnosťou fluorescenčného signálu v jednotlivých bunkách (alebo kolóniách iPSc buniek), čo umožňuje následnú selekciu a manuálne klonovanie buniek. Mierka predstavuje 50  $\mu\text{m}$ . (C) autor



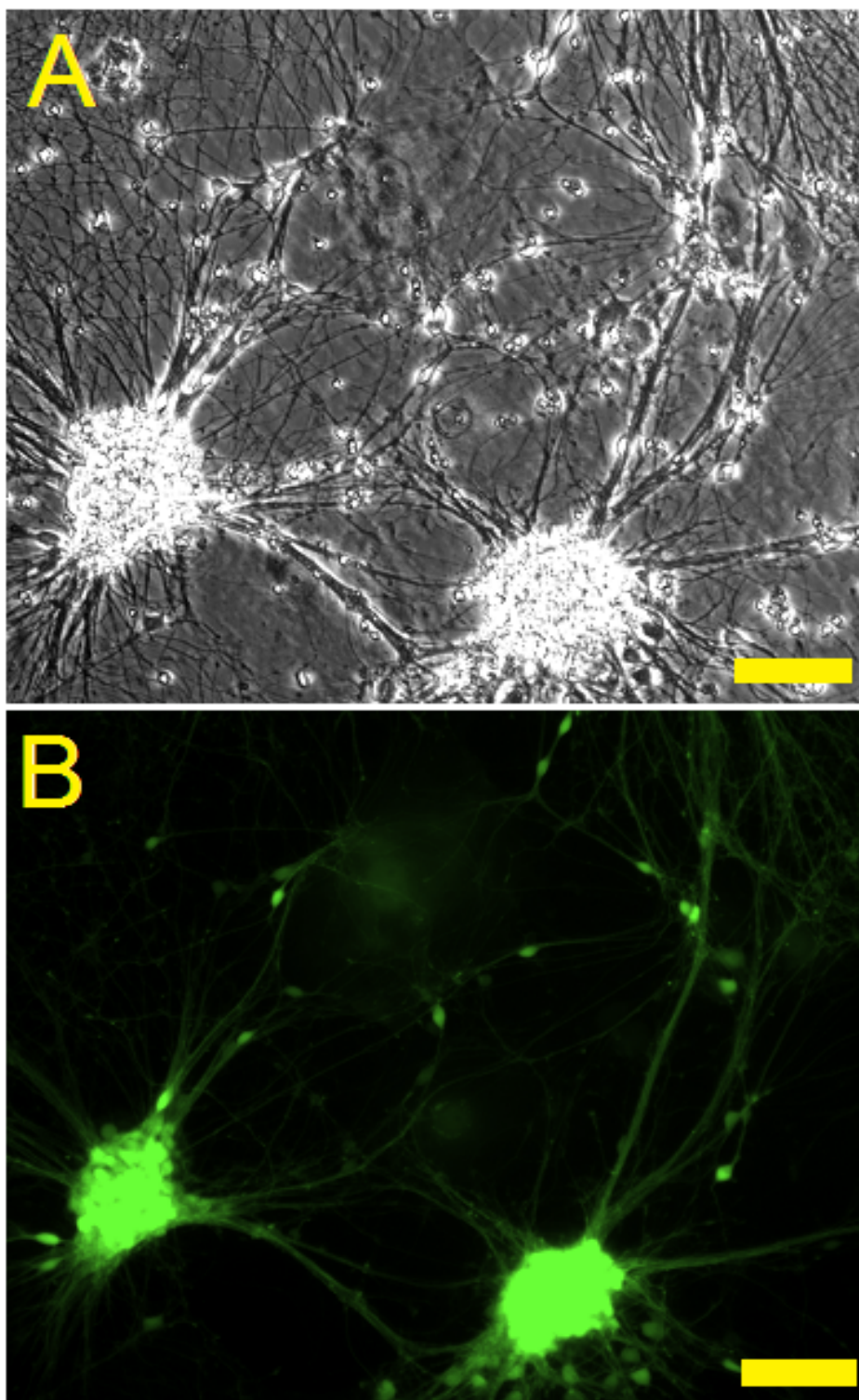


Obr.13 Primárne bunky 2D kultúry, izolované z kožnej excízie. Zobrazený je fenotyp buniek pred transfekciou (A) a po transfekcii buniek (B) syntetickým RNA vektorom. Experiment je príkladom transfekcie, ktorá nespôsobila výraznejší stres a následný pokles počtu buniek v kultúre. Mierka predstavuje 20  $\mu\text{m}$ . (C) autor

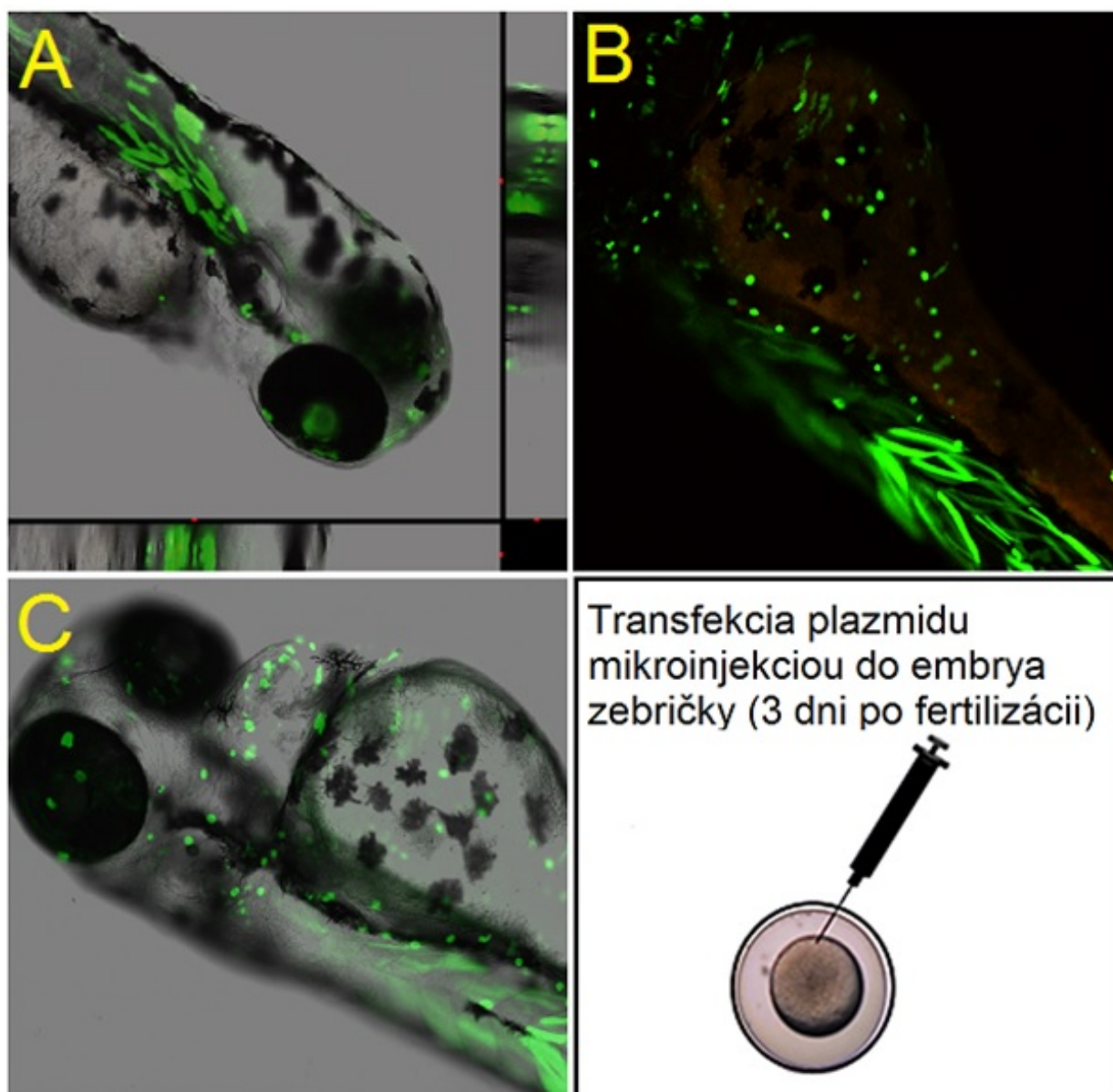


Obr.14 Transdukcia (virálny prenos DNA, kódujúcej fluorescenčný eGFP proteín, exprimovaný pod synapsínovým (SYN) promótorom) do buniek ľudských neurálnych prekursorov. Na obrázku (A) je zobrazený prekryv obrázkov zo svetelného a fluorescenčného mikroskopu s cca 40% úspešnosťou transdukcie. Čiastočne diferencované bunky s typickým fenotypom mladých neurónov sú zobrazené na obrázku (B). Diferencované bunky, exprimujúce eGFP proteín a vizualizované pomocou fluorescenčného mikroskopu sú zobrazené v časti (C). Mierka predstavuje 50  $\mu\text{m}$ . (C) autor

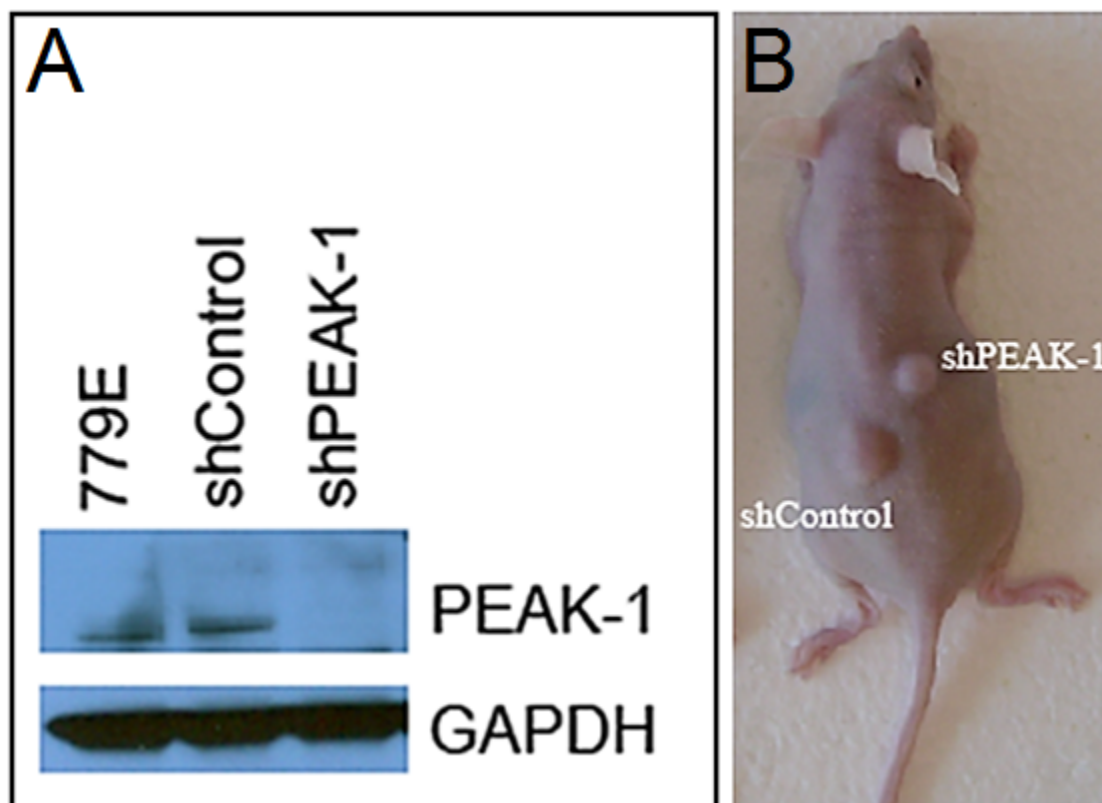




Obr.15 Ďalší príklad úspešne transdukovaných buniek (neurálnych ľudských iPSc-derivovaných prekurzorov, diferencovaných do mladých neurónov). Transdukciou došlo k vytvoreniu tzv. reportérovej línie. Diferencované bunky, exprimujúce eGFP proteín a vizualizované pomocou svetelného (A) a fluorescenčného (B). Mierka predstavuje 50  $\mu\text{m}$ . (C) autor

