

F7DIBKDS Metody práce s buněčnou kulturou a dynamické systémy

Návod na cvičení 2: Systémy pro mechanickou zátěž buněčné kultury

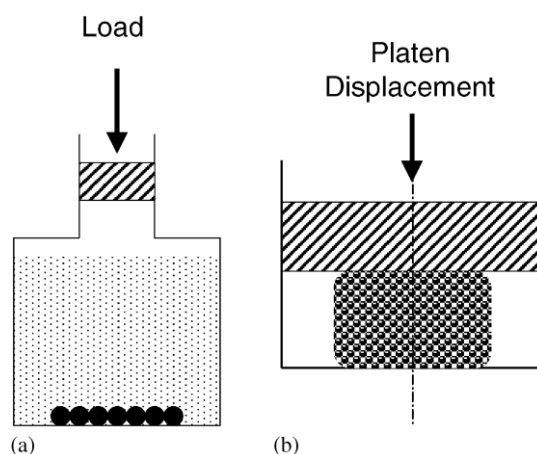
SYSTÉMY PRO MECHANICKOU ZÁTĚŽ BUNĚČNÉ KULTURY

Autor: Ing. Jana Štěpanovská, Ing. Roman Matějka

Mnoho systémů již byly navrženo pro mechanickou stimulaci buněčných a tkáňových kultur. Tyto přístroje mohou být rozděleny do kategorií v podmínkách pro jejich primární způsob namáhání: stlačení (hydrostatický tlak nebo přímý kontakt přítlačné desky), podélné roztažení, ohyb, osové symetrické vyduť substrátu, rozptyl rovinného substrátu a smykové napětí.

KOMPRESIVNÍ NAMÁHACÍ SYSTÉMY

Hydrostatická komprese má několik podstatných výhod: jednoduchost zařízení, prostorová homogenita stimulu, snadnost konfigurace více zátěžových replikátů (pomocí rozdělovače) a snadnost dodání a přenosu buď statických nebo přechodných zátěžových vstupů. Vzhledem k nepřímému kontaktu s zatěžovacím systémem desky, nevzniká žádné nebezpečí ohledně lokálního stlačení vzorků a dochází tak k plynulému přenosu metabolitů mezi kultivační vrstvou a živným médiem. Dodávané zatížení navíc není závislé na stavu adheze mezi kulturou a jejím substrátem. Bohužel tlaky plynů v inkubátoru odpovídají kvazi-fyziologickému kultivačnímu stresu vedoucí k vysoké hladině pO_2 a pCO_2 . Další výkyvy mohou nastat při příliš nízké nebo vysoké frekvenci tlakových pulsů.



Obrázek 1 - sestavy pro kompresivní namáhání. A) kompresivní namáhání 2D buněčné kultury prostřednictvím tlaku širčícího se kultivačním médiem. B) tlakové namáhání buněk inkorporovaných do buněčného nosiče, který je přímo tlakově komprimován pístem.

PODÉLNÉ JEDNOOSÉ NATAHOVÁNÍ SUBSTRÁTU

Systém pro podélné jednoosé namáhání jsou často využívána zejména kvůli jednoduché implementaci a nízké ceně. Podstatu je působení síly v jednom směru na substrát osazený buňkami, přičemž substrát musí být do jisté míry elastický. Z toho důvodu se nejčastěji používají silikonové, polystyrenové apod. polymerové substráty, příp. nativní tkáň.

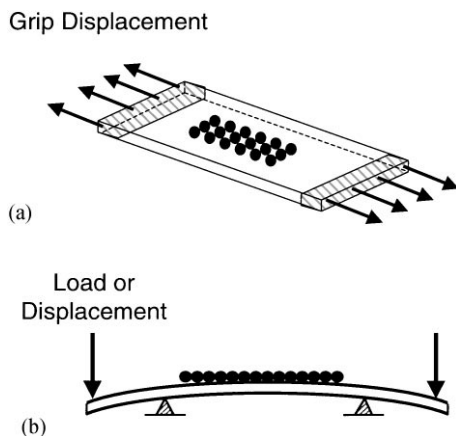
Biomedicínské inženýrství pro znalostní ekonomiku, CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002242

