

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Izolace buněk z periferní krve

Kateřina Netíková

Bakalářská práce

2019

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Isolation of peripheral blood cells

Kateřina Netíková

Bachelor Thesis

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Netíková**
Osobní číslo: **C15250**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Izolace buněk z periferní krve**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na izolaci buněčných populací z periferní krve. V práci se nejprve zaměřte na přehled krevních buněk se zvláštním zřetelem na buňky jaderné. Po uvedení jejich funkce, morfologických a diferenciačních znaků, které mohou být využity k jejich purifikaci, se zaměřte na uvedení přehledu metod sloužících k selektivní izolaci těchto buněk. Speciálně se zaměřte na techniky imunologické, popř. fyzikálně chemické (Percoll, Ficoll, apod.).
- 2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. ScienceDirect, HighWire, NCBI Pubmed, apod.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jiří Handl**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jan Čapek**
Katedra biologických a biochemických věd

Ostatní konzultanti: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4.7. 2019

Kateřina Netíková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Janu Čapkovi za trpělivost, veškeré poskytnuté rady a ochotný přístup při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Jířímu Handlovi za vedení této práce. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a nejbližším přátelům za jejich podporu po celou dobu mého studia.

ANOTACE

V mé bakalářské práci „Izolace buněk z periferní krve“ se zabývám mononukleárními buňkami z periferní krve a jejich izolací pomocí imunologických a fyzikálně-chemických separací. První část je zaměřena na popis mononukleárních buněk. Další část je věnována separačním metodám a podrobnému popisu izolace. Poslední část práce je věnována buněčné kultivaci a kryoperezervaci.

KLÍČOVÁ SLOVA

mononukleární buňky, izolace, Percoll, Ficoll, kultivace

TITLE

Isolation of peripheral blood cells

ANNOTATION

In my Bachelor Thesis “Isolation of peripheral blood cells” I write about mononuclear cells and their isolation using immunological and physico-chemical methods. The first part is focused on description of mononuclear cells. In the second part I write about separation methods and detail description of isolation. The last part is dedicated to cultivation of cells and their cryopreservation.

KEYWORDS

mononuclear cells, isolation, Percoll, Ficoll, cultivation

OBSAH

| | |
|---|----|
| ÚVOD..... | 12 |
| 1 MONONUKLEÁRNÍ BUŇKY | 13 |
| 1.1 Lymfocyty | 13 |
| 1.1.1 T–lymfocyty..... | 13 |
| 1.1.1.1 Cytotoxické T–lymfocyty..... | 13 |
| 1.1.1.2 Pomocné T–lymfocyty | 14 |
| 1.1.2 B–lymfocyty | 15 |
| 1.1.2.1 Imunoglobuliny | 15 |
| 1.1.3 Přirození zabíječi | 16 |
| 1.1.4 Dendritické buňky..... | 17 |
| 1.1.5 Monocyty | 18 |
| 2 SEPARAČNÍ METODY | 19 |
| 2.1 Hustotní gradientová separace | 19 |
| 2.1.1 Gradientová média | 20 |
| 2.1.1.1 Percoll..... | 21 |
| 2.1.1.2 Ficoll-Paque PLUS | 22 |
| 2.2 Průtoková cytometrie | 23 |
| 2.3 Imunomagnetická separace | 24 |
| 2.3.1 Negativní izolace | 25 |
| 2.3.2 Pozitivní izolace..... | 26 |
| 2.4 <i>Counter-flow</i> centrifugační elutriace..... | 26 |
| 3 IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK | 28 |
| 3.1 Metoda hustotní gradientní separace používající Ficoll Histopaque | 28 |
| 3.2 Izolace monocytů | 28 |
| 3.2.1 Schopnost monocytů přilnout na povrch plastů..... | 28 |
| 3.2.2 Změna osmotického tlaku | 28 |
| 3.2.3 Metoda centrifugace s dvojitým gradientem | 29 |
| 3.2.4 Metoda centrifugace s použitím OptiPrep™ | 29 |
| 3.3 Izolace lymfocytů..... | 30 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.3.1 | Metoda sedimentace erytrocytů | 31 |
| 3.3.2 | Metoda izolace s Isopaque-Ficoll | 31 |
| 3.3.3 | Izolace T-lymfocytů pomocí rozet..... | 31 |
| 3.3.4 | Metoda využívající fagocytózy železa..... | 32 |
| 3.4 | Izolace NK buněk..... | 32 |
| 3.5 | Přečištění PBMC | 32 |
| 4 | KULTIVACE BUNĚČNÝCH KULTUR | 34 |
| 4.1 | Kultivační podmínky..... | 34 |
| 4.1.1 | Kyslík..... | 34 |
| 4.1.2 | Teplota | 35 |
| 4.1.3 | Anorganické soli a pufrující složky | 35 |
| 4.2 | Složení kultivačních médií | 35 |
| 4.2.1 | Sacharidy | 35 |
| 4.2.2 | Aminokyseliny..... | 36 |
| 4.2.3 | Vitaminy | 36 |
| 4.2.4 | Doplňkové organické látky..... | 36 |
| 4.2.5 | Antibiotika | 36 |
| 4.2.6 | Sérum..... | 36 |
| 4.2.7 | Sérová média..... | 37 |
| 5 | KRYOPREZERVACE | 38 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 39 |
| 7 | POUŽITÁ LITERATURA..... | 40 |
| 7.1 | Internetové odkazy | 43 |

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

| | |
|---|----|
| Obr. 1: Funkce cytotoxických T–buněk | 14 |
| Obr. 2: Funkce pomocných T–buněk | 15 |
| Obr. 3: Hlavní receptory exprimované na povrchu NK buněk..... | 17 |
| Obr. 4: Vyjádření receptorů monocytů a makrofágů | 18 |
| Obr. 5: Rozvrstvení krve po hustotní gradientové centrifugaci | 20 |
| Obr. 6: Přehled průtokového cytometru | 24 |
| Obr. 7: Negativní izolace buněk | 25 |
| Obr. 8: Pozitivní izolace buněk..... | 26 |
| Obr. 9: Schéma centrifugační elutriace..... | 27 |
| | |
| Tab. I: Přehled gradientových médií..... | 21 |
| Tab. II: Vhodná sérová média pro kultivaci PBMC buněk | 37 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|------|--------------------------------------|
| APC | antigen prezentující buňka |
| DC | dendritické buňky |
| Ig | imunoglobulin |
| IgM | imunoglobulin M |
| IgD | imunoglobulin D |
| IgA | imunoglobulin A |
| IgE | imunoglobulin E |
| IgG | imunoglobulin G |
| IL | interleukin |
| MHC | hlavní histokompatibilní komplex |
| NK | přirození zabíječi |
| PBMC | mononukleární buňky z periferní krve |
| PBS | fosfátový pufr |
| RPMI | kultivační médium |

ÚVOD

Téma bakalářské práce, která nese název „Izolace buněk z periferní krve“ se zabývá mononukleárními buňkami, které jsou subpopulací funkčních imunitních buněk. Jsou snadno izolovatelné pomocí imunologických a fyzikálně–chemických separací. Jedná se o hustotní gradientovou centrifugaci, imunomagnetickou separaci a centrifugační elutriaci. Provedení izolace záleží na odolnosti a citlivosti na toxiny zkoumaných buněk.

T-lymfocyty a B-lymfocyty zajišťují specifickou imunitu tzv. imunologickou paměť. Přirozené zabíječe, monocyty a dendritické buňky řadíme do nespecifické imunity.

V dnešní době je kladen důraz na výzkum v oblasti imunologie, hematologických malignit, vývoj vakcín, transplantační terapie a toxikologie. Díky rychlému rozvoji dochází k hlubšímu pochopení imunitního systému a následné aplikaci získaných poznatků při léčbě imunitních chorob.

Cílem této práce je shrnout a prezentovat dostupné informace o izolaci buněk z periferní krve.

1 MONONUKLEÁRNÍ BUŇKY

1.1 Lymfocyty

Jedná se o buňky z lymfoidní linie, které mají velké jádro a cytoplasmu obsahující ribozomy, mitochondrie, Golgiho aparát a lysozomy. Lymfocyty se podílí na specifické imunitě organismu, a tím brání lidské tělo proti bakteriálním, virovým a rakovinotvorným onemocněním. Diferencují se na T-lymfocyty, B-lymfocyty a přirozené zabíječe (NK buňky). Lymfocyty vznikají z lymfatických buněk v kostní dřeni. Vyskytují se v krevním řečišti a v lymfatické tkáni. Nesou povrchové receptory, které umožňují buňce reagovat s antigenem (Heath, 1998).

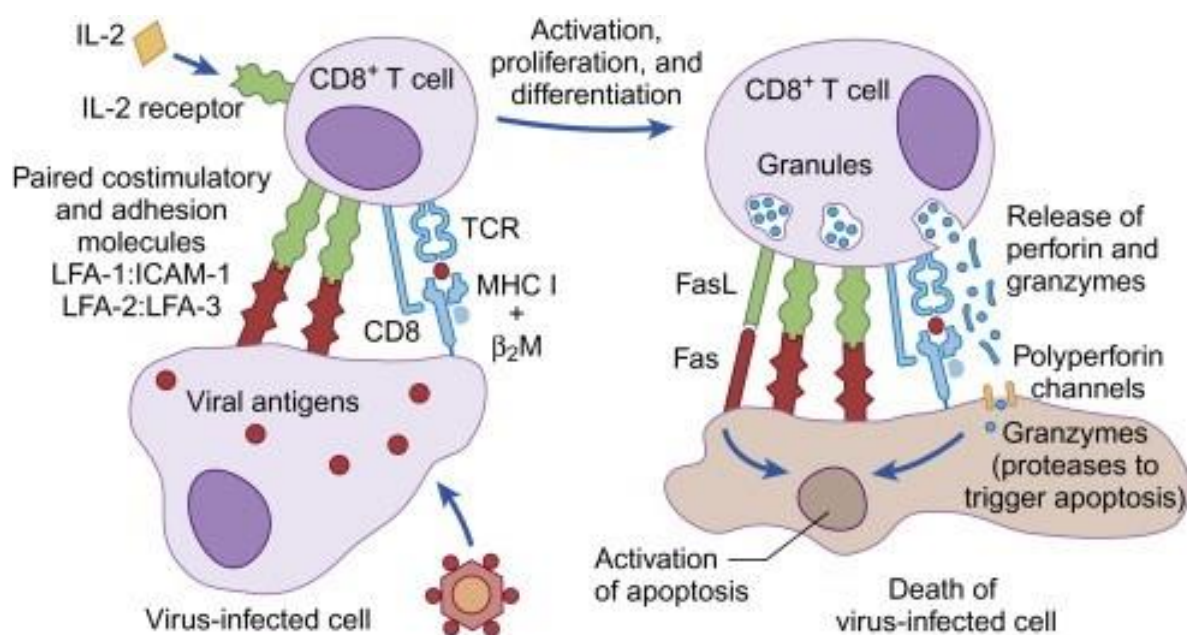
1.1.1 T-lymfocyty

První podtřídou lymfocytů jsou T-lymfocyty, jejichž název byl odvozen od *thymu*, místa jejich maturace. Specializace těchto buněk spočívá v rozpoznávání intracelulárních antigenů, se kterými reagují díky tzv. antigen prezentujícími buňkami (APC). APC antigen zpracovávají a vystavují ho pomocí hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) nacházejícího se na vnější straně své cytoplazmatické membrány (Actor, 2014). Dle role těchto komplexů je dělíme do dvou skupin MHC I. třídy a MHC II. třídy (Stuve et Vernino, 2016).