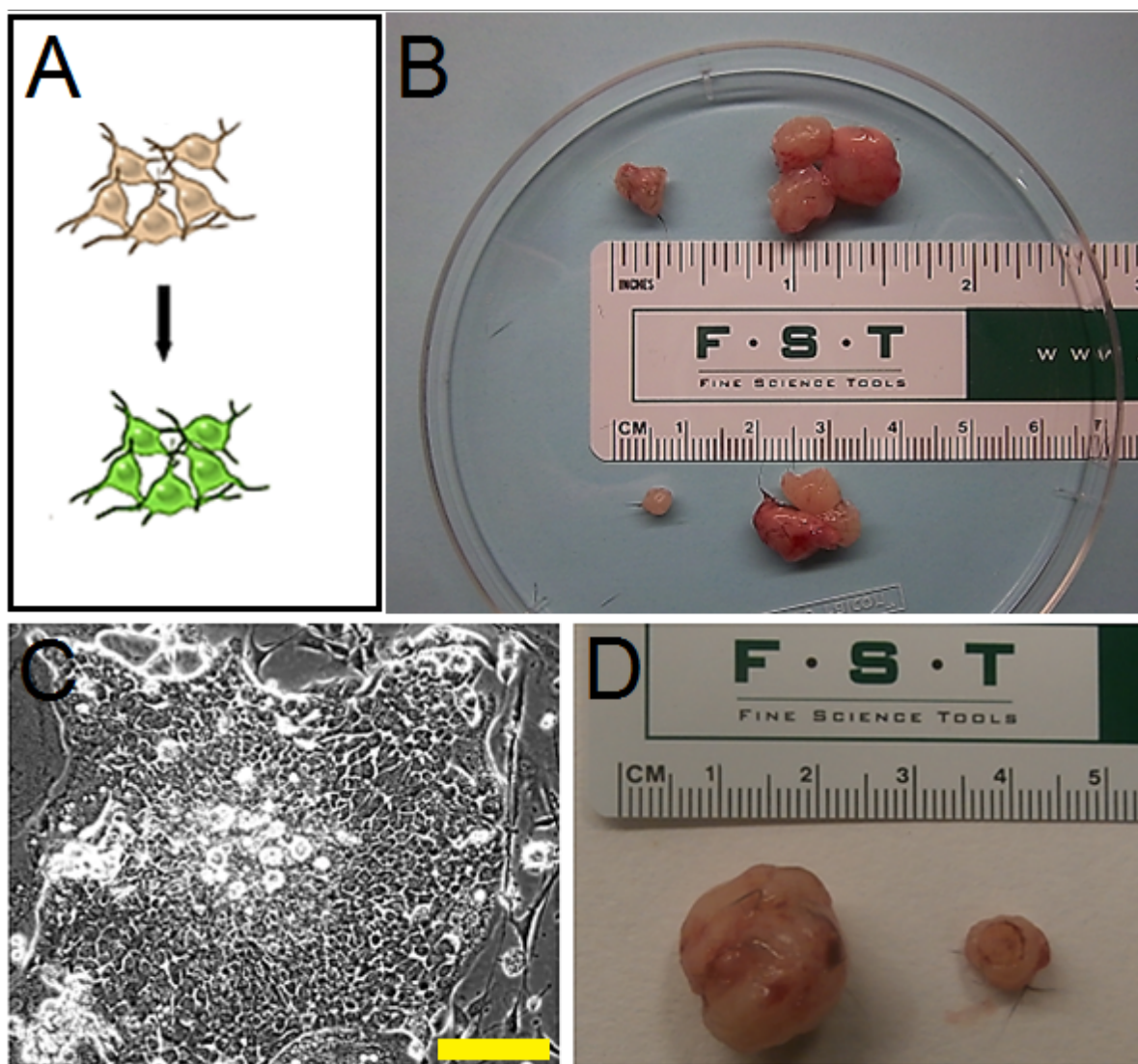


Obr.16 Príklad *in vivo* transfekcie plazmidu, kódujúceho GFP proteín (zelený fluorescenčný proteín) do embrya laboratórnej rybky (zebričky), tri dni po fertilizácii. Obrázok (A), (B) a (C) zobrazuje distribúciu transfekovaných buniek v organizme rybky. (C) autor

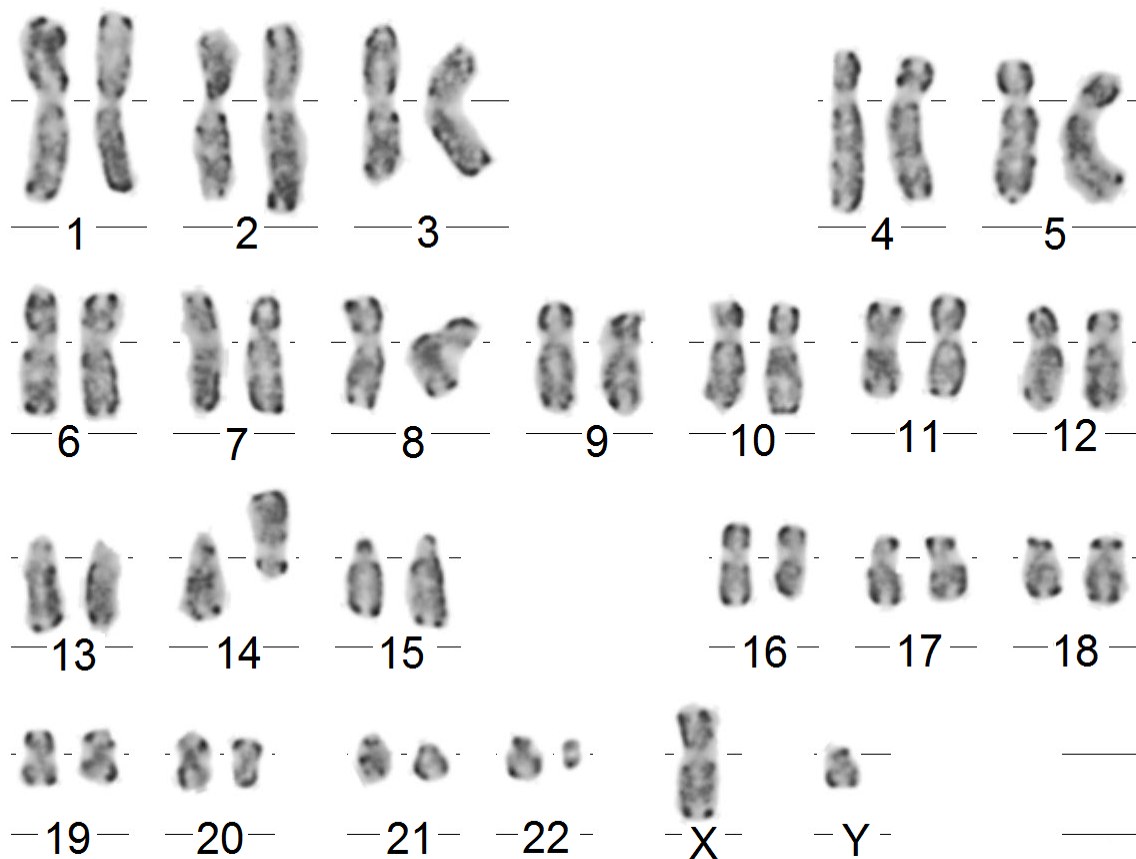


Obr.17 Transdukcia ľudských nádorových buniek (779 línia, odvodená z duktálneho adenokarcinómu pankreasu) virálnymi vektormi, kódujúcimi shRNA sekvencie. Cieľom experimentu bolo knock-down resp. knock-out (zníženie hladiny) atypickej kinázy PEAK-1 (A) a vplyv takto zníženej hladiny proteínu na veľkosť nádoru (B), indukovaného v atymických myšiach rovnakým počtom buniek, ako v prípade buniek, transdukovaných pomocou kontrolnej shRNA (kontrolná shRNA je dizajnovaná ako neinterferujúca RNA). Na obrázku (B) je evidentný rozdiel vo veľkosti nádorov, indukovaných z shControl a shPEAK-1 transdukovaných buniek. (C) autor

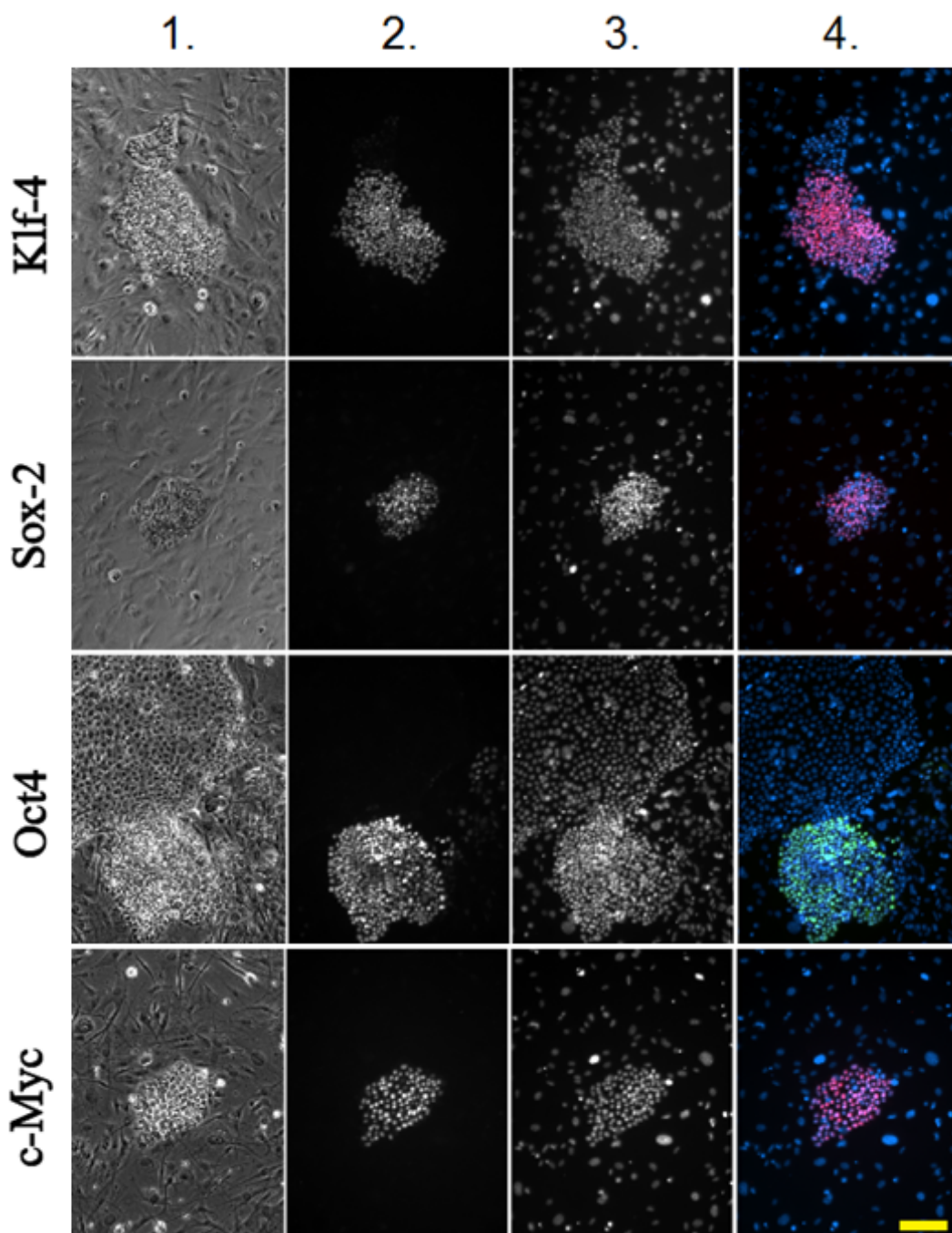




*Obr. 18* Transdukcia Yamanakových transkripčných faktorov do nádorových buniek, izolovaných z duktálneho adenokarcinómu pankreasu. Transdukcia Yamanakových faktorov, prvýkrát použitých pri reprogramovaní ľudských somatických buniek do indukovaných pluripotentných kmeňových buniek, sa pri prenose do nádorovej bunky a následnej transplantácii takýchto buniek do podkožia atymickej myši prejavila cca 12-násobným zväčšením nádoru oproti pôvodným, netransdukovaným bunkám. Možné vysvetlenie tohto javu spočíva v hypotéze, že vplyvom transdukcie došlo k reprogramovaniu časti nádorových buniek do nádorových kmeňových buniek. Mierka predstavuje 1 mm. (C) autor