Modernizace laboratoří pro biomedicínské inženýrství, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002244



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



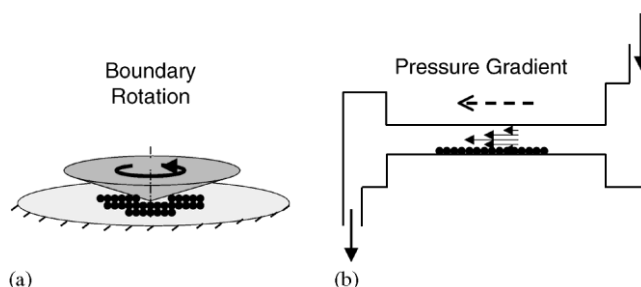


Obrázek 2 - systémy s jednoosým namáháním a) podélnou tenzí, b) flexí substrátu.

PRŮTOKOVÉ SYSTÉMY SE SMYKOVÝM NAPĚTÍM

Proliferace širokého spektra buněk je závislá na působení smykového napětí, působícího na buněčné mechanoreceptory (mebránové receptory, iontové kanály, integriny apod.) mající vliv na další procesy (hladiny intracelulárního calcia, oxidu dusného, prostacyclin, remodelace cytoskeletu). Průtokové systémy využívají dvou konfigurací. Jednou je rotace kónického kužele kolmo uloženého nad povrchem desky. Protože jak lokální relativní rychlost, tak i vzdálenost mezi povrchy kužele a desky se mění lineárně s radiální polohou, dosáhne toto uspořádání prostorově homogenního smykového napětí na obou příslušných površích. V závislosti na kuželovém zúžení a uložené úhlové rychlosti lze dosáhnout širokého rozsahu smykového napětí, které sahá i do turbulentního režimu.

Druhou hlavní konfigurací je sestava rovnoběžných desek, mezi kterými protéká médium. Vzhledem k malé velikosti štěrbiny vzniká mezi deskami laminární proudění a buňky jsou rovnoměrně namáhány smykovým napětím. Pohon média mezi deskami může být proveden jak gravitačně, tak může být poháněno i pumpou. V závislosti na geometrických vlastnostech desek a rychlosti proudění média může být vytvořeno variabilní smykové napětí.



Obrázek 3 - konfigurace systémů s průtokovým namáháním: a) rotující kužel, b) paralelní desky.

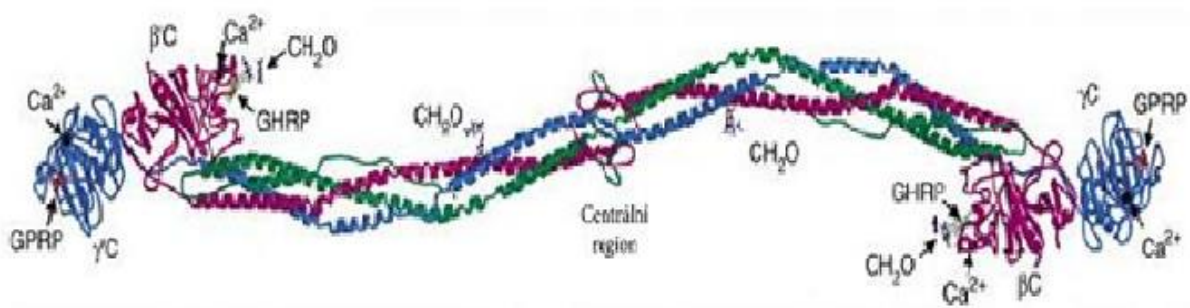
PŘÍPRAVA GELOVÝCH SUBSTRÁTŮ JAKO NÁHRADA ECM

Extracelulární hmota (matrix, ECM) je substrát, ke kterému je uchycena většina buněk organismu. Buňka interaguje s ECM pomocí membránových glykoproteinů (integrinů), které přenášejí potřebné informace do nitra buňky. Následně pak dochází k expresi příslušných genů, a tím je ovlivněna proliferace, diferenciací, maturace a pohyblivost buněk. ECM je složena z vláken kolagenu, elastinu, proteoglykanů, polysacharidu kys. hyaluronové a glykoproteinů odpovědných za interakci s buňkami (laminin, fibronektin).

