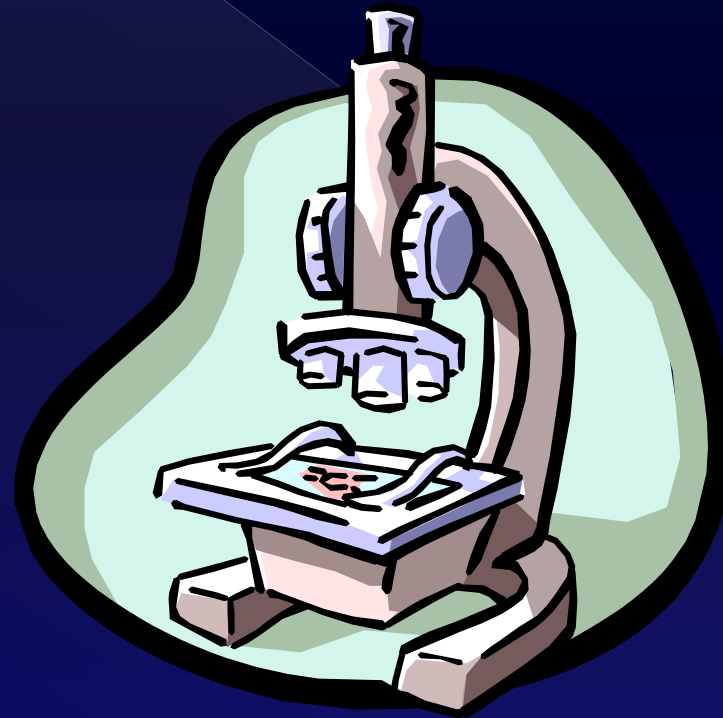


METODY BADANIA KOMÓREK I TKANEK



HISTORIA

-1895 – hodowla płytki nerwowej zarodka kurczęcia w ciepłym roztworze soli fizjologicznej (Wilhelm Roux)

-1907 - hodowla cewy nerwowej żaby w skrzepie żabiej limfy.

Wyrastanie wypustek z komórek nerwowych (Ross Harrison).

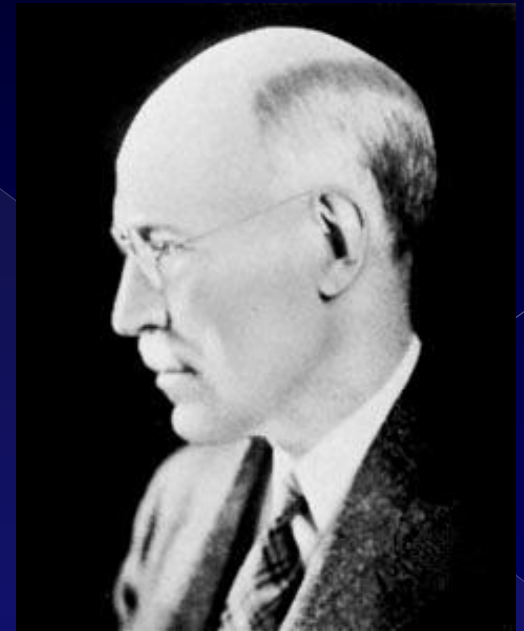
-optymalizacja warunków hodowli poprzez stosowanie różnych środowisk hodowlanych (osocza, surowicy, wyciągu z zarodków kurcząt) i określanie potrzeb komórek w zakresie ciśnienia osmotycznego, pH, zapotrzebowania na sole (Burrows, Carrel,

- Ebeling, Lewis).



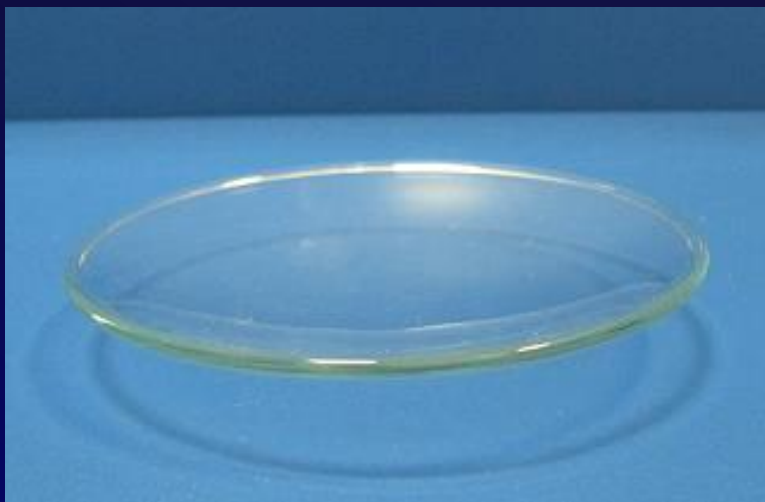
Wilhelm Roux
(1850 –1924)

Ross Granville Harrison
(1870 –1959)