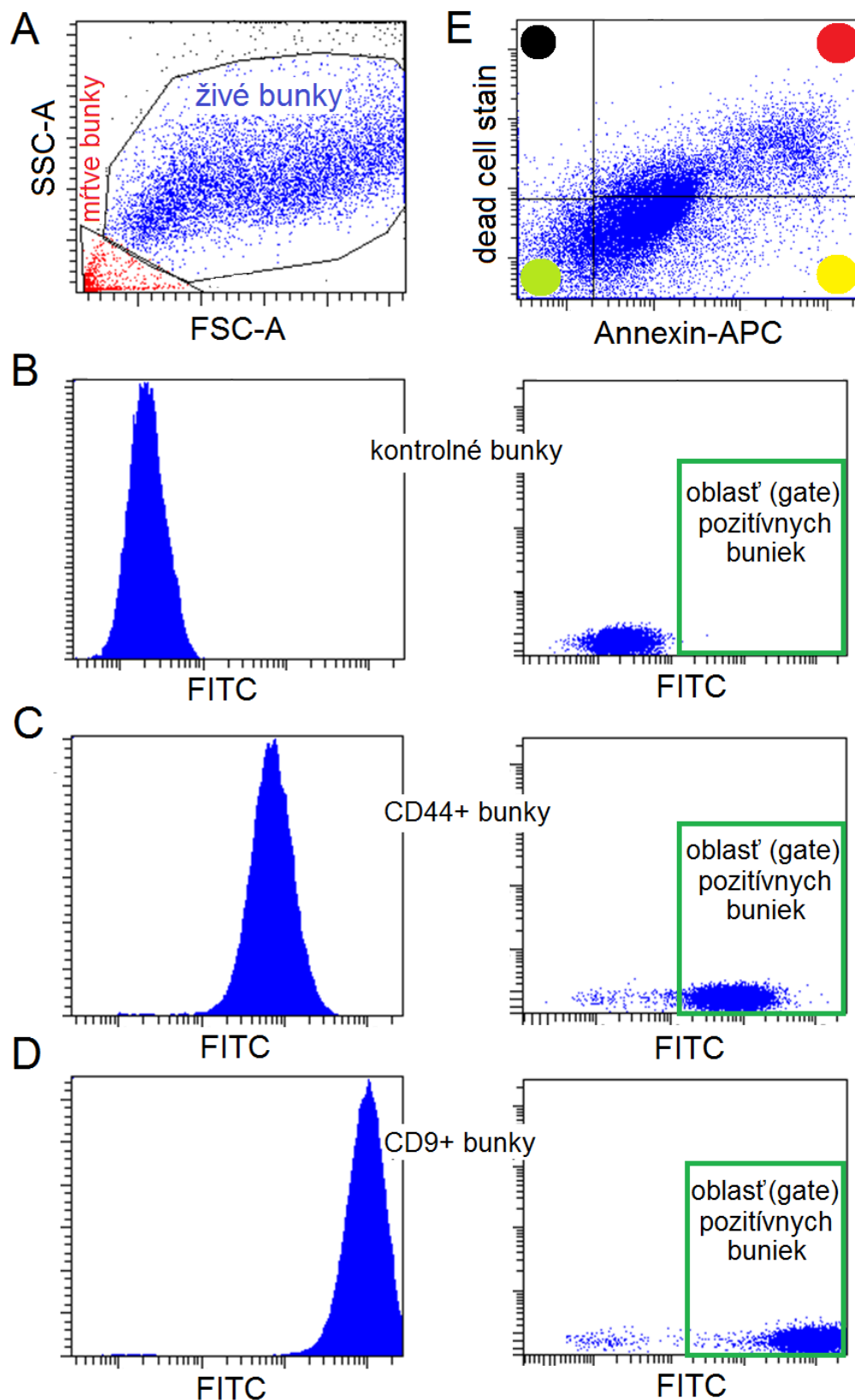


Obr.19 Karyotyp neurálnych prekursorov, odvodených z indukovaných pluripotentných kmeňových buniek, ktoré vznikli reprogramovaním kožných fibroblastov z pacienta s amyotrofickou laterálnou sklerózou. Karyotypová analýza potvrdila tzv. recipročnú translokáciu medzi chromozómami č.2 a 14. Analýzou pôvodných buniek, z ktorých bola táto bunková línia pripravená (kožných fibroblastov) sa zistilo, že translokácia vznikla pravdepodobne v priebehu *in vitro* kultivácie (kožné fibroblasty túto translokáciu neobsahovali). Zápis karyotypu takejto línie je 46\_XY t2;14. (C) autor a RNDr.Barbora Mitrušková (Oddelenie lekárskej genetiky, Univerzitná nemocnica Martin).

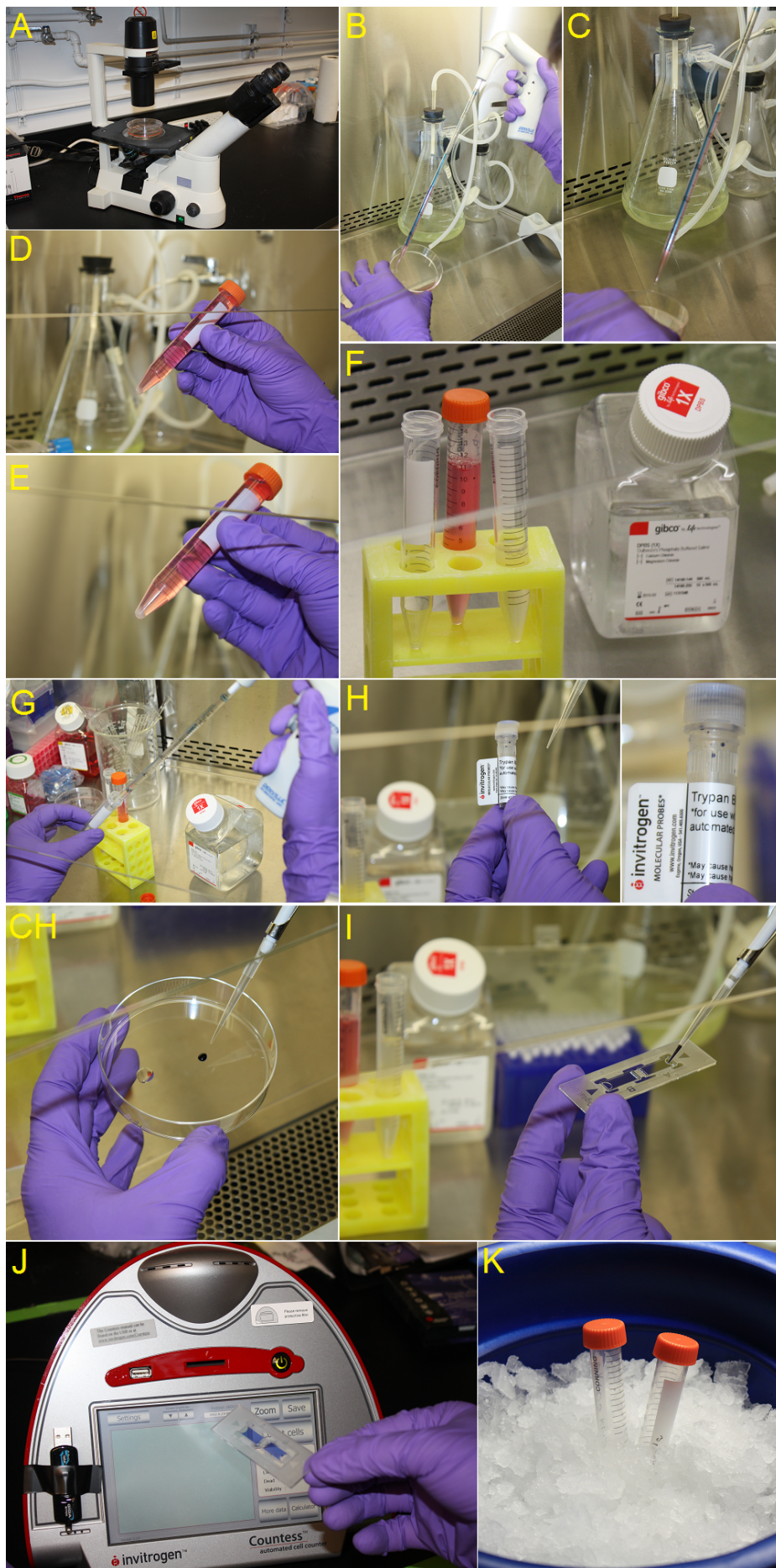


Obr.20 Imunocytochemická detekcia transkripčných reprogramovacích faktorov v ľudských indukovaných pluripotentných kmeňových bunkách, rastúcich v podobe kolónií na vrstve myšacích embryonálnych fibroblastoch (MEFs), pomocou fluorescenčne značených protilátok. Prvý stĺpec zobrazuje kolónie indukovaných pluripotentných kmeňových buniek v svetelnom mikroskope, (2) stĺpec zobrazuje fluorescenčný signál jednotlivých transkripčných faktorov (MEFs bunky sú negatívne), (3) je vizualizácia bunkových jadier pomocou DAPI a stĺpec (4) zobrazuje prekrytie DAPI a pozitívneho fluorescenčného signálu z iPSc kolónií. Mierka predstavuje 500  $\mu\text{m}$ . (C) autor



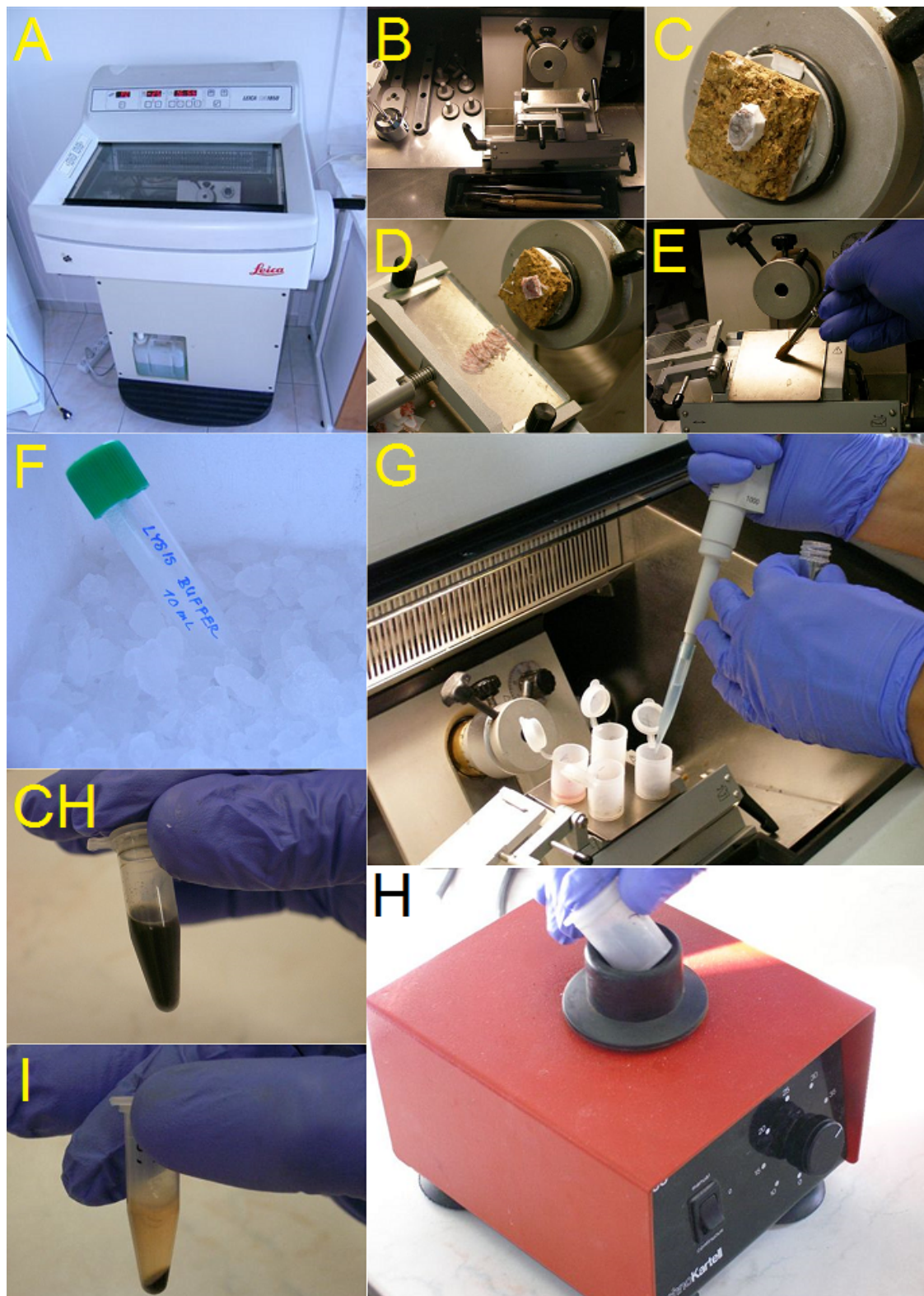


Obr.21 Analýza buniek pomocou prietokovej cytometrie. Pri analýze operátor (na základe skúseností a pravidiel) určí množinu analyzovaných buniek (tzv. *gating*), pričom vylúči oblasť mŕtvych buniek a bunkových fragmentov (A). Pri samotnej analýze vo fluorescenčnom kanáli sa určia hranice pre oblasť pozitívnych buniek na základe autofluorescencie neznačených buniek (B). Následná analýza určí mieru a intenzitu pozitívnych buniek. (C) CD44+ bunky a ich odozva a (D) veľmi výrazná pozitivita buniek pre CD9 povrchový marker. Obrázky B,C a D vľavo sú histogramy, napravo sú výsledky zobrazené vo forme tzv. dot plotov (*dot plots*). (E) zobrazuje analýzu apoptických buniek (Annexin V assay), zeleným kruhom je označený kvadrant so živými bunkami, čierny kruh zobrazuje mŕtve bunky, žltý kruh skoré apoptické bunky a červený kruh bunky v neskorších štádiách apoptózy. (C) autor