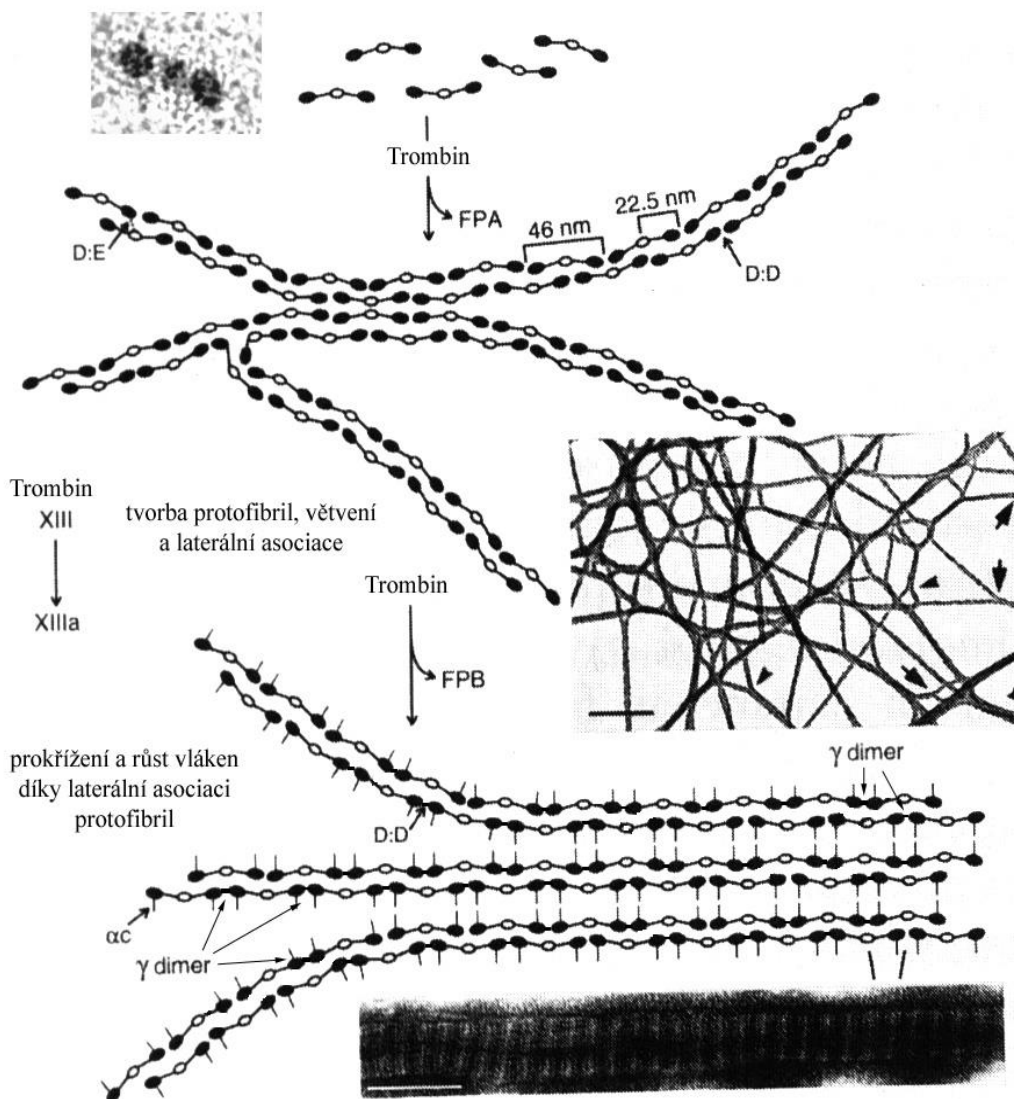
Ve všech tkáních dochází k pomalé obnově ECM. Zvýšená a regulovaná obnova ECM je patrná při hojení poranění. V okamžiku poranění dochází k porušení integrity cévního systému s následkem krvácení a extravazací složek krve do poraněného místa. Organismu se snaží s tímto stavem vyrovnat zachováním hemostázy díky aktivaci koagulační kaskády. Výsledným krokem koagulační kaskády je aktivace protrombinu na trombin, který přeměňuje fibrinogen na fibrin. Jednotlivé fibrinové monomery polymerují za vzniku fibrinové sítě. Tento fibrinový klot ucpává poraněné místo a chrání cévy před krvácením. Fibrinová síť rovněž podporuje migraci leukocytů, fibroblastů a endoteliálních buněk do poraněného místa a slouží jako dočasná matrice pro jejich ukotvení a proliferaci.