Každý T-lymfocyt nese specifický receptor pro antigen, který se označuje jako T-buněčný receptor. Je schopen rozpoznat komplexy MHC. Tvoří ho dva polypeptidové řetězce $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$ a komplex několika proteinů potřebných pro přenos signálu z receptoru do buňky. Na každém T-lymfocytu se nachází membránové koreceptory CD4 nebo CD8, díky kterým rozeznáváme dvě od sebe lišící se skupiny (Scheinecker, 2009).

1.1.1.1 Cytotoxické T-lymfocyty

Cytotoxické T-lymfocyty jsou efektorové buňky, které charakterizuje koreceptor CD8 a jsou označovány jako CD8⁺ T-lymfocyty. Tyto buňky rozpoznávají antigen prezentovaný na molekulách MHC I. třídy. Po vystavení antigenu se CD8⁺ aktivuje a spustí apoptózu cílové buňky. Ničení cílových buněk spočívá v uvolňování cytotoxických granulí v místě kontaktu buněk. Obsahem těchto granulí jsou proteázy, granzymy a protein perforin, který je schopen poškodit membránu napadené buňky a způsobit její následnou smrt (Nutt et Huntington, 2019). Funkce cytotoxických T-lymfocytů je znázorněna v následujícím obrázku č. 1.

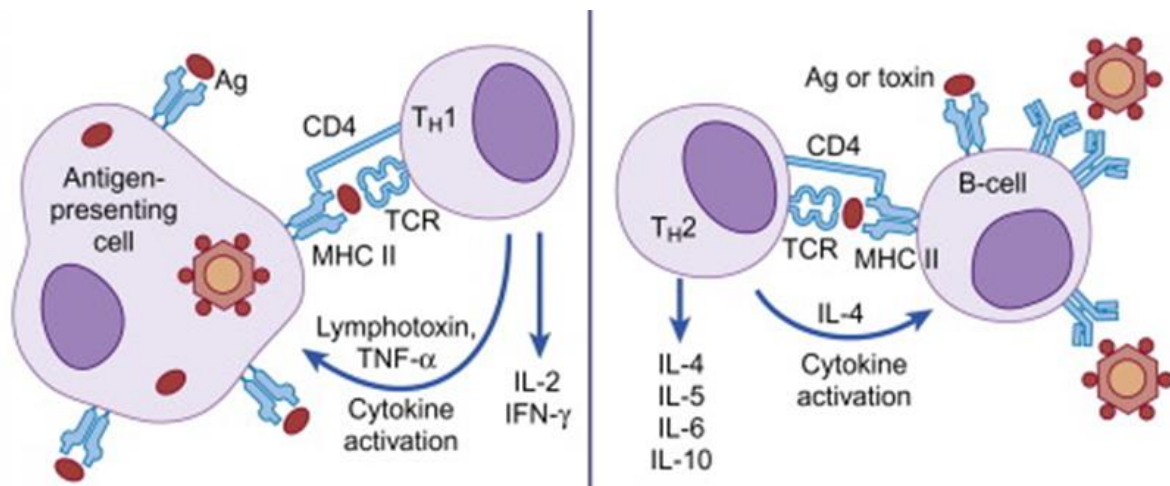


Obr. 1: Funkce cytotoxických T-buněk. V levé části obrázku $CD8^+$ buňka rozpozná buňku virovou, která na svém povrchu exprimuje cizí antigeny s molekulami MHC I. třídy. Dochází k aktivaci, proliferaci a diferenciaci cytotoxické buňky. V pravé části obrázku $CD8^+$ buňka uvolňuje granzymy a protein perforin. Skrz membránu se uvolněné látky dostávají do virové buňky a způsobují její apoptózu, (IL-2 – interleukin, LFA-1, LFA-2, LFA-3 – adhezivní molekuly leukocytů, ICAM-1 – mezibuněčná adhezivní molekula, β_2M – β_2 mikroglobulin, Fas, FasL – Fas ligand) (Actor, 2014).

1.1.1.2 Pomocné T-lymfocyty

Pomocné T-lymfocyty vykonávají regulační funkce, jejich prekurzory nesou koreceptory CD4. Proto mohou být označovány jako $CD4^+$ T-lymfocyty. Rozpoznají antigen prezentovaný ve vazbě na MHC II. třídy. Jejich funkce spočívá v aktivování B-lymfocytů a cytotoxických T-lymfocytů.

Po setkání s antigenem se diferencují do dvou podtypů Th1 a Th2, které se liší produkcí různých cytokinů (interleukinů). Lymfocyty Th1 produkují interleukin 2 (IL-2) a IFN- γ (interferon gama) a jejich funkcí je aktivace makrofágů. Lymfocyty Th2 produkují interleukiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 a uplatňují se při stimulaci B-lymfocytů k produkci protilátek (Alberts a kol., 2002). Funkce pomocných T-lymfocytů je znázorněna v následujícím obrázku č. 2.



Obr. 2: Funkce pomocných T-buněk. V levé části obrázku je Th po setkání s antigenem prezentovaným APC diferencovaný na Th1. Th1 buňky aktivují makrofágy pomocí cytokinů. V pravé části obrázku Th2 buňky řídí diferenciaci B–buněk, (Ag – antigen, TNF- α – faktor nekrotizující nádory) (Actor, 2014).

1.1.2 B–lymfocyty

Druhou podtřídou lymfocytů jsou B-lymfocyty, které dozrávají v kostní dřeni. Po opuštění kostní dřene putují k lymfoidním orgánům.

Jejich stimulace probíhá po rozeznání antigenu povrchovým antigeně specifickým B-buněčným receptorem (Mason, 1998). Tento receptor je tvořen komplexem proteinů. Prvním proteinem je imunoglobulin (Ig) a další dva proteiny jsou nekovalentně navázány a označují se jako $Ig\alpha$ a $Ig\beta$. Tato proteinová oblast se u imunoglobulinů liší, což umožňuje každé protilátce vázat se na jakoukoli cizí strukturu. BCR vázaný na membránu rozpoznává a váže antigen a přenáší aktivační signály do buňky (Kubo et al., 2017).

Mnoho B buněk se diferencuje na plazmatické buňky, které sekretují velká množství protilátek. Některé B buňky se po setkání s antigenem mění v paměťové buňky, které jsou součástí imunitní paměti (Mason, 1998).

1.1.2.1 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny jsou glykosylované molekuly proteinu přítomné na povrchu B buněk sloužících jako receptory antigenu, nebo jsou vylučovány do extracelulárního prostoru, kde mohou vázat a neutralizovat své cílové antigeny. Rozlišujeme pět tříd protilátek (IgM, IgD, IgG, IgA a IgE) (Hoffman et al., 2015).

Jedna molekula protilátky je složena ze dvou těžkých (H) a dvou lehkých (L) řetězců typu κ nebo λ , vzájemně spojených disulfidickými vazbami. Mezi L a H řetězcem nacházíme vždy

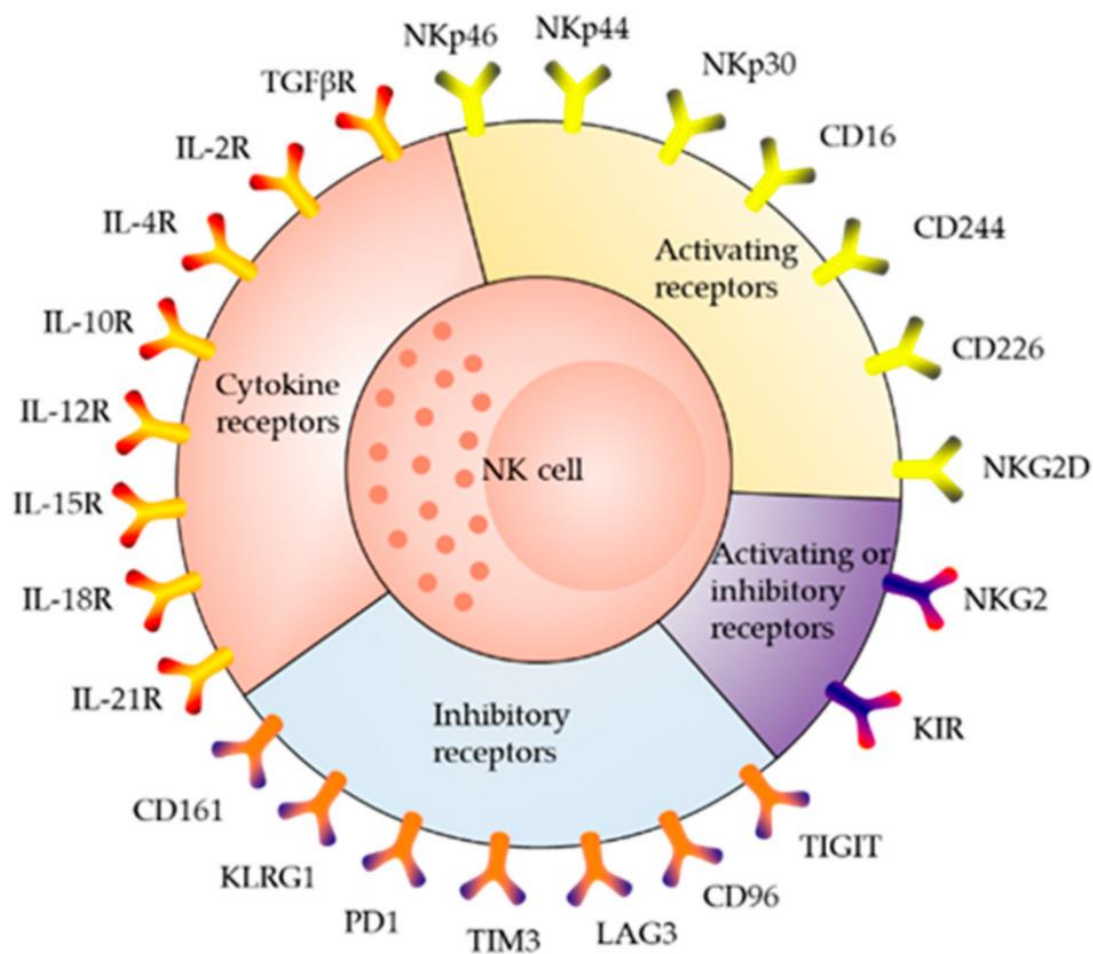
jednu vazbu, mezi H a H řetězcem je různý počet vazeb. Lehké a těžké řetězce se od sebe liší počtem aminokyselin a molekulovou hmotností. Lehké řetězce sestávají z jedné variabilní domény a z jedné nebo více konstantních domén. Těžké řetězce mají jednu variabilní doménu a tři či čtyři konstantní. Vazebné místo pro antigen se nachází na N-koncové oblasti těžkých a lehkých řetězců (*Schroeder et Cavacini, 2010*).