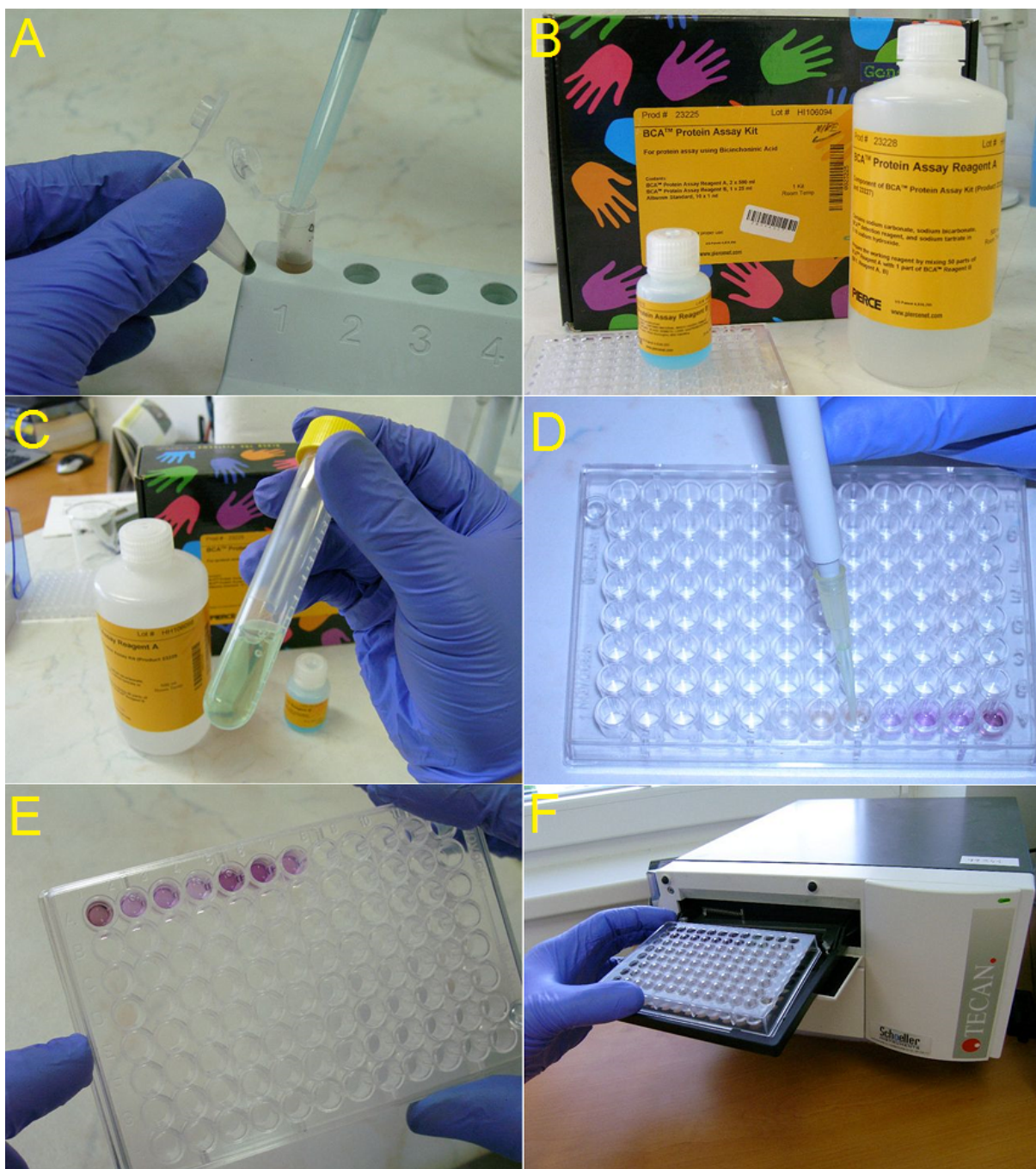
Obr.22 Proces trypsinizácie buniek pred pasážovaním alebo pri príprave jednobunkovej suspenzie na transplantáciu buniek do zvierat'a. Hustota buniek na miske (tzv. konfluencia) sa skontroluje pod svetelným mikroskopom (A), bunky sa po odsatí média opláchnu sterilným roztokom PBS pufru a pridá sa k nim roztok trypsínu (B,C). Kultivačné nádoby sa preniesú do inkubátora na 3-5 minút. Po trypsinizácii sa reakcia zastaví prídavkom kultivačného média s obsahom 10% FBS (aspoň v pomere 1:1). Bunky, odlepené z platničky pôsobením enzýmu sa preniesú do plastovej skúmavky (D) a dajú centrifugovať (E). Usadené bunky (pelet) sa následne premyjú roztokom PBS, opätovne premyjú s PBS a určí sa ich koncentrácia napr. použitím automatického počítacza buniek. Ak sa bunky počítajú spolu s prídavkom farbičky (trypanová modrá, pomer voči bunkovej suspenzii je 1:1), je možné určiť ich viabilitu (pomer živých buniek k celkovému počtu buniek). Bunky sa po premytí a určení počtu a koncentrácie uskladňujú na ľade až do použitia. Na *in vivo* experimenty je vhodné používať iba bunky s viabilitou väčšou ako 90%. (C) autor a Mgr.Daniela Strnádelová



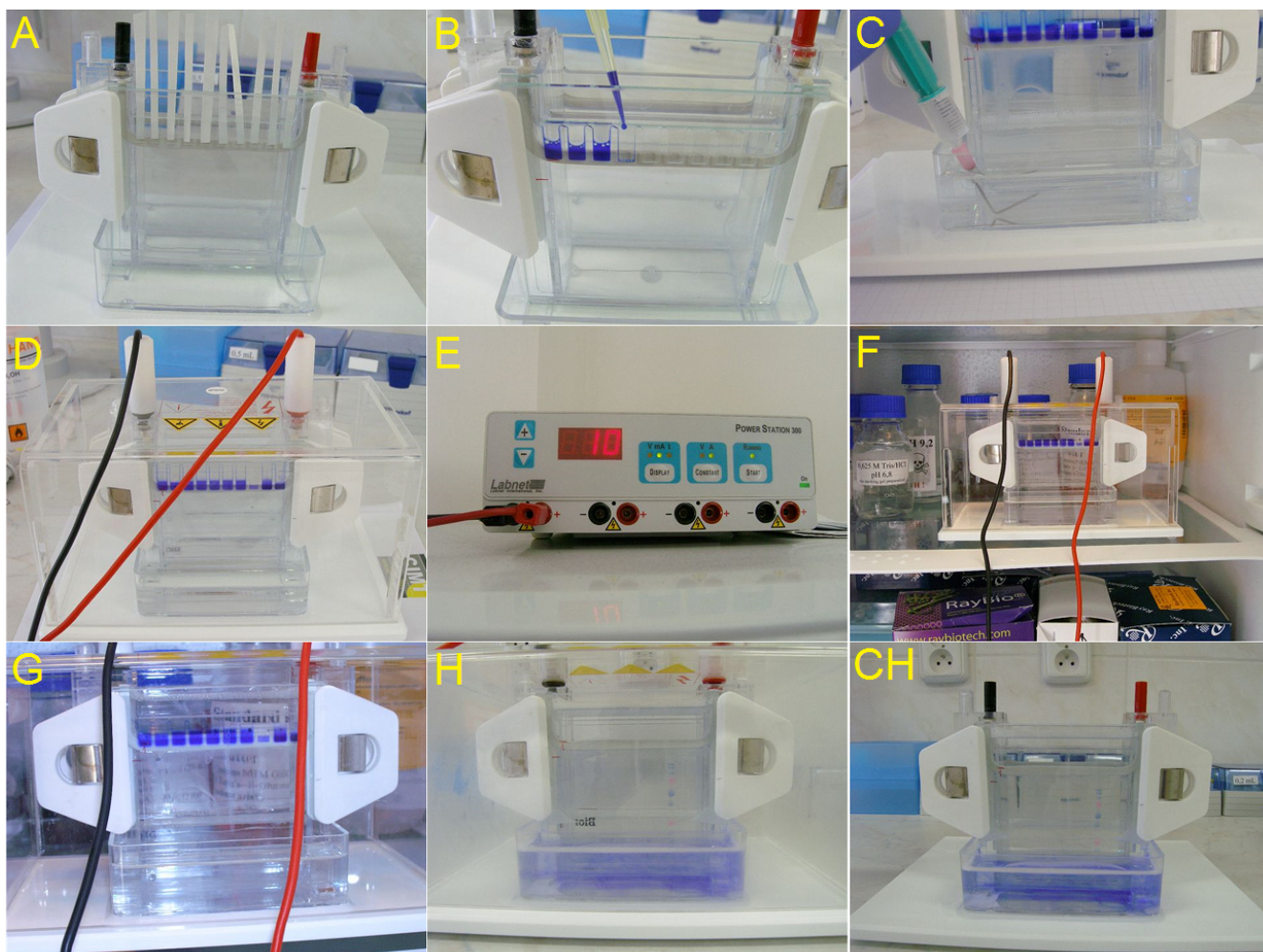


Obr.23 Príprava lyzátu z nádorového tkaniva na analýzu pomocou Western blotu alebo proteínových čipov, pomocou izolácie proteínov priamo z histologických rezov. Táto metóda umožňuje štúdium mikroprostredia nádoru a koreláciu výsledkov z histologickej analýzy a analýzy proteínov vyššie spomenutými technikami. Analyzované sú tkanivové rezy, idúce sériovo priamo za sebou. (A,B) Prístroj na prípravu histologických rezov (cryocut), (C,D) zmrazené tkanivo, umiestnené na korkovej podložke a obalené tzv. kryoprotektívnym médiom. Pripravené rezy sa jemne čistým štetcom premiestnia do skúmavky s ľadovým lyzačným pufrom (F,G), ktorý obsahuje zmes inhibítorov proteáz. Skúmavky sa následne inkubujú na ľade a každých 5 minút vortexujú na trepačke (H). Získaný lyzát (v tomto prípade ide o lyzát z nádorového tkaniva – melanómu) pred centrifugáciou (CH) a po centrifugácii (I). (C) autor