VYUŽITÍ FIBRINOVÝCH SÍTÍ V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ

Fibrinová síť napomáhá nejen k zástavě krvácení, ale zároveň poskytuje dočasnou matrici, na kterou se vážou různé proteiny extracelulární matrix a růstové faktory. Společně tak výraznou měrou přispívají k obnově poraněné tkáně. Právě tyto rozmanité vlastnosti fibrinových sítí jsou hojně využívány v tkáňovém inženýrství a medicíně. Tzv. fibrinová lepidla se například používají k zástavě krvácení, dále jako náhrada sešití poraněných tkání, k léčbě tříselné kýly, k léčbě jater, chrupavek a kostí. Jedná se nejčastěji o roztoky fibrinogenu ve velmi vysokých koncentracích. Fibrinogen se po smíchání s trombinem rychle přeměňuje na fibrinový gel. Kombinace buněk přidaných do fibrinu slouží k doručení buněk na místo určení. Tento postup lze využít např. při hojení poranění kůže, nebo také při léčbě nekrotických míst na srdci po infarktu myokardu.



Obrázek 4 Molekula fibrinogenu (340 kDa). Fibrinogen se skládá ze 3 polypeptidových řetězců: α řetězec – zelená, β řetězec – fialová, γ řetězec – modrá.



Obrázek 5 Tvorba fibrinové sítě.



Obrázek 6 Fibrinový gel.

VYUŽITÍ NANOVLÁKENNÝCH NOSIČŮ JAKO SUBSTRÁTŮ PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Nanovlákná připravená efektivní technologií elektrostatického zvlákňování (tj. elektrospinningu) zaznamenávají neustále rostoucí uplatnění ve všech sférách lidské činnosti, jako jsou průmyslové i biomedicínské technologie. Nanovláknenné materiály lze využít např. na odstranění mikrobiálních, organických i anorganických kontaminantů z vody a vzduchu na podkladě filtrace a adsorpce, pro hemodialyzační systémy, pro konstrukci senzorů včetně biosenzorů, pro cílenou dodávku a řízené uvolňování léčiv, pro buněčnou i genovou terapii, a zvláště pro konstrukci nosičů buněk (tzv. scaffoldů) pro tkáňové inženýrství. Nanovlákná totiž alespoň do jisté míry napodobují vláknitou složku přirozené extracelulární matrix, a jsou tudíž považována za vhodný substrát pro adhezi a růst buněk. Pro zvýšení buněčné adheze a růstu, a rovněž pro nasměrování jejich žádoucí diferenciaci a fenotypické maturace, lze tato nanovlákná funkcionalizovat různými chemickými funkčními skupinami a biologicky aktivními molekulami, jako jsou proteiny zprostředkující adhezi buněk (fibronektin, kolagen, laminin) a oligopeptidickými ligandy odvozenými z těchto proteinů (RGD, KRSR, IKVAV....), růstovými faktory (VEGF, FGF-2, BMP-4) či enzymy (např. alkalická fosfatáza pro navození mineralizace pro inženýrství kostní tkáně). Pomocí elektrostatického zvlákňování mohou být

Biomedicínské inženýrství pro znalostní ekonomiku, CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002242

Modernizace laboratoří pro biomedicínské inženýrství, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002244