1.1.3 Přirození zabíječi

Přirození zabíječi představují relativně malou populaci buněk vrozeného imunitního systému, které rozpoznávají a přímo ničí virově infikované nebo transformované buňky.

Vyvíjejí se především v kostní dřeni, mohou se však také vyvíjet v lymfatických uzlinách a játrech (*Lotze et Thomson, 2010*). Na svém povrchu neexprimují antigen-specifické rozpoznávající receptory. Vyjadřují dva druhy receptorů, které mají opačnou funkci. První typ receptoru zprostředkovává vazbu na odpovídající ligand na povrchu cílové buňky, čímž aktivuje své efektorové účinky. Tento receptor se nazývá aktivační. Druhý typ receptoru, tzv. inhibiční receptor, inhibuje účinek NK buněk. Oba dva druhy receptorů mohou rozpoznávat molekuly MHC I. třídy (*Zhang et Zheng, 2019*). Přehled hlavních receptorů je znázorněn na obrázku č. 3.

Mechanismus působení NK buněk je cytotoxický, jejich aktivita je zprostředkována působením biologicky aktivních látek, nacházejících se v granulích. Jakmile je cílová buňka rozpoznána NK buňkou, její membránu naruší protein perforin, dojde k vylučování proteáz granzymů, které následně indukují apoptózu buňky. Aktivované buňky produkují řadu cytokinů, například INF- γ , GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů), TNF- β (faktor nádorové nekrózy β) a chemokinů, které vedou k aktivaci buněk podílejících se na imunitní reakci. Touto cestou jsou schopny regulovat vrozenou i získanou imunitní odpověď (*Lotze et Thomson, 2010*).



Obr. 3: Hlavní receptory exprimované na povrchu NK buněk. Receptory jsou rozdělené podle druhu na aktivační receptory, inhibiční receptory, cytokinové receptory, aktivační nebo inhibiční receptory (Zhang et Zheng, 2019).

1.1.4 Dendritické buňky

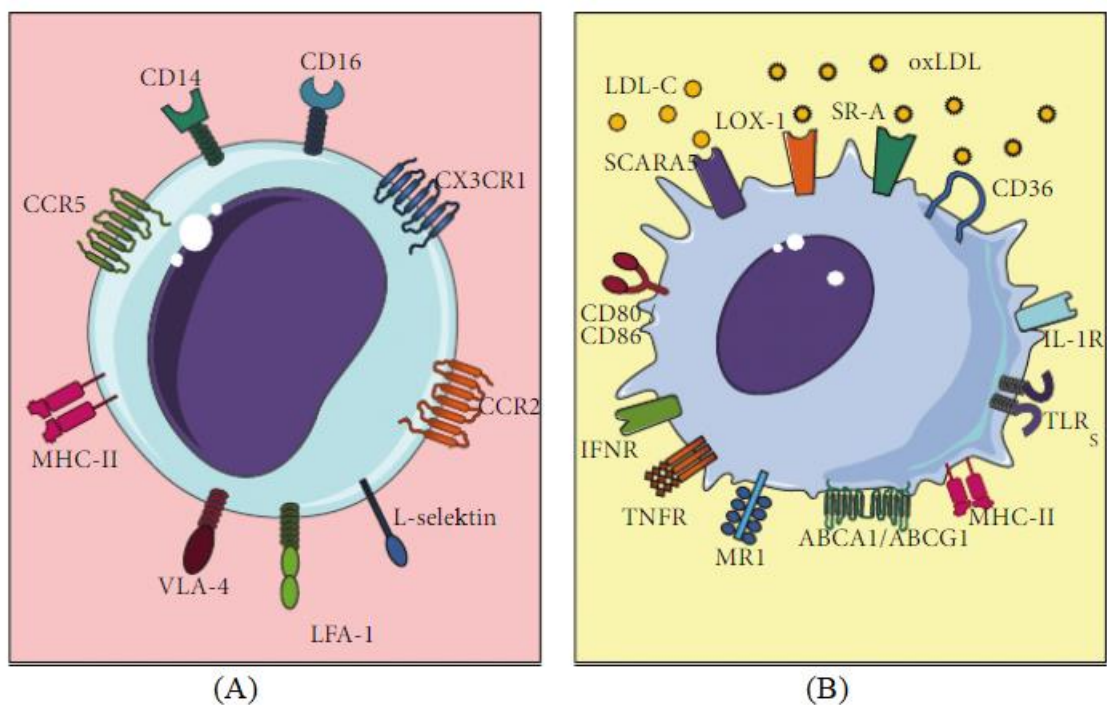
Dendritické buňky (DC) jsou nejúčinnější APC buňky. Vyvíjejí se v kostní dřeni a od ostatních buněk imunitního systému se liší tím, že mohou exprimovat molekuly MHC I. i II. třídy. Nemají povrchové imunoglobuliny ani jiné lymfocytární či monocytární znaky. Nezralé DC sídlí v periferních tkáních. Vyznačují se nízkou expresí MHC molekul, kostimulačních molekul (CD80, CD86) a chemokinových receptorů (CCR7).

Po fagocytóze antigenu se z nezralé DC stává zralá buňka, která antigen zpracuje a prezentuje s MHC molekulami na svém povrchu. Komplex MHC II. třídy a peptidu je rozpoznán CD4⁺ T-lymfocyty, které se tímto aktivují a stimulují imunitní odpověď. Komplexem MHC I. třídy a peptidu dochází ke stimulaci CD8⁺ T-lymfocytů.

Při aktivaci T-lymfocytů jsou nutné dva signály od DC. První signál při rozpoznání antigenu pomocí TCR a druhý signál uskutečněn pomocí kostimulačních molekul CD28 na povrchu T-lymfocytu a CD80/86 na povrchu DC (*Luckashenak et Eisenlohr, 2013*).

1.1.5 Monocyty

Monocyty jsou fagocytující buňky cirkulující v krevním řečišti. Jsou vybaveny chemokinovými receptory a receptory pro rozpoznávání cílových buněk (viz obr. 4), které zprostředkovávají migraci monocytů z krve do tkání během infekce. V tkáních se diferencují na makrofágy (*Geissmann a kol., 2010*). Jejich cytoplasma obsahuje malý počet granulí označených jako primární lysozomy. Tyto granula obsahují látky, jako kyselou fosfatázu, peroxidázu, lysozym, neutrální proteázy, elastázu a kolagenázu, které při pohlcení patogenní buňky zajišťují mikrobicidní a trávicí procesy. Kromě této funkce působí i jako APC, mají schopnost fagocytovat a degradovat antigeny a následně je předkládat T-lymfocytům. Při fagocytóze se opsonizované částice nejprve naváží na specifické receptory na povrchu pomocí ligandů opsoninů. Poté se na povrchu buňky generuje signál, který podporuje proces internalizace (*Furth et Beekhuizen, 1998*).



Obr. 4: Vyjádření receptorů monocytů a makrofágů. A) Klasický monocyty, B) klasický makrofág (*Rojas, 2015*).

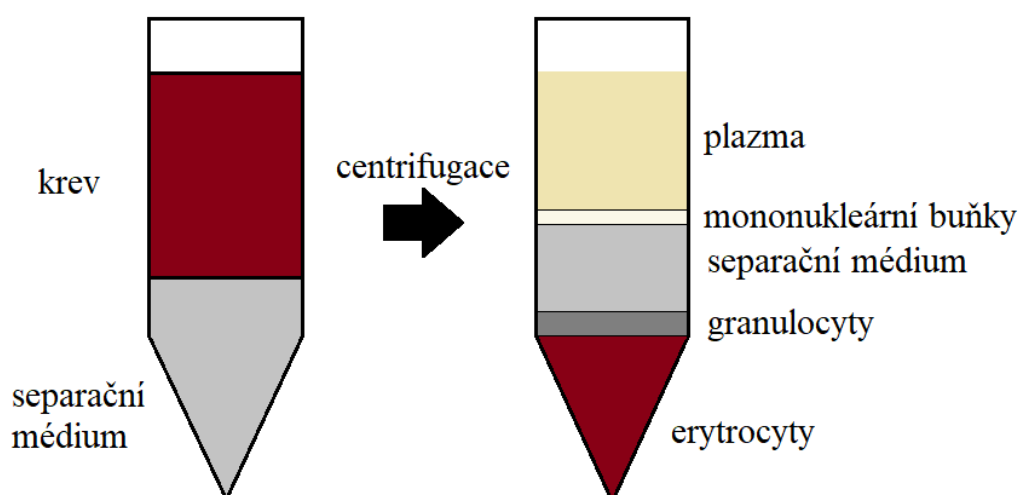
2 SEPARAČNÍ METODY

2.1 Hustotní gradientová separace

Jedná se o nejčastěji používanou separační metodu založenou na hustotním gradientu. Biologický vzorek je centrifugován ve vhodném gradientním médiu při určité rychlosti, až do rozdělení buněčných typů do vrstev nebo fází v závislosti na jejich hustotě (*Sonka et al., 1983*). Podle Stokesova zákona je rychlost sedimentace částic přímo úměrná jejich velikosti a hustotě vzhledem k hustotě suspenze. Částice se po centrifugaci rozvrství od nejspodnější vrstvy erytrocytů a granulocytů (hustota $> 1,077$ g/ml), přes vrstvu gradientního média, vrstvu mononukleárních buněk až po nejvyšší vrstvu zaujímající krevní plazmu (*Low et Abas, 2015*).

Médium použité k oddělení buněk pomocí centrifugace má vertikálně měnící se hustotu, přičemž rozsah hustot leží v oblasti očekávaných hustot dělených částic. Během centrifugačního procesu se tedy každý typ buňky sedimentuje na tu část gradientu, v níž se její hustota shoduje s hustotou média. Je-li hustota střední gradientové fáze a typu buňky stejná, rychlost sedimentace je rovna nule a buňky sedimentují v této fázi namísto dna zkumavky (viz obr. 5).

Existují dva typy gradientů, a to kontinuální a diskontinuální. Kontinuální gradient nejčastěji používá roztok Percoll. Po centrifugaci Percollu se částičky rozdělí podle hustoty, jedná se o plynulou změnu hustoty v celém rozsahu zkumavky. Převrstvením tohoto gradientu buněčnou suspenzí a následnou centrifugací buňky sedimentují a usazují se v oblasti jejich hustoty. Diskontinuální gradient nejčastěji využívá roztok Ficoll. Separace probíhá tak, že se médium převrství buněčnou suspenzí. Po centrifugaci se suspenze rozdělí a vytvoří se pásy o různé hustotě, která roste směrem od horní vrstvy k vrstvě dolní. Přechody mezi pásy mají ostré rozhraní (*Sonka et al., 1983*).