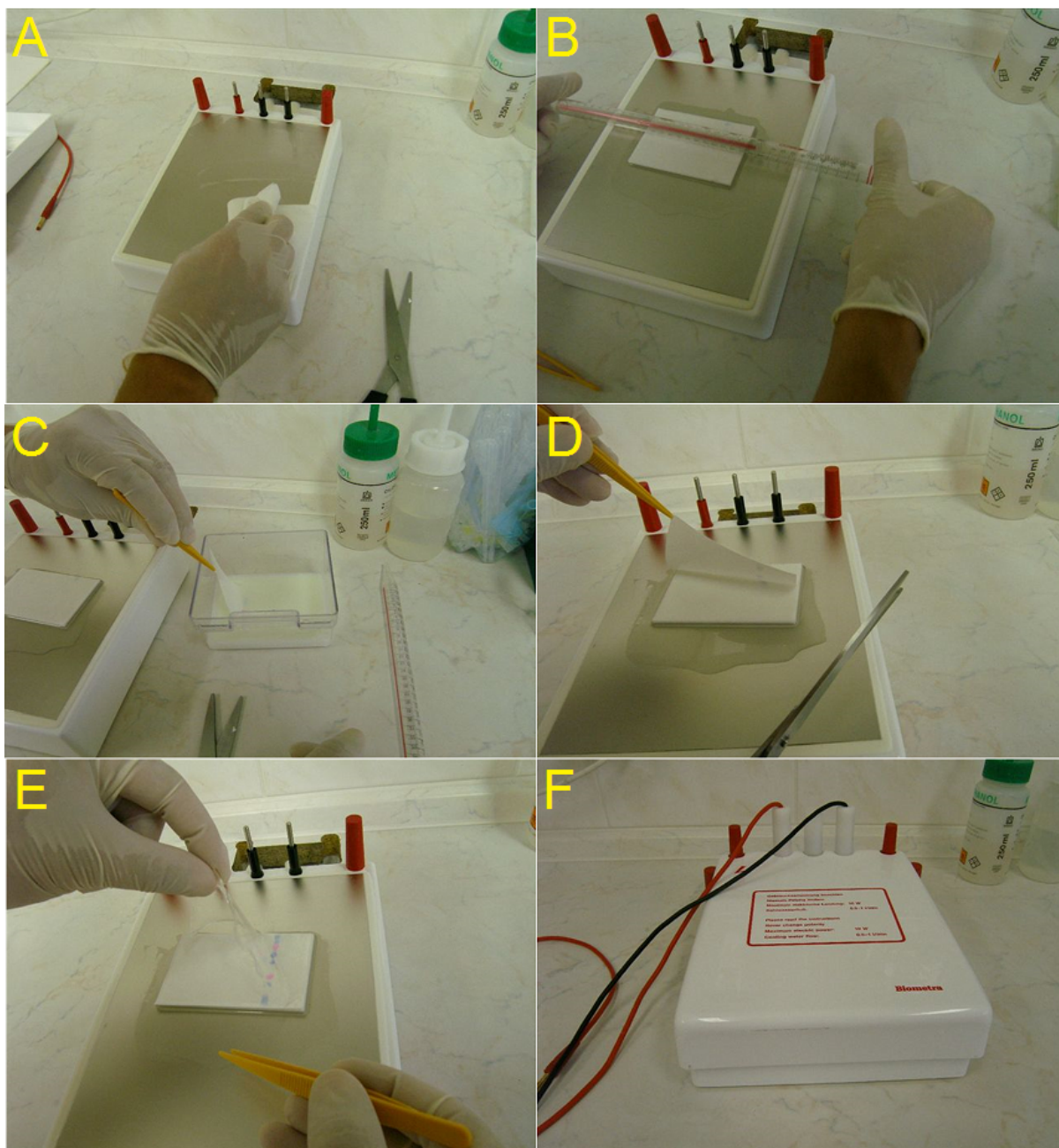


Obr.24 Stanovenie koncentrácie proteínov v nádorovom alebo bunkovom lyzáte pomocou BCA assay metódy (Pierce, USA). Z centrifugovaného lyzátu tkaniva (A) alebo buniek sa opatrne odpipetuje supernatant (roztok nad sedimentom) a k nemu sa pridá dvojzložkové BCA činidlo (B,C). V prípade vysokej koncentrácie proteínov v lyzáte (intenzita sfarbenia roztoku je vyššia, ako intenzita najviac koncentrovaného roztoku štandardu v kalibračnej čiare (D) je nutné lyzáť pred analýzou nariediť. Po inkubácii sa vo vzorkách (E) zmeria absorbancia (F) na spektrofotometri (pri vlnovej dĺžke 570 nm) a z regresnej rovnice (pripravenej pomocou známych hodnôt absorbancií a k nim prislúchajúcim hodnotám koncentrácií) sa určí hodnota koncentrácie proteínov v jednotlivých vzorkách. (C) autor

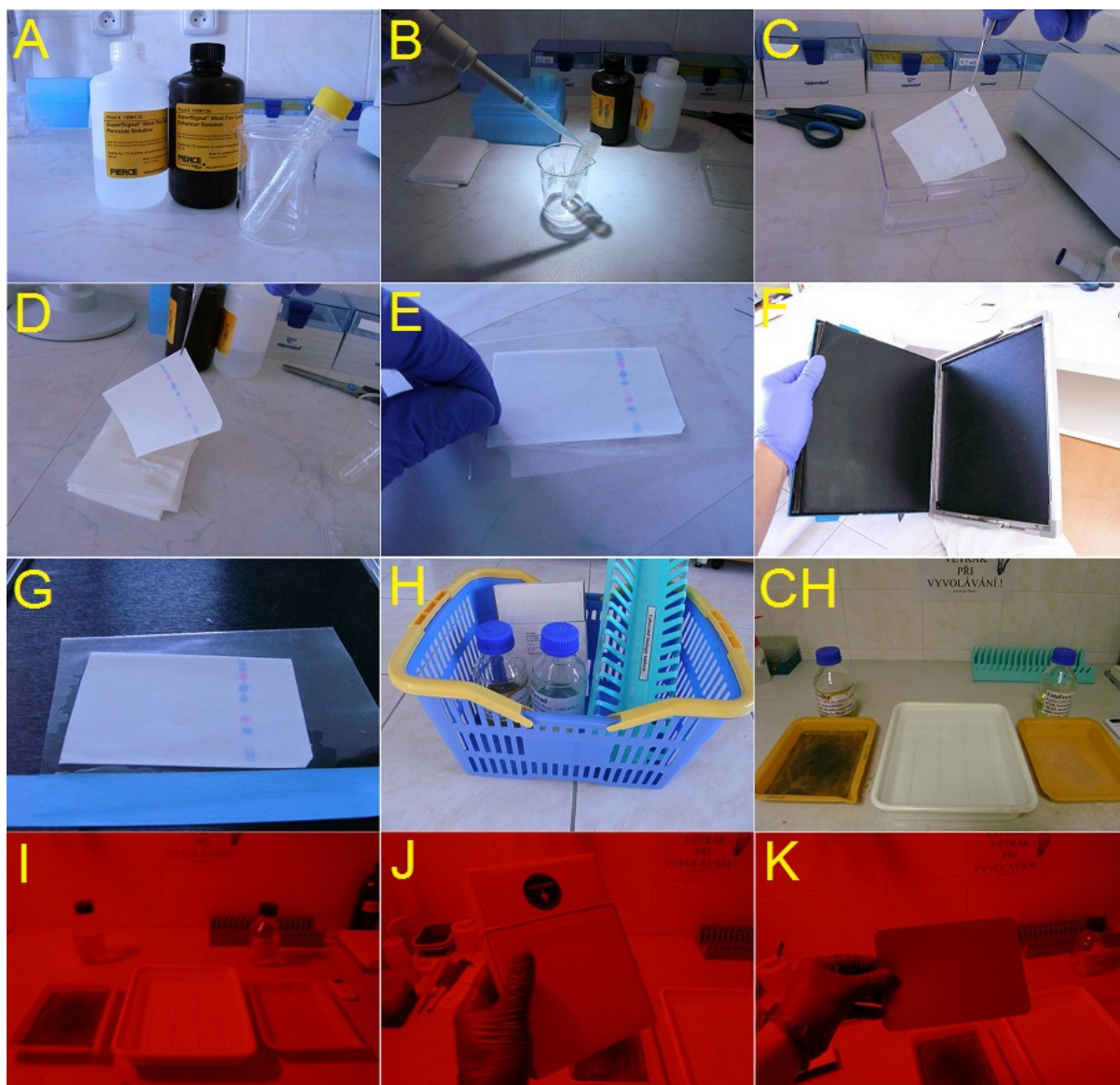


Obr.25 Elektroforetická separácia proteínov na základe ich hmotnosti v polyakrylamidovom géli (tzv. *Western-blot* metóda). Obrázok ilustruje použitie novopripraveného gélu, umiestneného medzi dvoma sklenenými platničkami. Pri uvedenej modifikácii metódy (v súčasnosti sú komerčne dostupné aj hotové gély) sa pred samotným nanesením vzoriek do jamiek gélu jamky pomocou páskov filtračného papiera zbavia zvyškov pufru (A) a po napipetovaní vzoriek (B) sa jamky prevrstvia pufrom. Vzduchové bublinky, ktoré môžu interferovať s elektroforézou sa odstránia pomocou pufru, vytlačeného z injekčnej striekačky s vhodne tvarovanou ihlou (C). Po uzatvorení aparatury (D) a jej zapojení k zdroju napätia (E) sa aparátúra umiestni do chladničky (F,G). Elektroforetickú separáciu monitorujeme podľa pohybu modrej farbičky (je súčasťou vzorkového pufru), alebo pomocou farebne označenej zmesi proteínov (H, CH) so známou molekulovou hmotnosťou (tzv. *protein standard* alebo *prestained protein ladder*). (C) autor





Obr.26 Transfer separovaných proteínov z polyakryamidového gélu na nitrocelulózovú alebo PVDF membránu. Na obrázku je zobrazený tzv. *semi-dry blotting*, ktorý umožňuje rýchly (cca niekoľko minút) transfer proteínov z gélu na membránu v prítomnosti iba malého množstva pufru. Samotný proces prebieha v elektrickom poli, v špeciálnom prístroji s doskovitými kovovými elektródami (A), membrána a polyakrylamidový gél sú umiestnené v tzv. sendvičovom usporiadaní medzi špeciálnymi navlhčenými filtračnými papiermi, ktoré sa musia zbaviť bubliniek pomocou plastovej pipety (B-D) alebo tzv. *roleru*. Metóda je vhodná najmä pre transfer menších proteínov (menej ako 100 kDa). Po ukončení transferu sú proteíny prítomné na membráne (E), na jej povrchu následne dôjde k značeniu vybraných proteínov pomocou špecifických protilátok. (F) Aparatúra počas blotovania. (C) autor



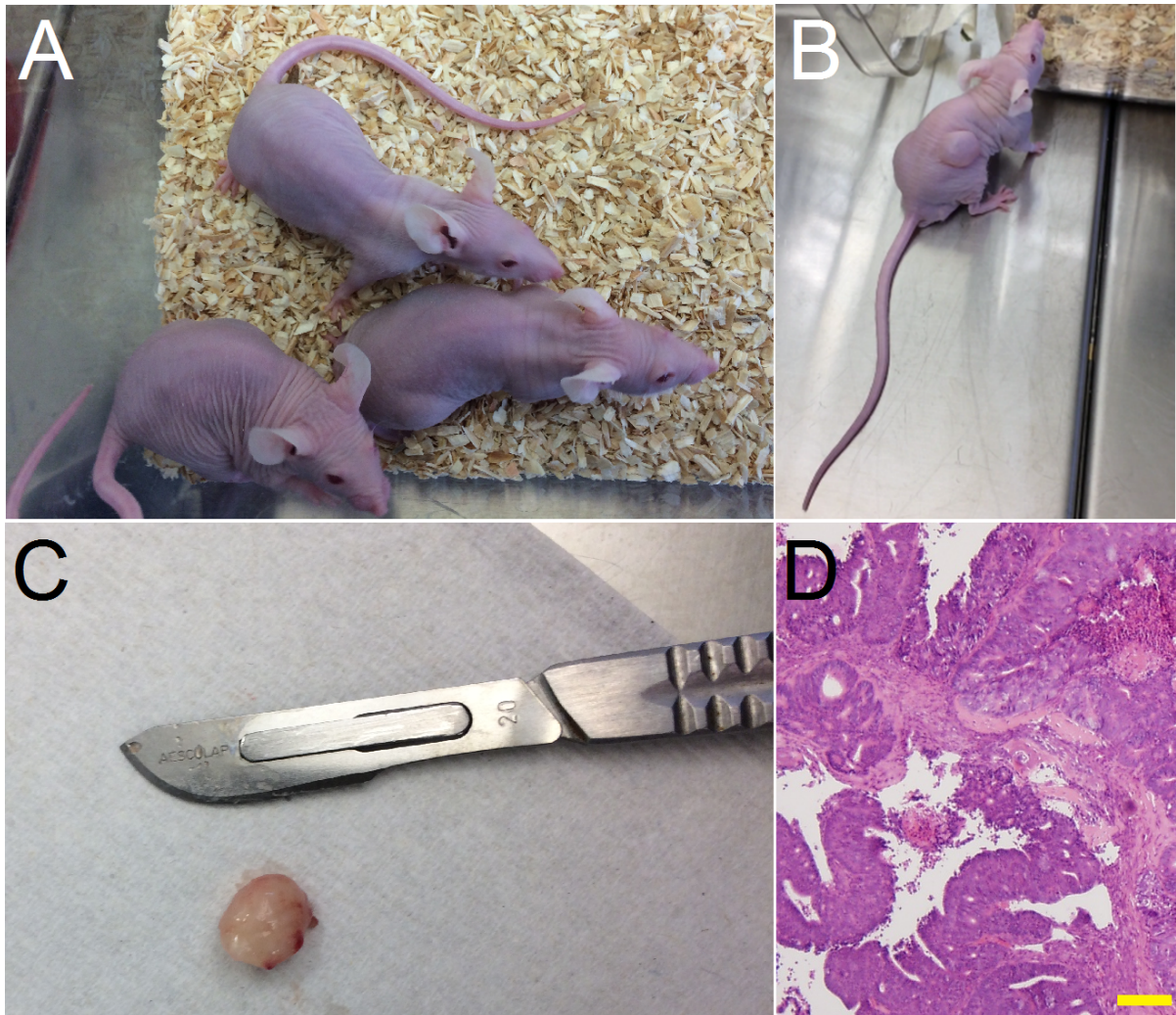
Obr.27 Príprava dvojzložkového chemiluminiscenčného substrátu a detekcia signálu pomocou manuálnej expozície fotocitlivého filmu v tmavej komore. Chemiluminiscenčné činidlo sa tesne pred použitím pripraví zmiešaním dvoch zložiek (A,B). Membrána s naviazanými proteínmi sa vyberie z premývacieho pufru (C) a jej povrch sa pokryje chemiluminiscenčným roztokom na 1-2 minúty. Následne sa membrána jemne zbaví nadbytku roztoku priložením k povrchu filtračného papiera (D) a umiestni sa medzi dve priehľadné plastové fólie (E), ktorá sa pripevní do špeciálnej kovovej expozičnej kazety (F,G). Vývojka, destilovaná voda a ustaľovač sa pripravujú do nízkych plastových nádob. Samotná expozícia fotocitlivého materiálu sa realizuje pri špeciálnom červenom osvetlení tmavej komory. Exponovaný materiál sa vyvolá umiestnením do vývojky na 3-4 minúty, oplachom v destilovanej vode (2-3 minúty) a umiestnením do ustaľovacieho roztoku na 3-4 minúty. Po následnom oplachu v destilovanej vode sa film pred skenovaním nechá vysušiť. (C) autor