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání

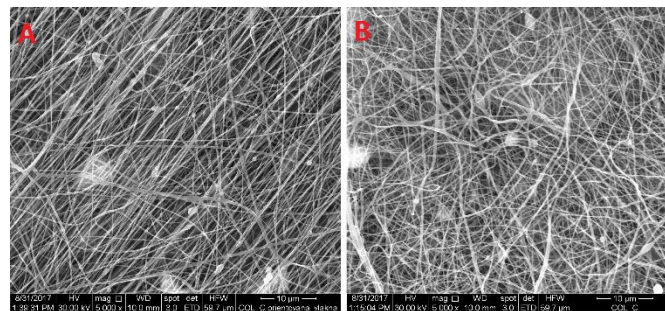


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Návod na cvičení 2: Systémy pro mechanickou zátěž buněčné kultury

nanovláknna připravena z celé řady materiálů, jako jsou syntetické polymery (např. polylaktid, polyglykolid, polykaprolakton a jejich kopolymery), přírodní polymery (želatina, chitosan, silk fibroin, deriváty celulózy), a dokonce i minerální substance, jako jsou fosfáty kalcia či oxidy křemíku pro inženýrství kostní tkáně. Pro inženýrství tvrdých tkání mohou být polymerní nanovláknna zpevněna i minerálními či uhlíkovými nanočásticemi (např. nanočásticemi hydroxyapatitu, grafenu, uhlíkových nanotrubiček, nanodiamantů), přidanými přímo do roztoku polymeru pro elektrospinning. Nanovláknenné matrice lze využít pro rekonstrukci širokého spektra tkání i orgánů – kromě již zmíněného inženýrství kostní tkáně jsou vhodné i pro kardiovaskulární tkáňové inženýrství, pro inženýrství tukové tkáně pro terapeutické i estetické rekonstrukce, pro rekonstrukci chrupavky, a v neposlední řadě i pro rekonstrukci kůže či jako léčivé a antimikrobiální kryty pro hojení akutních i chronických ran včetně popálenin, proleženin, diabetických defektů.

V případě elektrostatického zvlákňování je ovlivněna výsledná struktura vláken řadou parametrů. Kromě volby samotného polymeru a rozpouštědla ovlivňuje výsledné vlákno gradient elektrického pole – tj. samotná velikost napětí a vzdálenost emitoru a kolektoru; forma emitoru (jehlový nebo bezjehlový emitor) a kolektor (statický; rotační; strukturovaný).



Obrázek 7 – srovnání orientovaných A a neorientovaných B nanovláken kolagenu 1. Orientace nanovláken bylo dosaženo pomocí zachytávání vláken na rotační elektrodu.

PŘÍPRAVA NANO VLÁKENNÉHO NOSIČE Z KOLAGENU TYPU 1

VYBAVENÍ A POMŮCKY

- Systém na přípravu nanovláken
- Laminární box
- Systém na přípravu ultračisté vody
- Analytické váhy

Příprava musí probíhat ve sterilních podmínkách!

PŘÍPRAVA POLYMERU

1. Navažte a odměřte látky potřebné pro přípravu polymeru pro zvláknění – pracujte v digestoři, a používejte skleněné nádoby
 - a. Kolagen typ 1 – celkový podíl bude 8% hmotnostně
 - b. Rozpouštědlo roztok kys. Octové
2. Připravený roztok dejte rozvolnit do třepačky

PŘÍPRAVA NEORIENTOVANÉHO NANOVLÁKENNÉHO NOSIČE POMOCÍ JEHLY

1. Připravený roztok nasajte do 5 ml stříkačky
2. Připravte systém pro vláknění – základní nastavení
 - a. Připravte emitor s jednou jehlou vel. G20
 - b. Připravte kolektor typu plošná deska a umístěte na jeho povrch vrstvu sterilní netkanné textile
 - c. Vložte kolektor i emitor do depoziční komory, připojte k dávkovači polymeru
3. Nastavte depoziční parametry
 - a. Depoziční vzdálenost 25 cm
 - b. Nastavte základní napětí 40 kV
 - c. Dávkovaný objem nastavte na 50 ul/min
 - d. V komoře nastavte proudění vzduchu na 20 l/min
4. Spusťte vláknící proces
 - a. Postupně zvyšujte depoziční napětí dokud nedojde ke vzniku vlákníci trysky, cca. 45 – 50 kV dle stupně rozvolnění
 - b. V případě, že dochází k rychlému zvláknění kapky na jehle, zvýšte dávkovaný objem na ca. 60 – 75 ul
5. Deponujte po dobu 20 minut

Návod na cvičení 2: Systémy pro mechanickou zátěž buněčné kultury

6. Po ukončení depozice vyjměte kolektor s připravenými vlákny, pomocí skalpelu tyto vlákna nařežte na čtverce 25 x 25 mm a nechte po dobu 30 min sterilizovat pod UV zářením.
7. Sterilní vlákna uchyťte do kultivační komory.