Obr. 5: Rozvrstvení krve po hustotní gradientové centrifugaci (převzato a upraveno dle *Cell Applications, INC.*).

2.1.1 Gradientová média

Separace buněčných populací pomocí hustotní gradientové sedimentace vyžaduje pečlivé zvolení separačních podmínek, aby nedocházelo k nechtěné lýze buněk. Pro separaci se používají komerčně dostupná média, která musí splňovat dané podmínky. Musí být pro buňky zcela netoxická, neměla by ovlivňovat funkci nebo morfologii buněk a po centrifugaci by měla být snadno odstranitelná. Jejich přítomnost by neměla zasahovat do žádných testů, chemických nebo enzymových markerů. Mezi nejpoužívanější média patří Ficoll-Paque, Percoll, OptiPrep, Lymphoprep, HISTOPAQUE-1077, NycoPrep 1.077 (viz tab.1) (*Fisher et al., 1998*).

Tab. I: Přehled gradientových médií (údaje byly převzaty ze stránek Sigma-Aldrich).

| | | | |
|----------------------------------|--|--|---|
| Separáčn médium | Ficoll-Paque | Percoll | OptiPrep |
| Výrobce | GE Healthcare, Piscataway, USA | GE Healthcare, Piscataway, USA | AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway |
| Složení | 5,7% Ficoll™ 400 9,0% diatrizoát sodný | koloidní oxid křemičitý potažený polyvinylpyrrolidonem | 60% iodixanol |
| Separáčn médium | Lymphoprep | HISTOPAQUE-1077 | Nycoprep 1.077 |
| Výrobce | AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway | Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA | AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway |
| Složení | 5,7% polysacharid 9,1% diatrizoátu sodného | polysacharóza diatrizoát sodný | 14,1% nycodenz 0,44% NaCl 5mM Tricin/NaOH |

2.1.1.1 Percoll

Jedná se o koloidní oxid křemičitý. Dodává se jako připravená suspenze částic oxidu křemičitého o průměru 15 nm pokrytých polyvinylpyrrolidonem, o hustotě 1,13 g/ml a osmolalitě 15–20 mOsm. Tato suspenze musí být zředěna zásobním roztokem 1,5 M NaCl, který vyrovnává osmotický tlak. Koloidní povaha Percollu umožňuje vytvářet vlastní generované gradienty v rotoru s pevným úhlem v relativně krátkých časech za použití velkých sil vzniklých pomocí násobku 20 000–30 000 g, v závislosti na iontovosti ředícího roztoku. Vyšší iontová síla zvyšuje rychlost sedimentace částic oxidu křemičitého.

Percoll patří mezi velmi oblíbená média díky jeho širokému využití, i přes jeho nevýhody. Zatímco suspenze je dodávána jako sterilní, ředící roztoky musí být před přidáním do zásobního roztoku Percoll odděleně autoklávovány. Dalším problémem je přilnavost částecek oxidu křemičitého k membránám, které se obtížněji odstraňují i po několika promývání. Vícenásobná promývání mají tendenci poškozovat buňky, což vede k nižšímu výtěžku buněk (*Fisher et al.*, 1998).

2.1.1.2 Ficoll-Paque PLUS

Ficoll-Paque PLUS je vodný roztok o hustotě $1,077 \pm 0,001$ g/ml obsahující 5,7 g Ficoll 400 a 9 g diatrizoátu sodného s 0,0231 g disodnovápenaté soli ethylendiamintetraoctové kyseliny v každých 100 ml. Ficoll 400 je syntetický vysokomolekulární polymer vyrobený polymerací sacharózy s epichlorhydrinem. Je extrémně rozpustný ve vodě. Ficoll 400 se z oddělených buněk nejlépe odstraňuje opakovaným promýváním. Nevýhodou přípravku Ficoll 400 je jeho vysoká cena (*Fisher et al.*, 1998).

V porovnání s lineárními polysacharidy o stejné molekulové hmotnosti má Ficoll 400 nízkou vnitřní hodnotu viskozity a jeho roztoky se vyznačují nízkými hodnotami osmotických tlaků.

Diatrizoát sodný je v kombinaci s Ficollem vhodnou sloučeninou, protože je výhodný z hlediska nízké viskozity s vysokou hustotou. Vzhledem k tomu, že diatrizoát sodný je citlivý na světlo, musí být přípravek Ficoll-Paque PLUS chráněn před světlem. Funkce diatrizoátu sodného je zajistit optimální hustotu a osmolaritu nezbytnou pro účinné odstranění ostatních buněk od lymfocytů.

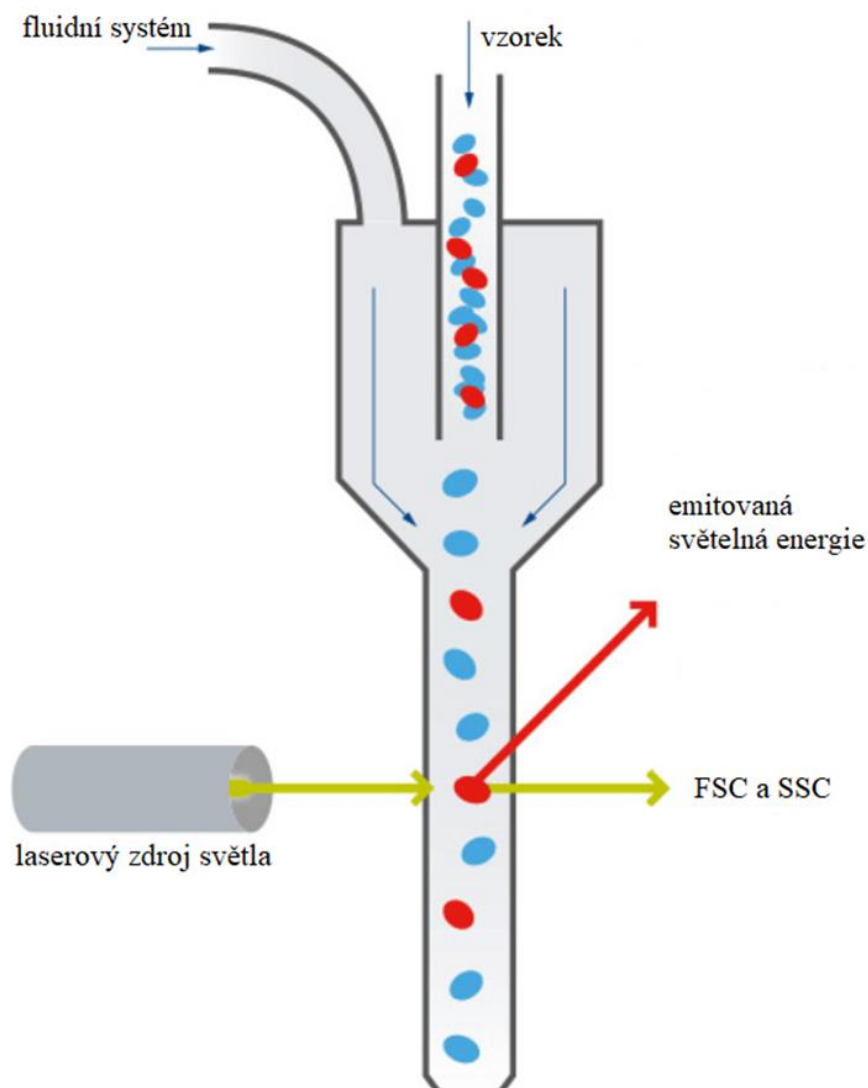
Přípravek Ficoll-Paque PLUS by měl být skladován v rozmezí teplot od 4 °C do 25 °C a chráněn před přímým světlem. Degradace Ficoll-Paque PLUS je indikována změnou barvy z bezbarvého roztoku na výrazně žlutou barvu (*Wittman, 1980*).

2.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je přístrojová metoda, díky které je možné během krátkého časového úseku získat analýzu vlastností jednotlivých buněk ve vzorku, který obsahuje velké množství buněk. Používá se pro imunofenotypizaci různých vzorků, nejčastěji celé krve a kostní dřeň. Vlastnosti, které lze měřit, zahrnují charakterizování a definování různých typů buněk v heterogenní buněčné populaci, stanovení čistoty izolovaných subpopulací, expresi buněčných povrchových a intracelulárních proteinů a velikost či objem buněk. Rozptýlené světlo v různých úhlech poskytuje rozdíly ve velikosti a vnitřní stavby buňky, zatímco paprsek emitovaný z fluorescenčně označených protilátek může identifikovat buněčný povrch a cytoplazmatické antigeny (*Brown et Wittwer, 2000*).

Průtokový cytometr (viz obr. 6) obsahuje fluidní systém, optiku a elektroniku. Fluidní systém zajišťuje fokusaci buněk nosnou tekutinou do průtokové komory. Tekutina vytváří laminární tok, což umožňuje buňky jednotlivě analyzovat laserem. Při průchodu laserového paprsku buňkou dojde k rozptylu světla, který je měřen dvěma detektory. První detektor měří rozptyl po dráze laseru a je označován jako *forward scatter*. Umožňuje rozlišení velikostí buněk, jeho intenzita je úměrná velikosti a členitosti buňky. Druhý detektor měří bočný rozptyl a je označován jako *side scatter*. Poskytuje informace o vnitřním složení buňky. Detektory poté konvertují světelné signály do elektrického signálu, který poté vytváří histogram (*Bakke, 2001*).

Specifické molekuly v buňce mohou být detekovány pomocí označených protilátek fluorescenčními barvivy (fluorochromy), která se mohou specificky vázat s různými buněčnými složkami, jako je například DNA nebo RNA a mnoho dalších struktur. Mezi běžně používaná barviva patří propidium jodid, phycoerythrin a fluorescein. Když označené buňky procházejí světelným zdrojem, dochází k absorpci světla a fluorescenční molekuly jsou excitovány na vyšší energetický stav. Po návratu do svých klidových stavů fluorochromy emitují světelnou energii. Použití více fluorochromů s podobnými excitačními vlnovými délkami umožňuje měřit současně několik vlastností buňky. Vyzařované světlo se shromažďuje přes optiku, která nasměruje světlo na řadu dichronických zrcadel a filtrů, která izolují jednotlivá pásma vlnových délek. Elektronika převádí optické signály na signály elektronické. Dalším zpracováním dojde k jejich digitalizaci pro počítačovou analýzu (*Brown et Wittwer, 2000*).



Obr. 6: Přehled průtokového cytometru (převzato a upraveno z Abcam).

2.3 Imunomagnetická separace

Magnetická separace je metoda založena na principu vazby malých magnetických částic na buňky pomocí specifických protilátek. Buňky, na které je navázána magnetická částice, budou v magnetickém poli přitahovány k magnetu a tím separovány od buněk nenavázaných.