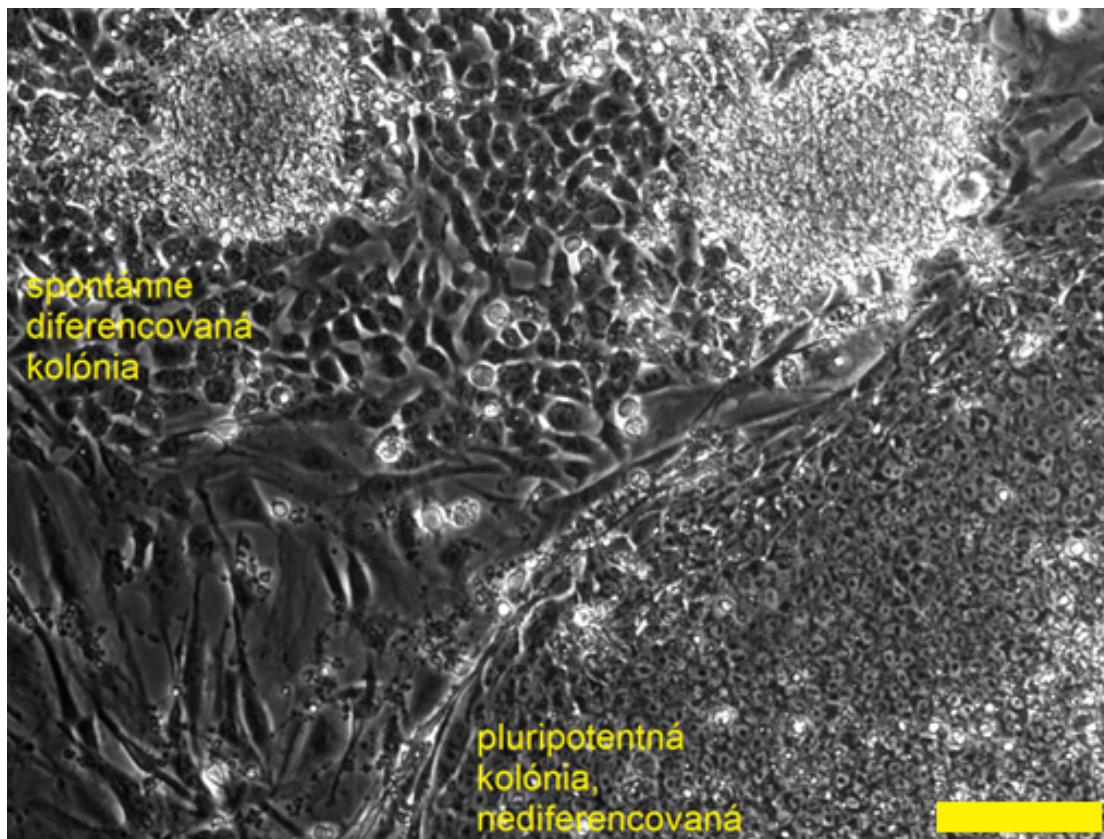


Obr.28 Multiplexová analýza exprese transkripčných faktorov proteínovými čipmi (*antibody array*). Metóda umožňuje stanovenie prítomnosti a semikvantitatívne hodnotenie hladín intracelulárnych proteínov v rámci jednej vzorky, ktorou môže byť sérum, plazma, likvor alebo lyzát z buniek alebo nádorového tkaniva. Podrobný postup je uvedený v texte (strana 56). (C) autor



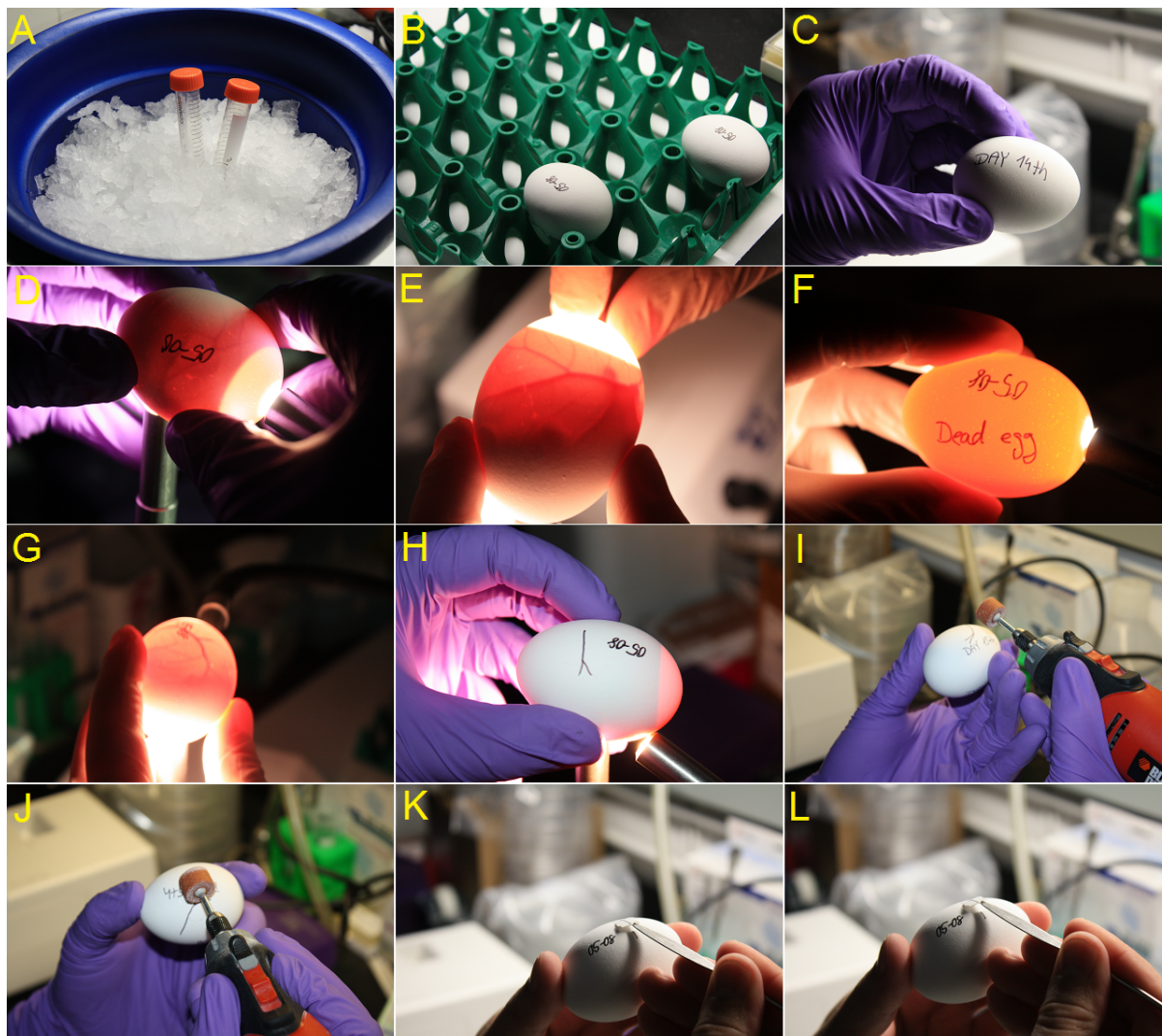


Obr.29 Transplantácia nádorových buniek novovytvorenej bunkovej línie, odvodenej z ľudského nádoru pankreasu, do podkožia jedincov atymických myší línie Crl:NU(NCr)-Foxn1nu (A) za účelom overenia ich schopnosti vytvoriť nádor, histologicky ekvivalentný s pôvodným nádorovým ložiskom. Podkožná aplikácia suspenzie buniek (cca  $1 \times 10^6$  buniek v 200  $\mu$ l PBS) viedla k vytvoreniu rýchlo rastúcich nádorov cca 4-5 týždňov po aplikácii (B-D). Transplantácia buniek do organizmu iného živočíšneho druhu sa nazýva xenotransplantácia a je bežnou technikou, používanou v základnom onkologickom výskume. Mierka predstavuje 1 mm. (C) autor

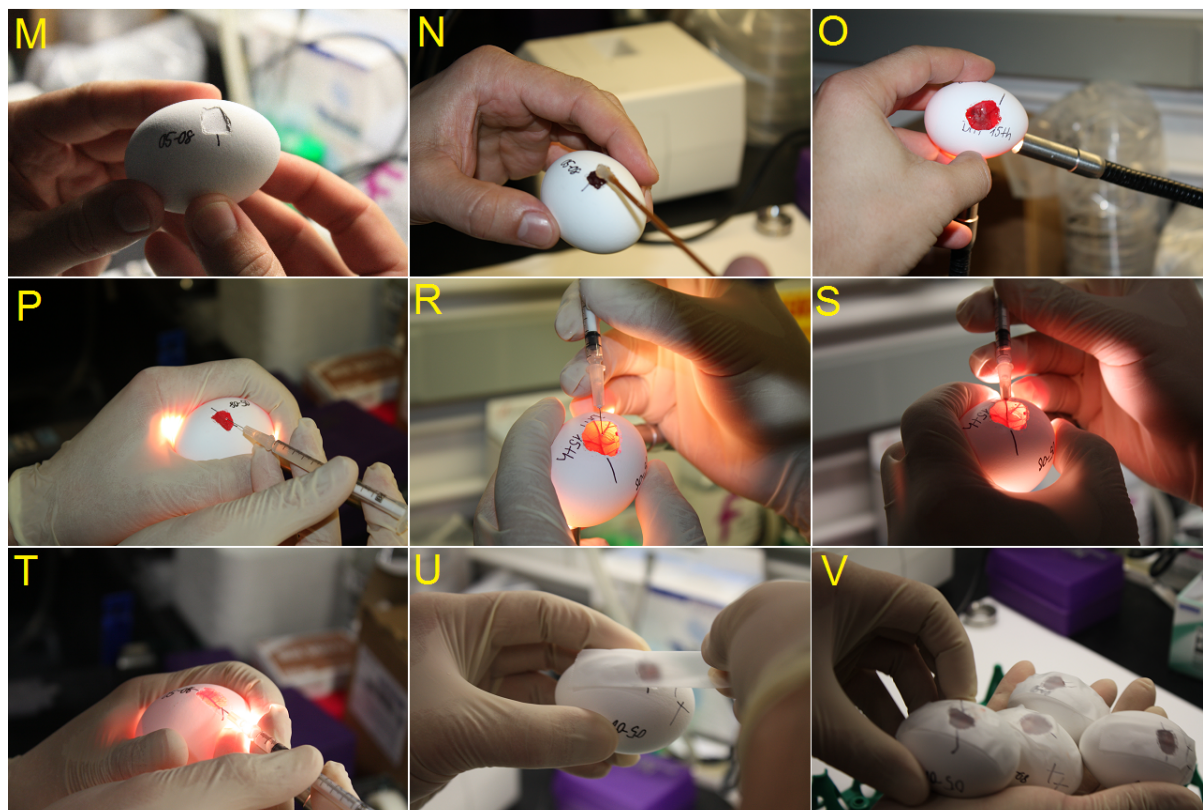


Obr.30 Príklad nediferencovanej kolónie indukovaných pluripotentných kmeňových buniek a spontánne diferencovanej kolónie, nevhodnej na ďalšie experimenty. Pre *in vivo* testovanie pluripotencie indukovaných kmeňových buniek pomocou tzv. *teratoma assay* (indukcia teratómu xenotransplantáciou kmeňových buniek do podkožia atymických myší) je nutné použiť nediferencované kolónie buniek, inak nedôjde k vytvoreniu troch zárodočných vrstiev (*three germ layers*). Mierka predstavuje 50  $\mu\text{m}$ . (C) autor