PŘÍPRAVA ORIENTOVANÉHO NANOVLÁKENNÉHO NOSIČE POMOCÍ BEZJEHLOVÉHO EMITORU

1. Doplňte polymer do 5 ml stříkačky
2. Připravte systém pro vlákennění – základní nastavení
 - a. Připravte dvoukanálový emitor pro bezjehlové zvláknění
 - b. Připravte kolektor plný válec a jeho povrch důkladně očistěte etanolem
 - c. Vložte kolektor i emitor do depoziční komory, připojte k dávkovači polymeru
3. Nastavte depoziční parametry
 - a. Depoziční vzdálenost 20 cm
 - b. Nastavte základní napětí 45 kV
 - c. Dávkovaný objem nastavte na 100 ul/min
 - d. V komoře nastavte proudění vzduchu na 20 l/min
 - e. Otáčky válce nastavte na 3300 1/min
4. Spusťte vlákníci proces
 - a. Postupně zvyšujte depoziční napětí dokud nedojde ke vzniku vlákníci trysky, cca. 50 – 60 kV dle stupně rozvolnění
 - b. V případě, že dochází k rychlému zvláknění kapky na jehle, zvýšte dávkovaný objem na ca. 120-140 ul
5. Deponujte po dobu 20 minut
6. Po ukončení depozice vyjměte kolektor s připravenými vlákny, pomocí skalpelu tyto vlákna odřízněte podélně a poté rozdělte na čtverce 25 x 25 mm a nechte po dobu 30 min sterilizovat pod UV zářením.
7. Sterilní vlákna uchyťte do kultivační komory.

PŘÍPRAVA FIBRINOVÉHO HYDROGELU PRO ODLITÍ NA NANOVLÁKENNÝ SUBSTRÁT

VYBAVENÍ A POMŮCKY

- Horkovzdušný sterilizátor
- Laminární box
- Systém na přípravu ultračisté vody
- Analytické váhy

- Invertovaný fluorescenční mikroskop

Příprava musí probíhat ve sterilních podmínkách!

- 1) Zásobní fibrinogen
- 2) Zásobní trombin
- 3) Tris pufr pH 7,4
- 4) Buněčná suspenze

POSTUP

- 1) Připravenou suspenzi buněk rozřeďte ve 400 μ l média
- 2) K suspenzi přidejte fibrinogen, aby výsledná koncentrace fibrinogenu byla 1 mg/ml
- 3) Roztok fibrinogenu a buněk naneste do kultivační komory
- 4) Připravte si roztok trombinu o koncentraci 2 U/ml, ředíte Tris pufrém pH 7,4
- 5) Roztok trombinu přidejte k roztoku v kultivační komoře rovnoměrně po celém povrchu. POZOR! Pracujte při nanášení co nejrychleji, gel se bude tvořit v komoře rychle.
- 6) Ponecháte tvořit klot cca 5 minut a následně dovestavte kultivační komoru a vložíte ji do inkubátoru.
- 7) Připojte komoru k systému pro mechanické zatěžování buněčné kultury. Zaznamenávejte každou hodinu stejné zorné pole fázovým mikroskopem a vyhodnoťte vliv mechanické zátěže na proliferaci buněk v gelu.

KONTROLNÍ OTÁZKY

- 1) Co je extracelulární matrix?
- 2) Co je výsledkem koagulační kaskády?
- 3) Co jsou biomateriály?
- 4) Co jsou nanovlákná a jak jsou charakterizovaná?
- 5) Jaký je rozdíl mezi technikou jehlové a bezjehlové konfigurace u elektrovláknění?
- 6) Jak je možné docílit orientace nanovláken?
- 7) Jak vzniká fibrinový gel?
- 8) K čemu používá fibrinový gel v medicíně?

Literatura:

1. Thomas D Brown, Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review, Journal of Biomechanics, Volume 33, Issue 1, 2000, Pages 3-14, ISSN 0021-9290.
2. Vlastní archiv autora