K dispozici je několik produktů magnetických částic, které jsou speciálně určeny pro sortování buněk. Pracují na stejném principu, liší se jen v síle magnetického pole potřebného k oddělení buněk v závislosti na jejich velikosti.

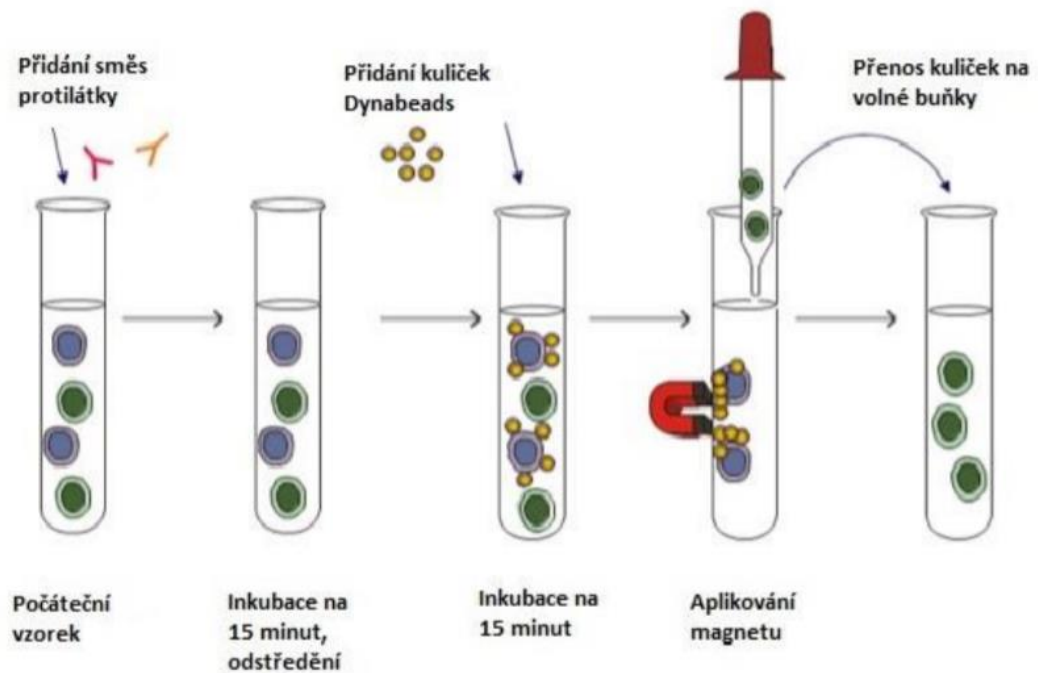
Magnetická separace je vysoce účinná a specifická ve srovnání s centrifugačními či filtračními metodami (Rossi et al., 2014).

Nejběžnější typ magnetických částic ($> 2\mu\text{m}$) jsou kuličky Dynabeads produkované společností Dynal. Jsou navrženy a vyrobeny z nerozložitelného materiálu tak, aby ve vzorku nezůstal

jakýkoli nechtěný materiál nebo aby nepříznivě neovlivňovaly buňky během izolace (Miltenyi et al., 1990).

2.3.1 Negativní izolace

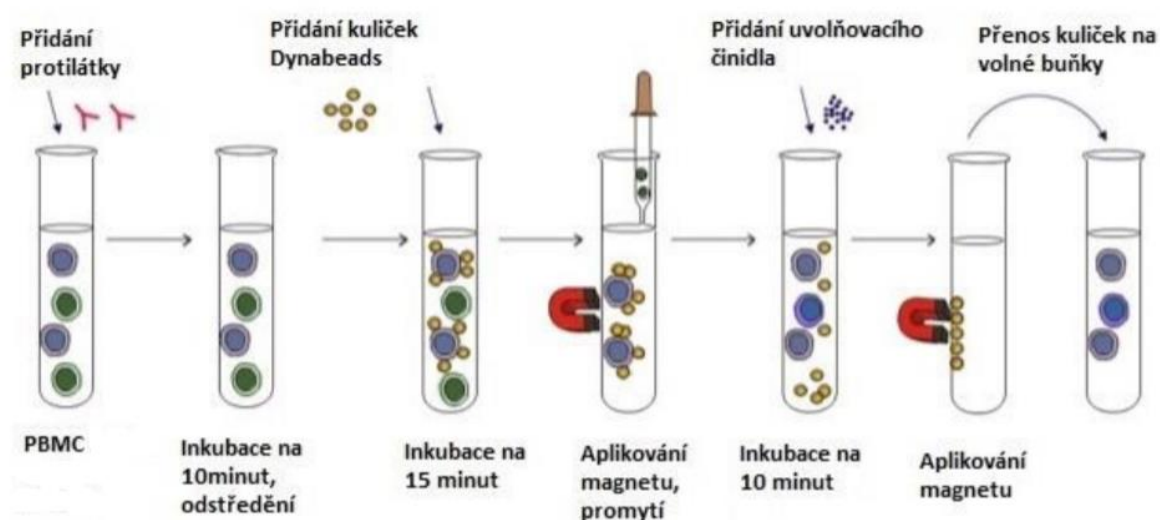
Při negativní izolaci jsou nejprve ze vzorku odstraněny typy buněk, které nejsou předmětem studia. Vzorek se smíchá s protilátkami proti všem nežádoucím buňkám. Po krátké inkubaci se buňky promyjí, aby se odstranily nevázané volné protilátky. Buňky se resuspendují zpět do pufru a smísí se s Dynabeads potaženými sekundární protilátkou, která je specifická vůči primárním protilátkám na všech nežádoucích buňkách. Po krátké inkubaci jsou zbylé buňky zachyceny kuličkami s pomocí magnetu. Supernatant nyní obsahuje nedotčené cílové buňky (Zborowski et Chalmers, 2008). Pracovní postup je shrnut v následujícím obrázku č.7.



Obr. 7: Negativní izolace buněk (převzato a upraveno z Thermo Fisher Scientific).

2.3.2 Pozitivní izolace

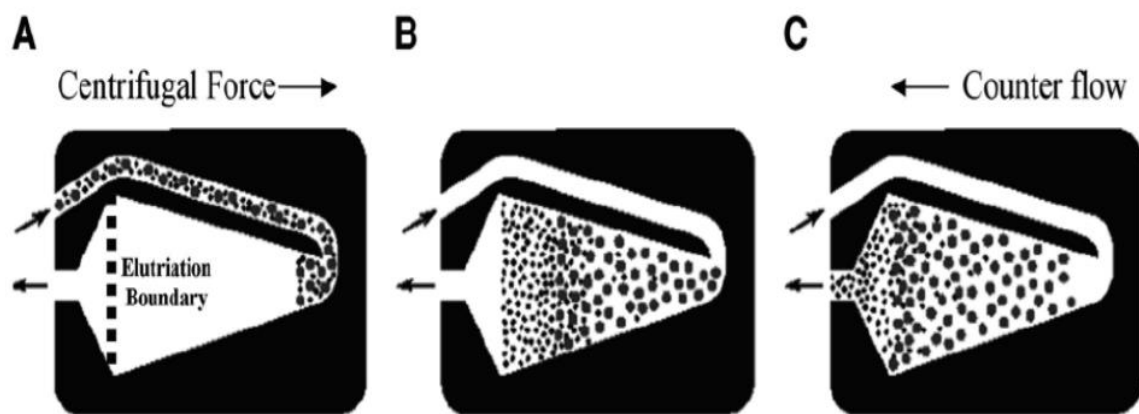
Pozitivní izolace je metoda pro separaci cílové buněčné populace ze vzorku, kdy se magnetické částice Dynabeads potažené specifickou protilátkou se smísí se vzorkem. Částice se naváží na buňky s odpovídajícím povrchovým antigenem. Pomocí Dynal magnetu se izolují od zbytku vzorku. Promýváním se odstraní nenačkané buňky. Navázáním magnetických částic nedochází ke změně životaschopnosti separovaných buněk. Pozitivní metoda je oproti negativní metodě rychlejší, jsou získány vyšší čistoty a vyšší výtěžky buněk (Zborowski *et Chalmers*, 2008). Pracovní postup je shrnut v následujícím obrázku č. 8.



Obr. 8: Pozitivní izolace buněk (převzato a upraveno z Thermo Fisher Scientific).

2.4 Counter-flow centrifugační elutriace

Princip této metody spočívá ve využití rozdílné velikosti monocytů (10–15 μm) a lymfocytů (6–10 μm) při protiproudové centrifugační elutriaci (viz obr. č. 9). Takto různě velké buňky lze od sebe oddělit pomocí tzv. elutriační centrifugy. Elutriační centrifuga pracuje díky speciálně navrženému rotoru, který obsahuje systém trubiček potřebných pro protiproud tekutiny. Tento rotor umožňuje tok média s buňkami proti směru síly centrifugace. V elutriační komoře mají buňky tendenci migrovat do zóny, kde je jejich sedimentační rychlost vyvážená průtokovou rychlostí tekutiny. Zvýšením průtoku elutriační tekutiny nebo snížením rychlosti rotoru lze z komory odizolovat po sobě následující populace s homogenní velikostí buněk. Po zvýšení průtoku kapaliny začne síla odporu proudu převažovat nad silou odstředivou a buňky s menší velikostí jsou unášeny pryč z komory. Naopak větší buňky zůstávají v elutriační komoře (Connon, 2017).



Obr. 9: Schéma centrifugační elutriace. (A) Buňky vstupují do elutriační komory, (B) Centrifugační elutriace vytváří gradient velikostí buněk uvnitř v komoře, (C) Zvýšený protiproud unáší nejmenší buňky pryč z komory (Connon, 2017).

3 IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK

3.1 Metoda hustotní gradientní separace používající Ficoll Histopaque

Vzorek lidské krve o objemu 4 ml v heparinizované zkumavce je opatrným překlápěním promícháván. Do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml je napipetováno 4 ml Ficoll Histopaque. Poté je na médium navrstven daný vzorek. Vrstvení musí být prováděno tak, aby nedošlo ke smíchání krve s médiem. Dále je zkumavka centrifugována při 100 x g po dobu 30 min při 4 °C. Po uplynulé době dojde k rozdělení vzorku do vrstev dle hustoty. Bílý proužek buffy coat byl odpipetován a dvakrát promyt 10 ml PBS (fosfátový pufr) centrifugací při 100 x g po dobu 10 minut. Výtěžek ze 4 ml krve se pohybuje mezi 10^7 – 10^8 buněk (*Panda, 2013*).

3.2 Izolace monocytů

3.2.1 Schopnost monocytů přilnout na povrch plastů

Monocyty a makrofágy jsou schopny vázat se pomocí receptoru CD11c (p 150) na povrch plastů (*Keizer et al., 1987*).