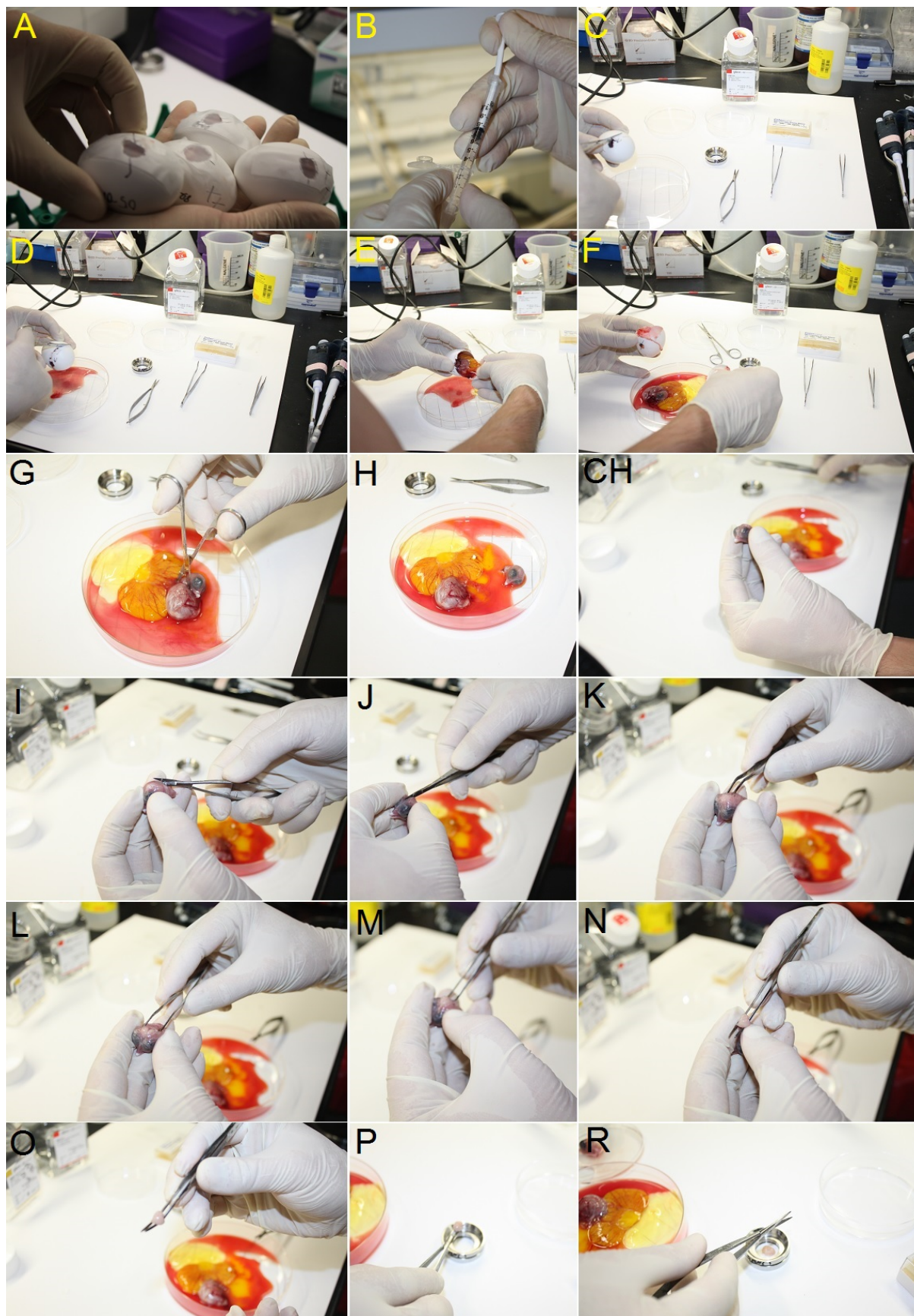


Obr.31 Využitie kuracích embryí na testovanie metastatickej aktivity nádorových buniek. Transplantované bunky sa až do transplantácie uchovávajú na ľade. Fertilizované slepačie vajíčka sa po 15 dňoch inkubácie skontrolujú pod svetelným zdrojom (B-E), pričom sa vyradia kusy s mŕtvymi zárodkami (F). V oblasti, v ktorej sa nachádza „pupočná šnúra“ sa malým brúsnym kotúčom pripraví otvor s rozmermi cca 1x1 cm (G-J), vyfrézovaná časť sa jemne odstráni špachtličkou alebo pinzetou (K,L). Pokiaľ sa pri tejto procedúre objaví malé krvácanie, je potrebné vajíčko vyradiť. (C) autor a Mgr. Daniela Strnádelová

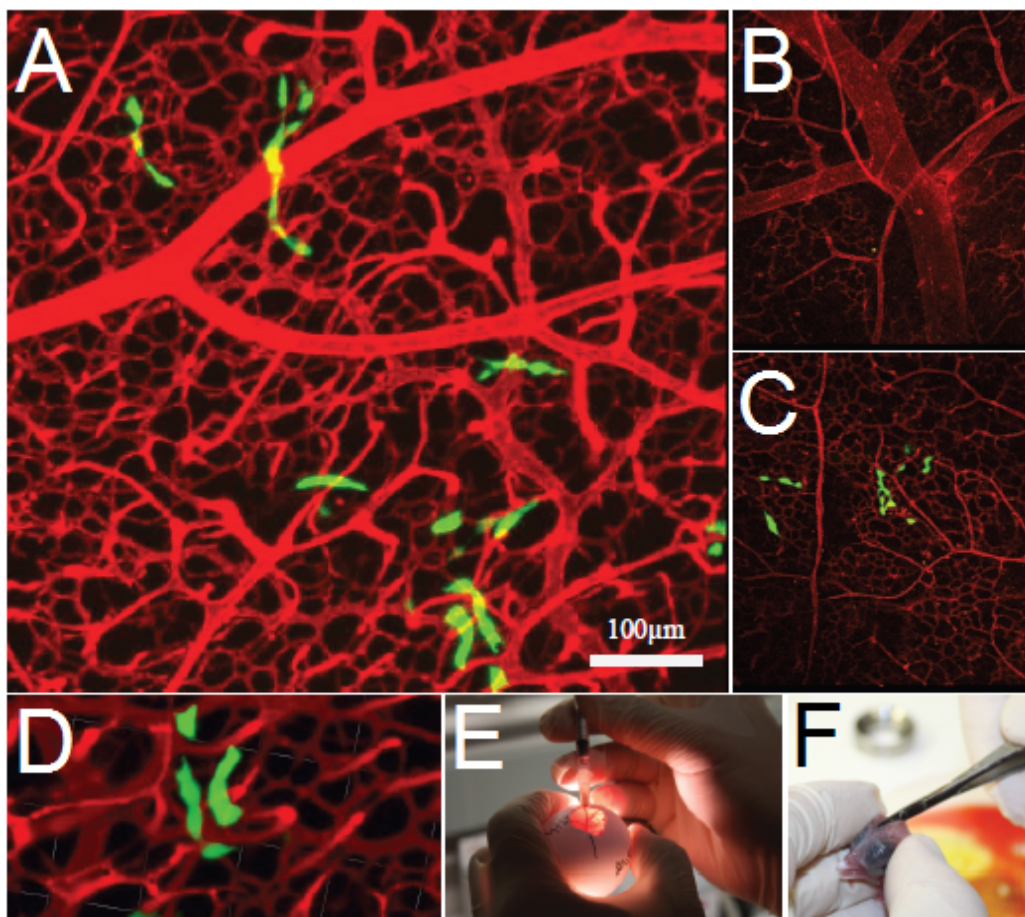


Obr.32 Injekčná transplantácia GFP-tagovaných (značených) ľudských nádorových buniek do 15-dňového embrya kurčat'a. Po príprave otvoru frézovaním škrupiny (M), bez viditeľných stôp krvácania, sa blanka umiestnená pod škrupinou potrie minerálnym olejom, čím sa stane transparentná (N,O). Injekčne sa pomocou 1 mL striekačky aplikuje suspenzia buniek v smere prúdenia krvi (detailný postup je uvedený v texte) a otvor sa prelepí lepiacou páskou (nezalepený otvor je inak veľmi rýchlo kolonizovaný plesňami) a injikované vajíčka sa presunú do inkubátora. Po 1-5 dňoch sa embryá extrahujú a použijú na mikroskopovú analýzu metastázujúcich buniek. (C) autor a Mgr.Daniela Strnádelová



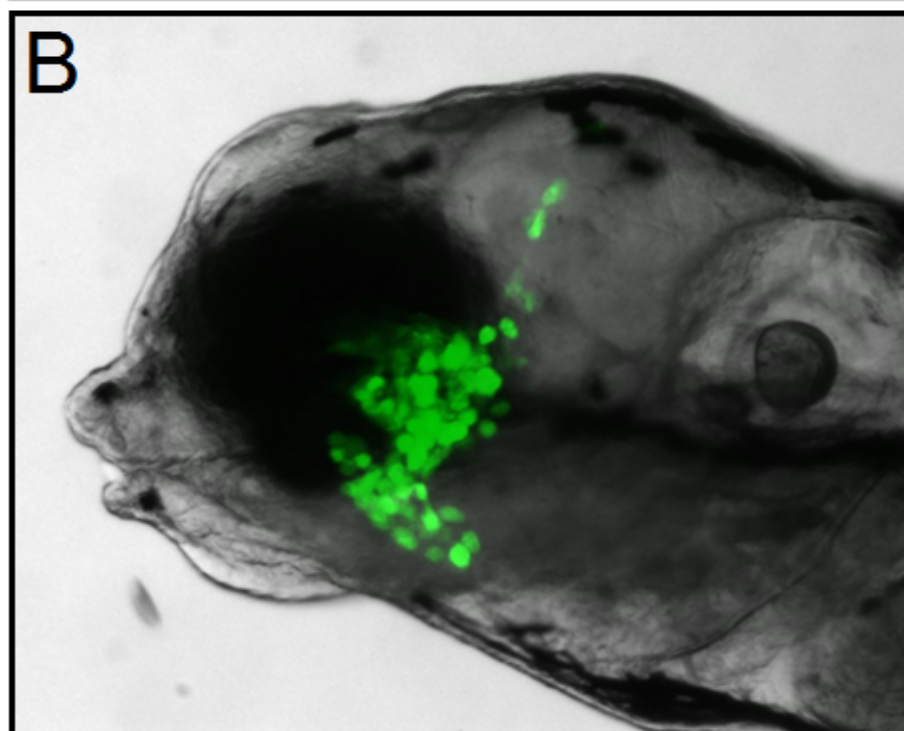
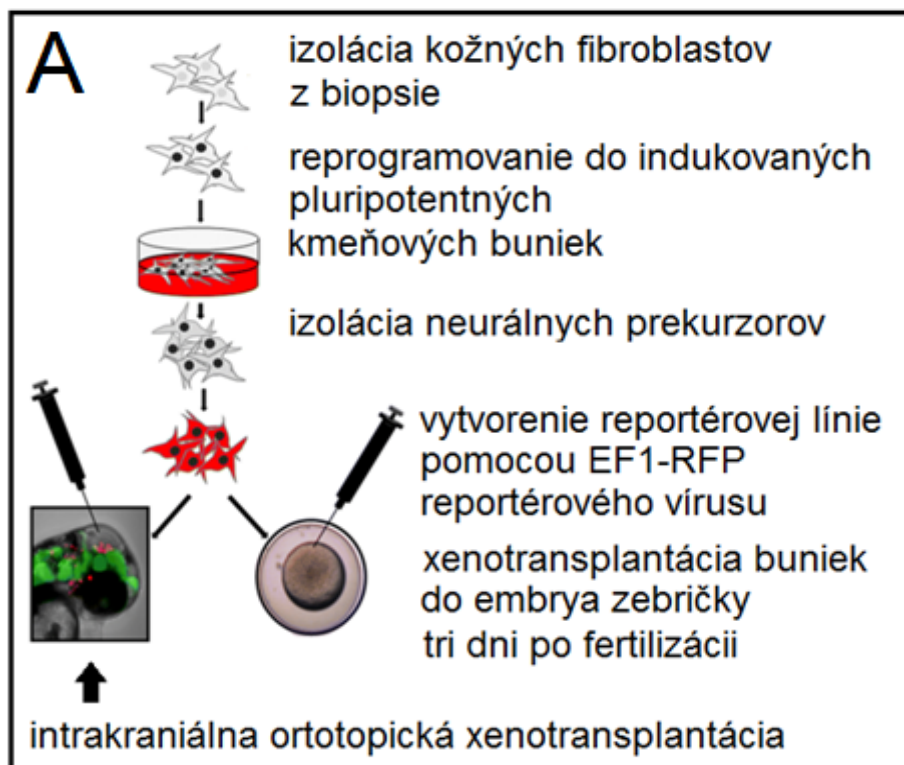


Obr.33 Extrakcia mozgového tkaniva na vizualizáciu metastázujúcich, fluorescenčne značených ľudských nádorových buniek v kuracom embryu pomocou konfokálneho mikroskopu. Podrobný postup extrakcie je uvedený v texte (strana 69). Extrahované mozgové tkanivo sa umiestni na krycie sklíčko a následne vizualizuje pomocou konfokálneho mikroskopu. (C) autor a Mgr.Daniela Strnádelová



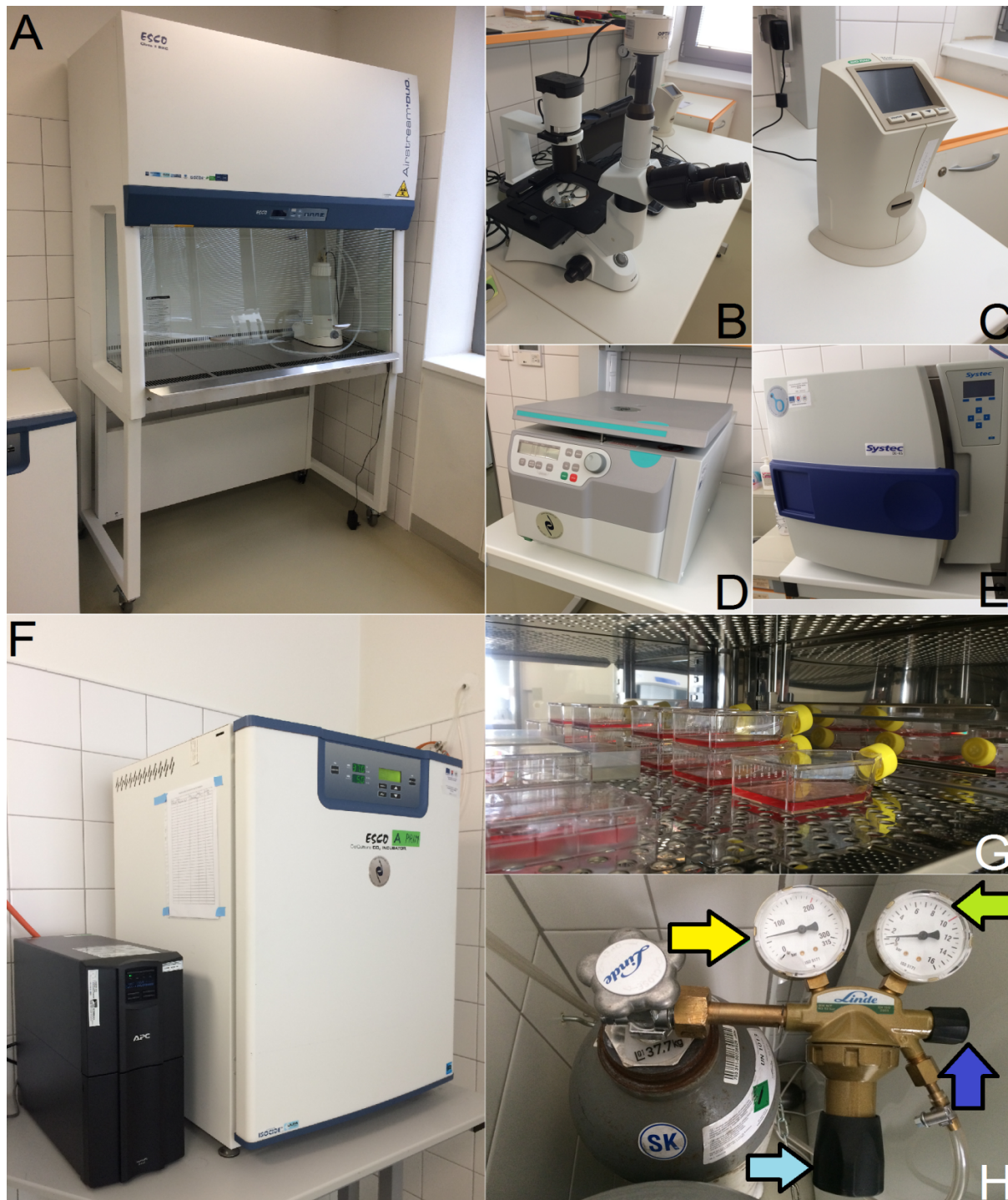
Obr.34 *In vivo* testovanie metastatickej schopnosti ľudských nádorových buniek na modeli kuracieho embrya (A-D). Bunky, exprimujúce eGFP boli injikované do embrya v 14.dni embryonálneho vývoja (E). Po šiestich dňoch boli embryá injikované farbivom, viažúcim sa na steny ciev (A-D). Týmto spôsobom sa vizualizovali krvné cievy, ktoré vytvorili kontrastné pozadie pre fluorescenčne značené bunky (A-D). Na vizualizáciu nádorových buniek v mozgu embrya (F) sa použil konfokálny mikroskop. (C) autor



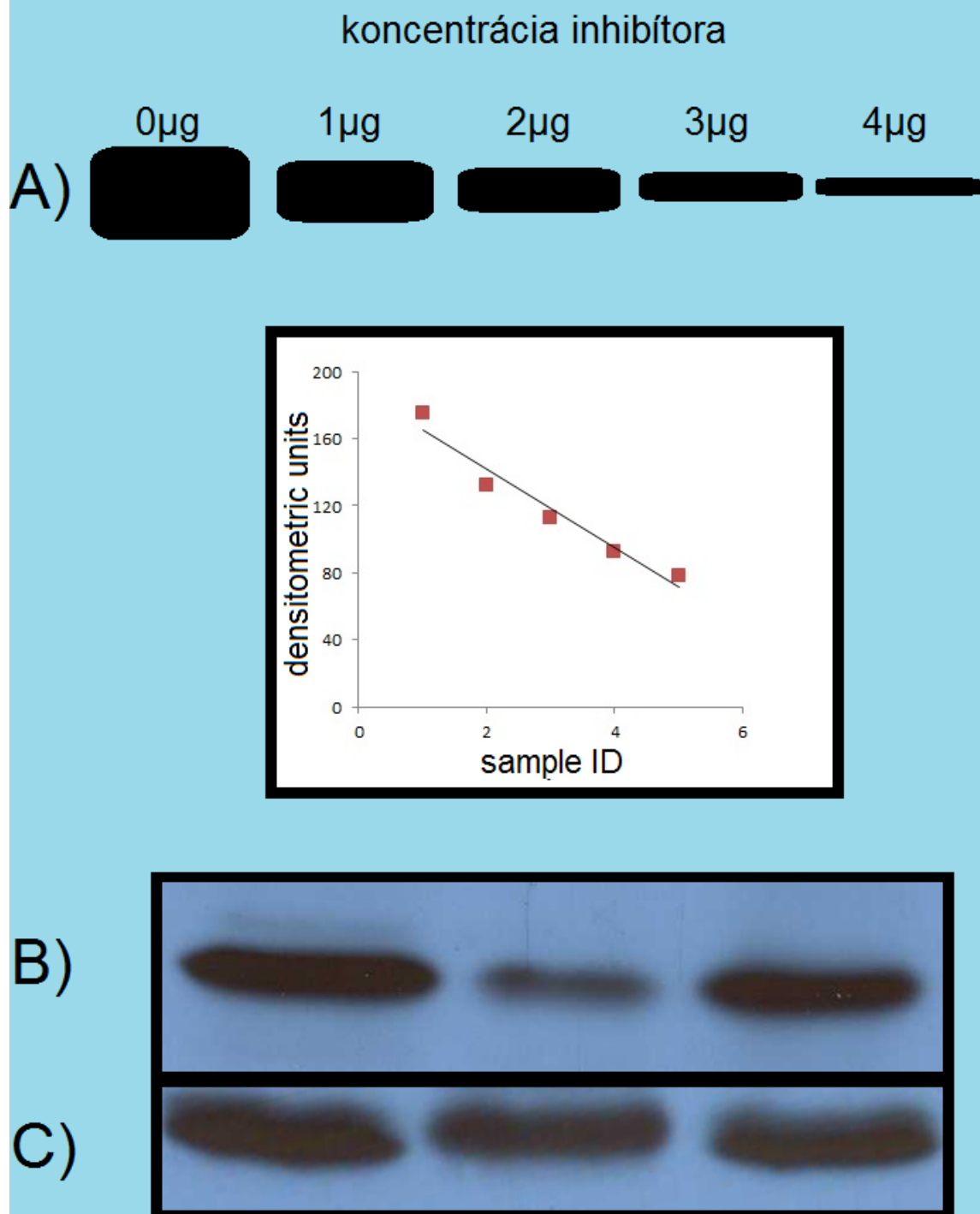


Obr.35 Príklad xenotransplantácie ľudských nádorových buniek do embrya ryby v skorom štádiu vývoja za účelom prípravy malého živočíšneho modelu na *in vivo* štúdium transplantovaných buniek. Na obrázku je uvedený schématický popis dvoch spôsobov transplantácie (A) a výsledok intraembryonálnej xenotransplantácie (B) fluorescenčne značených ľudských nádorových buniek. (C) autor, upravené podľa Strnadel et al., 2018 (*Journal of Molecular Neuroscience*).





Obr.36 Typické prístrojové vybavenie bunkového laboratória. Laminárny box triedy BSL-2 s tzv. hepa filtračným systémom (A) umožňuje prácu s bunkami v aseptických podmienkach. Invertovaný mikroskop (B) umožňuje pozorovanie fenotypu buniek a ich fotodokumentáciu, automatický prístroj (C) slúži na rýchle určenie počtu a viability buniek, chladená centrifúga (D) umožňuje rýchle peletovanie buniek, parný sterilizátor (E) sa používa na prípravu sterilného materiálu a roztokov na prácu s bunkami. Inkubátor (F) mimikuje *in vivo* podmienky a vytvára optimálne prostredie pre bunky. Je napojený na tlakovú fľašu (bombu) s obsahom oxidu uhličitého medicínskej kvality (H). Regulačný ventil na fľaši obsahuje manometer (tlakomer), merajúci tlak vo fľaši (žltá šípka) a výstupný tlak, smerujúci do inkubátora (zelená šípka). Výstupný tlak je možné meniť regulátorom (belasá šípka). Modrá šípka ukazuje regulátor prietoku do systému. (C) autor



Obr.37 Modelový (umelo vytvorený) príklad denzitometrickej analýzy výsledkov Western blot experimentu. V príklade sa použili bunkové lyzáty z buniek, inkubovaných s rôznou koncentráciou špecifického inhibítora detekovaného proteínu (A). Denzitometrická analýza intenzity škvŕn potvrdila lineárny charakter vplyvu špecifického inhibítora na expresiu proteínu. Výsledky je možné vyjadriť ako „densitometric units“ alebo „*relative units*“ resp. „*relative ratio*“ v prípade, že sa výsledky vzťahnu na zvolenú referenčnú vzorku. Obrázok (B) zobrazuje reálnu analýzu proteínu Hsp-70 v lyzátoch nádoroch, (B) obrázok zobrazuje tzv. *loading control* (kontrolu množstva nanesej vzorky, získanej pomocou stanovenia expresie GAPDH proteínu). (C) autor