Dají se vyizolovat způsobem, že je vzorek mononukleárních buněk vyset s 10% roztokem přefiltrovaného lidského séra na kultivační misky s rovným dnem. Buňky necháme jednu hodinu inkubovat. Poté jsou misky doplněny kultivačním médiem tak, aby hladina tvořila konvexní meniskus. Následně jsou otočeny dnem vzhůru a nechány dvě hodiny v inkubaci, aby médium s neadherovanými buňkami z misek vyteklo. Získaná čistota monocytů se pohybuje kolem 95 %. Nevýhodou této metody je, že adhezi se monocyty aktivují (*Heinemann et Peters, 2005*).

3.2.2 Změna osmotického tlaku

Vlivem zvýšení osmotického tlaku začnou buňky vylučovat vodu, což vede ke zvýšení jejich hustoty. Lymfocyty jsou na změnu osmotického tlaku citlivější než monocyty, proto je lze následně pomocí centrifugace ze vzorku odstranit. Z tohoto důvodu se provádí izolace v hyperosmotickém separačním médiu (např. 48,5 ml Percollu se smíchá se 41,5 ml vody a 10 ml 1,6 M NaCl). Průměrný výtěžek buněk je přibližně 75 % (*Repnik et al., 2003*).

3.2.3 Metoda centrifugace s dvojitým gradientem

Při centrifugaci s dvojitým gradientem jsou nejprve *buffy coat* buňky přeneseny do dvou zkumavek o objemu 50 ml. Dále jsou naplněny další tři 50 ml zkumavky 15 ml roztokem Ficoll (1,077 g/ml), do kterých je posléze pomocí pipety napipetováno 30–35 ml *buffy coat*. Takto připravené zkumavky jsou odstředěny při 400 x g po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po odstředění je z každé zkumavky odebrán pomocí pipety bílý proužek mononukleárních (PBMC) buněk, které jsou přeneseny do 50 ml zkumavky. Každá zkumavka je napipetována 40 ml roztokem PBS s EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina). Dále byla provedena centrifugace při 300 x g po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Byl odebrán supernatant a buněčný pelet byl znovu promyt 40 ml PBS s EDTA a odstředěn. Pro každý vzorek byly buněčné pelety promyty v 20 ml RPMI-1640 (kultivační médium) + 10% FCS (fetální telecí sérum) bez fenolové červeně. Byl připraven izosmotický roztok Percollu pro druhý hustotní gradient, kdy bylo smíšeno 23,13 ml roztoku Percoll (hustota 1,131 g/ml) v 50 ml zkumavce s 1,87 ml PBS. Poté bylo 23 ml tohoto roztoku přeneseno do nové 50 ml zkumavky a přidáno 27 ml RPMI-1640 s fenolovou červení + 10% FCS, aby byl získán 46% izo-osmotický roztok Percoll. Bylo přeneseno 25 ml připraveného roztoku Percoll do 50 ml zkumavky a napipetována vrstva PBMC na hladinu roztoku Percoll. Odstředíme při 550 x g po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Pro každý gradient byl shromážděn bílý kruh monocytů a přenesen do 50 ml zkumavky. Každá zkumavka byla napipetována PBS s EDTA do 50 ml. Dále byly zkumavky odstředěny při 400 x g po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Suspenze supernatantu a resuspendování pelet bylo provedeno ve 20 ml RPMI–1640 s fenolovou červení + 10% FCS (*Menck et al., 2014*).

3.2.4 Metoda centrifugace s použitím OptiPrep

Metoda vyvinutá Graziani-Boweringem a spol. umožňuje separaci monocytů od lymfocytů na základě jejich rychlosti flotace z plné krve. Vyšší rychlost flotace monocytů je způsobena jejich větší velikostí a nižší hustotou, než mají lymfocyty. Touto metodou jsou získávány vysoce purifikované a životaschopné monocyty. Práce musí být prováděna při teplotě 4 °C. Při pokojové teplotě by bylo dosaženo nízkých výtěžků (*Graham, 2002*).

Během práce je používána látka OptiPrep, 60% iodixanol ve vodě (iodixanol je neiontové iso-osmolární kontrastní médium) (*Mita et al., 2010*). Jako ředící roztok je používáno rutinní kultivační médium (např. RPMI) obsahující 10% sérum.

Nejprve bylo odebráno 10 ml krve, která byla následně napipetována do zkumavky s EDTA (1mM). Dále byly všechny roztoky, krev a zařízení přivedeny na teplotu 4 °C. Poté byl připraven 40% (w/v) pracovní roztok jodixanolu smícháním OptiPrep s ředidlem v poměru 4:2. Hustota roztoku byla přibližně 1,217 g/ml. Zředěním jodixanolu s ředícím roztokem byl připraven roztok o hustotě buď 1,072 g/ml (2,14 ml + 5 ml) nebo 1,074 g/ml (2,27 ml + 5 ml). Volba hustoty závisí do určité míry na požadavcích provozovatele. Použití roztoku s nižší hustotou poskytne monocytový preparát, který je přibližně z 90 % čistý, ale výtěžky jsou přibližně 40 %. Roztok s vyšší hustotou poskytne výtěžek přibližně 60 %, ale čistotu přibližně 85 %. Dále bylo smícháno 4,24 ml jodixanolu s 10 ml celé krve. V odstředivkové zkumavce byla na 5 ml krve nanášena vrstva 5 ml roztoku o hustotě 1,072 g/ml a poté přidána vrstva ředícího roztoku o objemu přibližně 0,5 ml. Byla provedena centrifugace v rotoru s kyvadlovou lopatkou při 700 x g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C bez přerušení. Poté byla odpipetována vrstva monocytů, která se nacházela na vrchu vrstvy roztoku s hustotou 1,072 g/ml. Buňky byly zředěny 2 díly ředidla, znovu centrifugovány a vyniklý sediment byl resuspendován v libovolném médiu podle potřeby (*Graham, 2002*).

3.3 Izolace lymfocytů

Při separaci lymfocytů ze vzorku PBMC buněk jsou nejčastěji používány metody založené na principu odstranění monocytů a makrofágů z daného vzorku. Často využívána metoda je adheze monocytů a makrofágů k plastům. Daný vzorek je 1 hodinu inkubován při 37 °C v plastové *Petriho* misce. Buňky, které během inkubace neadherují k povrchu misky, jsou poté pomocí pipety přeneseny do čisté nádoby. Získaná suspenze obsahuje zejména cílové buňky.

Dále se hojně využívána metoda je založena na využívání pozitivní imunomagnetická separace monocytů. Daný vzorek se nejprve nechá centrifugovat. Buněčný pelet je rozmíchán v ekvivalentním objemu kultivačního média, např. RPMI-1640 s 5 % fetálním telecím sérem a s 0,6% citrátem sodným. Poté jsou do vzorku vloženy magnetické částice. Takto připravená zkumavka se nechá inkubovat 7 minut při teplotě 2–8 °C v míchačce. Po inkubaci je vzorek vložen do magnetického pole. Promýváním je získán supernatant s vysokou koncentrací cílových buněk (*Siegel et Klohe, 2000*).

3.3.1 Metoda sedimentace erytrocytů

Nefraktované lymfocyty se získávají tím způsobem, že antikoagulovanou krev necháme sedimentovat ve zkumavce při pokojové teplotě. Po uplynutí 1 až 2 hodin se erytrocyty usadí vlivem gravitace na dně zkumavky. Nad nimi se vytvoří vrstva lymfocytů, které mohou být odpipetovány. Sedimentaci můžeme urychlit přidáním činidla agregující erytrocyty. Dextran nebo methylcelulóza rozpuštěné v 0,9% NaCl se používají v podílech 10 dílů krve + 1 díl 6% dextransu a 10 dílů krve + 0,5 dílů methylcelulózy 2%. Po přidání činidla trvá sedimentace přibližně 15 až 40 minut v závislosti na výšce kolony krevních buněk.

Podobná buněčná suspenze se může získat centrifugací krve 6 až 7 minut při 500 x g. Po centrifugaci se leukocyty nacházejí ve formě bílé vrstvy v horní části pelety erytrocytů. Během obou způsobů se v peletách erytrocytů ztrácí 30 % až 40 % leukocytů. Ztráta může být minimalizována resuspendováním erytrocytů a opakováním postupu (*Boyum, 1977*).

3.3.2 Metoda izolace s Isopaque-Ficoll

Metodu Isopaque-Ficoll má dva způsoby použití. Prvním je izolace mononukleárních buněk centrifugací při 20 °C po dobu 20 minut při 700 x g. Směs 1 dílu krve a 1 dílu 0,9% NaCl se navrství na vrchol 3 ml separačního média Isopaque-Ficoll. Po centrifugaci se na separační tekutině nacházejí mononukleární buňky a trombocyty. Erytrocyty a granulocyty vytvoří sediment na dně zkumavky. Mononukleární buňky jsou složeny přibližně z 85 % lymfocytů a 15 % monocytů. Kontaminace erytrocyty a granulocyty je zanedbatelná. Lymfocyty mohou být také izolovány flotací na roztoku Ficoll bez Isopaque. Výtěžek buněk je však nižší a kontaminace erytrocyty vyšší (*Boyum, 1977*).

3.3.3 Izolace T-lymfocytů pomocí rozet

T-lymfocyty exprimují na cytoplazmatické membráně adhezivní molekulu CD2, která se váže na glykoprotein na ovčích erytrocytech. T-lymfocyty tak vytváří s erytrocyty rozety. Pro získání lymfocytů se periferní krev s ovčími erytrocyty kultivuje spolu s neuraminidázou. Neuraminidáza rozdělí krevní elementy na rozetující populaci (T-lymfocyty) a na populaci nerozetující (ostatní buňky). Tyto populace jsou od sebe poté odděleny pomocí gradientové centrifugace.

Při separaci buněk pomocí rozet dochází často k jejich aktivaci, což může ovlivnit výsledky následných testů. Metoda se v dnešní době využívá jen zřídka (*Bartůňková a kol., 2011*).

3.3.4 Metoda využívající fagocytózy železa

Čistou lymfocytovou suspenzí lze získat použitím schopnosti granulocytů a monocytů pohltit malé částice železa. Po inkubaci celé krve nebo suspenze leukocytů s částicemi železa mohou být buňky obsahující železo odstraněny magnetem. Erytrocyty sedimentují na dně zkumavky díky své vyšší hustotě. Metoda poskytuje výtěžek lymfocytové suspenze o čistotě 96 %. Výtěžek se pohybuje okolo 40 % do 91 %. Erytrocyty lze odstranit hypotonickou lýzou nebo přidáním hemolytického činidla. Lýza však může narušit funkční vlastnosti lymfocytů (*Boyum, 1977*).

3.4 Izolace NK buněk

Nejprve periferní krev shromáždíme do zkumavky s antikoagulační látkou. Dále krev zředíme stejným objemem PBS. Poté dvě třetiny zředěné krve nanese pipetou na jednu třetinu Ficoll. Při pokojové teplotě odstředíme 30 minut při 800 x g bez přerušení. Po centrifugaci odebereme pomocí pipety lymfocytární vrstvu a přeneseme ji do nové zkumavky. Buňky zředíme PBS, abychom snížili hustotu roztoku. Poté takto zředěný roztok odstředíme při 800 g po dobu 10 minut, aby došlo k peletaci lymfocytů na dně zkumavky, supernatant odpipetujeme. Buněčnou peletu dvakrát promyjeme v PBS, resuspendujeme ve 40 µl pufru a přidáme 10 µl koktejlu s biotinovou protilátkou. Necháme směs 10 minut inkubovat při 4 °C. Po inkubaci buňky desetkrát puftrem promyjeme a poté centrifugujeme při 300 g po dobu 10 minut. Odpipetujeme supernatant a přidáme 80 µl pufru a 20 µl *anti-biotin MicroBeads*. Naposledy inkubujeme po dobu 15 minut při teplotě 4 °C, promyjeme puftrem a resuspendujeme v 500 µl pufru. Nakonec provedeme magnetickou separaci (*Ferlazzo, 2008*).

3.5 Přečištění PBMC

Při odběru PBMC buněk po centrifugaci je nutné odebrat celé rozhraní buněčné populace a zároveň odebrat co nejméně separačního média a plazmy. Když je odebrána pouze část vrstvy PBMC, sníží se tím výtěžek buněk. Když jsou odebrány cílové buňky i se separačním médiem, dojde ke kontaminaci granulocytů. Odebrání plazmy vede ke zvýšené kontaminaci krevními destičkami a plazmatickými bílkovinami. Proto je důležité frakci PBMC resuspendovat a zbavit ji od nechtěných složek ve vybraném přečišťovacím médiu. Purifikace se provádí při centrifugaci za různých odstředivých sil. Pro redukci kontaminace trombocytů je nutná centrifugace za nízkých otáček. Pokud je však obtížné trombocyty odstranit, nebo je nutné snížit kontaminaci trombocyty na minimum, je možno po získání PBMC na médium Ficoll-

Paque PLUS navrstvit sacharózový hustotní gradient a centrifugovat. Destičky zůstanou na hladině zkumavky, lymfocyty zůstanou na hladině separačního média. Při volbě přečišťovacího média je možné využít kultivační médium, ve kterém se později získané buňky nechají kultivovat, nebo některý z dostupných roztoků solí jako PBS nebo HBSS (Hanksův vyvážený fyziologický roztok) (*Perper et al., 1968*).

4 KULTIVACE BUNĚČNÝCH KULTUR

Ve výzkumu jsou buněčné kultury hojně využívané a slouží jako zdroj materiálu pro experimenty. Ve srovnání s jinými typy biologických materiálů, např. v porovnání s použitím izolovaného orgánu či tkáně, mají buněčné kultury značné výhody. Pokus probíhá na jediném, dobře charakterizovaném buněčném typu a jeho výsledky nejsou ovlivněny interakcí s jinými buněčnými populacemi. Buněčné linie lze snadno kultivovat a v krátké době je možné získat velké množství homogenního materiálu.

Na druhou stranu je však nutné počítat i s omezeními. Kultivované buňky rostou za nefyziologických podmínek, pěstují se v umělém kultivačním médiu, jehož složení je sice co nejvíce přizpůsobeno přirozenému prostředí buněk, ale nikdy nedosáhne přesného složení vnitřního prostředí organismu. Při experimentech s kultivovanými buňkami je nutné mít na paměti, že se jedná o model *in vitro*, který nemusí dobře odrážet poměry za podmínek *in vivo*.

První kulturu izolovaných buněk označujeme jako primární kulturu. Poté, co se buňky namnoží, se naředí a přenesou do nových kultivačních nádob a tím vzniká sekundární kultura. Buňky v sekundární kultuře se pěstují tak dlouho, dokud není získáno dostatečné množství pro experiment (*Freshney, 2000*).

4.1 Kultivační podmínky

Pro pěstování buněk *in vitro* je třeba zajistit vhodné kultivační podmínky, mezi které patří složení kultivačního média, teplota či tlak. Buňky krevního původu je nutné pěstovat v suspenzi. V suspenzi se buňky udrží díky neustálému promíchávání kultury na kývací míchačce. Jinou možností je potažení povrchu kultivační nádoby látkou, např. agarosou, která zabrání adhezi buněk na povrch nádoby (*Davis, 2002*).

4.1.1 Kyslík

Většina buněk díky špatné dostupnosti kyslíku přechází v podmínkách *in vitro* na anaerobní způsob odbourávání živin. Kvůli absenci transportních molekul se kyslík stává pro buňky toxický. V nenávané formě indikuje tvorbu volných radikálů, které narušují buněčné struktury. Vznik volných radikálů lze do určité míry eliminovat přidáním antioxidantů do kultivačního média. Koncentrace kyslíku nutná pro respirační pochody představuje 5–12 % (w/v) kyslíku v atmosféře. Pokud je v kultivačním médiu přítomno sérum, není nutné tlak

kyslíku regulovat, protože součástí séra jsou i antioxidační látky nebo jejich prekurzory (*Martin et Vermette, 2005*).

4.1.2 Teplota

Optimální teplota pro pěstování krevních buněk je přibližně 37 °C. Mírné snížení teploty vede ke zpomalení buněk, kdežto zvýšená teplota pro ně může být díky denaturaci proteinů a enzymů letální. Sníženou teplotu lze zároveň využít i pro krátkodobé nebo dlouhodobé uchování buněk.

Krátkodobé uchovávání buněk se používá například při transportech krevních vzorků. Dlouhodobé uchovávání buněk se provádí snížením teploty až na - 156 °C až - 196 °C. V této formě mohou být skladovány téměř neomezeně dlouho (*Martin et Vermette, 2005*).

4.1.3 Anorganické soli a pufrující složky

Směs vhodných anorganických solí zajišťuje hlavní ionty nezbytné pro fyziologické funkce kultivovaných buněk. Anorganické soli se podílejí na udržení osmotického tlaku média. Význam při udržování stálého pH média mají zejména uhličitany a fosfáty. Používá se několik osvědčených směsí anorganických solí, které můžeme rozdělit do skupin podle toho, jestli se hodí pro práci v normální atmosféře nebo pro kultivaci v inkubátoru s vyšší koncentrací CO₂. Směs solí, která tvoří základ médií pro kultivaci v atmosféře s 5 % CO₂, obsahuje Earlvův vyvážený roztok solí nebo Dulbecův roztok solí pufovaný fosfáty. Pro práci v normální atmosféře se používají média založená na Hankově vyváženém roztoku solí. Kromě anorganických pufrů se do médií přidávají i vybrané organické pufrы (*Davis, 2002*).

4.2 Složení kultivačních médií

4.2.1 Sacharidy

Hlavním zdrojem energie kultivovaných buněk *in vitro* jsou sacharidy. Nejčastěji se do médií přidává glukóza a galaktóza, nicméně některá média obsahují maltózu nebo fruktózu. Při odbourávání sacharidů se v kultivačním médiu obvykle hromadí kyselina mléčná, což je způsobeno omezením funkce Krebsova cyklu (*Freshney, 2000*).

4.2.2 Aminokyseliny

Pro normální proliferaci buněk je nutný přísun esenciálních aminokyselin, které si buňky nedokáží samy syntetizovat. Koncentrace aminokyselin v médiu určuje maximální hustotu buněk, kterou lze dosáhnout. Jakmile dojde k vyčerpání esenciálních aminokyselin, buňky přestanou mít schopnost proliferace. Přidané neesenciální aminokyseliny do média stimuluji proliferaci a prodlužují životaschopnost buněk v kultuře (*Dexler et Uphoff, 2000*).

4.2.3 Vitaminy

Přítomnost a koncentrace jednotlivých vitaminů v kultivačních médiích závisí na požadavcích pěstovaných buněk a na přítomnosti séra. Média obvykle nepostrádají D-biotin a deriváty thiaminu (vit. B1), riboflavinu (vit. B2), kys. panthotenové (vit. B5), pyridoxinu (vit. B6), folátové kys. (vit. B9) a vitaminu B12 (*Freshney, 2000*).

4.2.4 Doplnkové organické látky

Do médií s nízkou nebo žádnou koncentrací séra je potřeba přidat látky, jako jsou lipidy, růstové faktory, proteiny, nukleosidy a peptidy (*Freshney, 2000*).

4.2.5 Antibiotika

Do médií se antibiotika přidávají, aby se zabránilo kontaminaci kultury bakteriemi. Měla by se však používat jen v ojedinělých případech, při nichž hrozí vysoké riziko kontaminace kultury bakteriemi z vnějšího prostředí, např. při rozmrazování uskladněných buněk. Antibiotika mají velký vliv na proliferaci kultivovaných buněk a na jejich chování. Nejčastěji se do médií přidává penicilin a streptomycin. Penicilin je málo toxický a rychle se v kultivačním médiu rozkládá. Streptomycin patří mezi alergenní látky a oproti penicilinu představuje pro buňky vyšší míru toxicity (*Drexler et Uphoff, 2000*).

4.2.6 Sérum

Sérum je jednou z nejdůležitějších složek buněčného média. Jedná se o komplexní směs albuminů, minerálů, lipidů, hormonů, růstových faktorů a růstových inhibitorů. Je také zdrojem stopových prvků jako jsou zinek, selen, měď, mangan, vitamíny a další. Nejběžněji používané sérum je fetální bovinní sérum (FBS), které obsahuje velké množství růstových faktorů. Sérum

nejen podporuje růst buněk, ale chrání je i před mechanickým poškozením a je schopno neutralizovat toxiny (Davis, 2002).

4.2.7 Sérová média

V následující tabulce jsou zmíněna vhodná média pro kultivaci PBMC buněk. Nejčastěji využívaným sérovým médiem laboratořemi je médium vyvinuté v Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640). Jedná se o univerzální médium a lze ho aplikovat pro širokou škálu buněk.

Tab. II: Vhodná sérová média pro kultivaci PBMC buněk (převzato ze stránek Biosera).

| Název sérového média | Použití |
|--|--|
| RPMI 1640 | Vhodné pro kultivaci leukocytů, lidského myelomu, myšního hybridomu. |
| McCoy's | Vhodné pro podporu a růst lymfocytů, karcinomových buněk. |
| Ham's | Vhodné pro kultivaci leukocytů. Je skvělým klonovacím médiem pro kulturu myelomu a hybridních buněk. |
| Iscove's modified dulbecco's medium (IMDM) | Vhodné pro podporu a růst lymfocytů. |

5 KRYOPREZERVACE

Kultivované buňky je možné zmrazit a uschovat. Cílem kryoprezervace je umožnit skladování zásob buněk. Výhodami kryoprezervace je snížené riziko mikrobiální kontaminace, snížené riziko křížové kontaminace s jinými buněčnými liniemi, snížené riziko morfologických změn a snížené náklady za spotřební materiály.

Před samotnou kryoprezervací musí životaschopnost kultury převyšovat 90 %. Nesmí na ní být patrné žádné známky mikrobiální kontaminace. Buňky se musí nacházet v log fázi růstu (kultura nacházející se pod svojí maximální buněčnou hustotou). Důležité je použití kryoprotektivního činidla dimethylsulfoxidu nebo glycerolu. Hrozcím nebezpečím při kryoprezervaci buněk je vznik krystalků ledu, které mohou buňku mechanicky poškodit, způsobit její dehydrataci a tím přivodit změny koncentrace elektrolytů a intracelulárního pH. Právě z těchto důvodů jsou kryoprotektivní činidla používána.

Řízeně zmrazené buněčné kultury mohou být kryoprezervovány po dobu neurčitou při teplotě nižší než $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$. Těchto nízkých hodnot dosahují speciální elektrické mrazničky, nebo je možné umístit kultury do plynného nebo kapalného dusíku (*Cheng et al., 2001*).

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo seznámit se a informovat o izolaci mononukleárních buněk z periferní krve. Zaměřila jsem se na T-lymfocyty, B-lymfocyty, monocyty, NK buňky a dendritické buňky. Jedná se o vhodné buňky pro výzkum a klinické studie.

Nejvíce používanou separační metodou je hustotní gradientová centrifugace za použití gradientových médií Ficoll, Percoll nebo dalších. Jedná se o jednoduchou metodu, kdy po centrifugaci zůstávají plně funkční buňky. Mnozí ocení i její cenovou dostupnost. Neřadí se však mezi nejčistší metody. Po centrifugaci je obtížné odpipetovat jenom mononukleární buňky a nekontaminovat si ji ostatními buňkami. To neplatí pro imunomagnetickou separaci, která za pomoci magnetických částic poskytuje čisté, selektivně izolované buněčné populace. Dalšími výhodami je rychlost metody a dostupnost široké škály komerčních magnetických separátorů. Nevýhodou imunomagnetické separace je její cena. Podobně je na tom metoda průtokové cytometrie, Tato separační metoda sice poskytuje vysoký stupeň čistoty separovaných buněk, ale je velmi náročná na přístrojové a materiálové vybavení. Poslední metodou, kterou jsem se v práci zabývala, je counter-flow centrifugační elutriace. Výhodou centrifugační elutriace je minimální ovlivnění fyziologie buňky. Nevýhodou je cena speciální přístrojové vybavení.

Izolované buňky lze po separaci kultivovat na vhodných kultivačních médiích a v podmínkách, které se co nejvíce podobají přirozenému prostředí buněk.

Kultivované buňky je možné zmrazit a uschovat. Vytvoří se tak zásoba buněčných kultur, která může být použita, až v době potřeby.

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Actor J. K.: *T Lymphocytes-Ringleaders of Adaptive Immune Function*. Introductory Immunology, **2014**, p. 42–58, ISBN 978-0-12-420030-2.
2. Alberts B., Johnson A, Lewis J, Raff M., et al.: *Helper T Cells and Lymphocyte Activation*. Molecular Biology of the Cell, 4th edition, **2002**, p. 1396–1397, ISBN 0-8153-3218-1.
3. Bakke A. C.: *The Principles of Flow Cytometry*. Laboratory Medicine, **2001**, 32(4), p. 207–209.
4. Bartůňková J., Paulík M., Hrušák O., Smetana K., a kol.: *Vyšetřovací metody v imunologii*. Druhé přepracované a doplněné vydání GRADA, **2011**, p. 58, ISBN 978-80-247-3533-7.
5. Boyum A.: *Separation of Lymphocytes, Lymphocyte Subgroups and Monocyte*, Lymphology, **1977**, 10, p. 71–76.
6. Brown M., Wittwer C.: *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. Clinical Chemistry, **2000**, 46(8), p. 1221.
7. Connon C. J.: *Centrifugal Techniques*. Bioprocessing for Cell-Based Therapies, **2017**, p. 138–140, ISBN 978-1118743416.
8. Davis J.M.: *Basic Cell Culture*. A Practical Approach 2nd edition, **2002**, p. 69–186, ISBN 0199638535.
9. Drexler H. G., Uphoff C. C.; *Detection of Mycoplasma contamination in cell culture*. Encyclopedia of Cell Technology, **2000**, 106(1), p. 609–627.
10. Ferlazzo, G.: *Isolation and Analysis of Human Natural Killer Cell Subsets*. Innate Immunity, 2008, 415, p. 197–213.
11. Fisher D., Francis G. E., Rickwood D.: *Separate media*. Cell separation, **1998**, p. 45–54, ISBN 0199635803.
12. Freshney R. I.: *Animal Cell Culture*. A Practical Approach 3rd edition., **2000**, p. 2–11. ISBN 978-0471453291.
13. Furth R., Beekhuizrn H.: *Monocytes*. Encyclopedia of Immunology 2nd edition, **1998**, p. 1750–1754, ISBN 9780080547879.
14. Geissmann F., Manz M. G., Jung S., Sieweke M. H., et al.: *Development of monocytes, macrophages and dendritic cells*. Science, **2010**, 327(5966), p. 656–661.
15. Graham J. M.: *Separation of monocytes from whole human blood*. The Scientific World Journal, **2002**, 7(2), p. 1540–1543.

16. Heat W. R.: *T Lymphocytes*. Encyclopedia of Immunology, **1998**, 16, p. 2341–2343.
17. Heinemann D. E. H., Peters J. H.: *Follicular dendritic-like cells derived from human monocytes*. BMC Immunology, **2005**, 6, p. 23.
18. Hoffman W., Lakkis F. G., Chalasani G.: *B Cells, Antibodies, and More*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, **2015**, 11(1), p. 137–154.
19. Cheng L., Wang L. E., Spitz M. R., Wei Q.: *Cryopreserving whole blood for functional assays using viable lymphocytes in molecular epidemiology studies*. Cancer Letters, **2001**, 166(2), p. 155–163.
20. Keizer G. D., Te Velde A. A., Schwarting R., Figdor C. G., et al.: *Role of p150,95 in adhesion, migration, chemotaxis and phagocytosis of human monocytes*. European Journal of Immunology, **1987**, 17(9), p. 1317–22.
21. Kubo T., Morita H., Sugita K., Akdis C. A.: *Chapter 1–Introduction to Mechanisms of Allergic Diseases*. Middleton’s Allergy Essentials, **2017**, p. 1–27.
22. Lotze M. T., Thomson A. W.: *Isolation of NK cells*. Natural Killer Cells Basic Science and Clinical Application, **2010**, p. 125–126, ISBN 9780080919294.
23. Low W. S., Abas W. A. B. W.: *Benchtop Technologies for Circulating Tumor Cells Separation Based on Biophysical Properties*. BioMed Research International, **2015**, p. 1-22.
24. Luckashenak N., Eisenlohr L. C.: *Dendritic Cells*. Cancer Immunotherapy, **2013**, 15(84), p. 55–70.
25. Martin Y., Vermette P.: *Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances*. Biomaterials, **2005**, 26(35), p. 7481–7503.
26. Mason D.: *Lymphocytes*. Encyclopedia of Immunology, 2nd edition, **1998**, p. 1625–1627, ISBN 9780080547879.
27. Menck, K., Behme, D., Pantke, M., Reiling, N., et al.: *Isolation of Human Monocytes by Double Gradient Centrifugation and Their Differentiation to Macrophages in Teflon-coated Cell Culture Bags*. Journal of Visualized Experiments, **2014**, (91).
28. Miltenyi S., Müller W., Weichel W., Radbruch A.: *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, **1990**, 11, p. 231–238.
29. Mita A., Ricordi C. et al.: *Antiproliferative Effects of Iodixanol (OptiPrep)–Based Density Gradient Purification on Human Islet Preparations*. Cell Transplantation, **2010**, (19), p. 1537–1546.
30. Nutt S. L., Huntington N. D.: *Cytotoxic T Lymphocytes and Natural Killer Cells*. Clinical Immunology, **2019**, p. 247–249, ISBN 978-0-7020-6896-6.

31. Panda S. K., Ravindran, B.: *Isolation of Human PBMCs*. Bio-protocol, **2013**, 3(3).
32. Perper R.J., Zee T.W., Mickelson M.M.: *Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, **1968**, 72(5), p.842–848.
33. Repnik U., Knezevic M., Jeras M.: *Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats*. Journal of Immunology Methods, **2003**, 278(1–2), p. 283–292.
34. Rojas J., Salazar J., Martínez M. S., Palmar J., et al.: *Macrophage Heterogeneity and Plasticity: Impact of Macrophage Biomarkers on Atherosclerosis*. Scientifica, **2015**, p. 2.
35. Rossi L. M., Costa N. J. S., Silva F. P., Wojcieszak R.: *Magnetic nanomaterials in catalysis: advanced catalysts for magnetic separation and beyond*. Green Chemistry, **2014**, 16, p. 2906–2933.
36. Scheinecker C.: *T-Cell Development, Thymic Selection, and Tolerance, T-Cell Activation*. Rheumatoid Arthritis, **2009**, p. 91–92.
37. Schroeder H. W., Cavacini L.: *Structure and Function of Immunoglobulins*. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, **2010**, 125(2) p. 41–52.
38. Siegel R. J., Klohe E. P.: *Use of Magnetic Beads for Rapid Granulocyte and Monocyte Depletion from Lymphocyte Preparations*. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics Quarterly, **2000**, 24(4), p. 87–89.
39. Sonka J., Stohr M., Vogt-Schaden M., Volm M.: *Isopycnic density-gradient centrifugation: a separation parameter which improves flow cytometric measurements on heterogeneous tumors*. Cytometry, **1983**, 4, p. 141–149.
40. Stuve O., Vernino S.: *The major histocompatibility complex and antibody-mediated limbic encephalitis*. Annals of Neurology, **2016**, 81(2), p. 181.
41. Wittman G.: *Separation of porcine blood cells by means of Ficoll-Paque*. Zentralbl Veterinarmed B, **1980**, 27(3) p. 253–256.
42. Zborowski M., Chalmers J. J.: *Magnetic Cell Separation—Commercial magnetic cell separation instruments and reagents*. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, **2008**, 32(10), p. 268–271.
43. Zhang J., Zheng H., Diao Y.: *Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy*. International Journal of Molecular Sciences, **2019**, 20(2), p. 317.

7.1 Internetové odkazy

44. Abcam: *Introduction to flow cytometry* [online]. 2019 [cit. 2019-06-02]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>.
45. Biosera: *Synthetic cell culture media* [online]. 2019 [cit. 2019-06-06]. Dostupné z: <http://www.biosera.com/home/products/basal-medium-eagle-bme/#>.
46. Cell Applications, INC.: *Human Peripheral Blood Mononuclear Cells* [online]. 2019 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.cellapplications.com/human-peripheral-blood-mononuclear-cells-pbmchmnc-pb>.
47. Sigma–Aldrich®: *Gradient media* [online]. 2019 [cit. 2019-05-31]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=gradient+media&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en&ion=CZ&focus=product>.
48. ThermoFisher Scientific: *Dynabeads Cell Isolation and Expansion Support* [online]. 2019 [cit. 2019-06-04]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/technical-resources/technical-reference-library/cell-culture-support-center/dynabeads-cell-isolation-expansion-support.html>.