HISTORIA

- lata 20 XX wieku – hodowle tkanek zarodkowych.
Zaobserwowano zdolność komórek do różnicowania. Hodowla w skrzepie w szkiełku zegarkowym – hodowla narządowa.
- lata 40 XX wieku – pierwsze sztuczne pożywki zawierające sole mineralne, aminokwasy, witaminy.
 - 1952 – zastosowanie trypsyny jako czynnika rozdzielającego tkankę na pojedyncze komórki i umożliwiający oddzielanie ich od szkła (Moscona H, Moscona A)



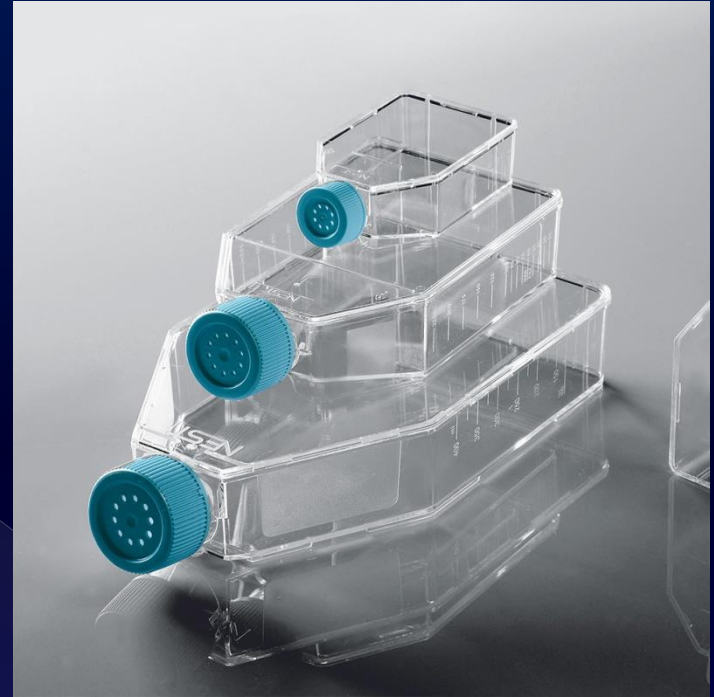
WSPÓŁCZESNA HODOWLA

-oprzyrządowanie laboratoriów umożliwia zachowanie
jałowości hodowli



WSPÓŁCZESNA HODOWLA

-wprowadzenie plastikowych naczyń jednorazowych, o odpowiednio przygotowanej powierzchni



-wykorzystywanie czynników wzrostowych dla uzyskania proliferacji i wzrostu różnych typów komórek

-wyprowadzenie licznych stałych linii komórkowych

ZASTOSOWANIA HODOWLI

1. Badania podstawowe *in vitro*
2. Diagnostyka
3. Produkcja szczepionek (polio, odra, świnka, różyczka)
4. Produkcja enzymów, hormonów, cytokin
5. Produkcja przeciwciał monoklonalnych
6. Uzyskiwanie komórek do przeszczepów

PODSTAWOWE DEFINICJE

Hodowla tkanek - badanie komórek, tkanek i narządów przetrzymywanych lub rosnących in vitro ponad 24 godziny (poniżej 24h – inkubacja)

Hodowla pierwotna - hodowla wyprowadzona z komórek, tkanek lub narządów pobranych bezpośrednio z organizmu

Linia komórkowa- powstaje z hodowli pierwotnej po założeniu pierwszej podhodowli (po pierwszym pasażu).

Ustalona linia komórkowa – linia, którą można pasażować dowolnie długo (nieśmiertelna)

LINIE KOMÓRKOWE

DIPLOIDALNA LINIA KOMÓRKOWA

linia, w której przynajmniej 75% komórek ma taki sam kariotyp jak prawidłowe komórki somatyczne gatunku, z którego wyprowadzono hodowlę

HETEROIDALNA LINIA KOMÓRKOWA

linia komórkowa, w której mniej niż 75% komórek ma diploidalny kariotyp

Definicje cd.

CZAS PODWOJENIA POPULACJI

odstęp czasu, w którym liczba komórek podwaja się

TRANSFORMACJA KOMÓREK

zmiana komórek prawidłowych w komórki nowotworowe, spowodowana wprowadzeniem nowego materiału genetycznego lub mutacją.

WZROST HODOWLI

zwiększanie się masy komórek (dawniej określenie to dotyczyło zwiększania się ich liczby)

PROLIFERACJA, ROZMNAŻANIE

zwiększanie się liczby komórek w hodowli

POŻYWKI HODOWLANE

1. Odpowiednie ciśnienie osmotyczne 340 ± 5 mOsm/Kg H₂O i pH w zakresie do 7,2 do 7,4.

2. SKŁAD POŻYWKI:

sole mineralne

aminokwasy

glukoza

kwasy tłuszczowe

witaminy

zasady purynowe i pirymidynowe

czerwień fenolowa

bydlęca surowica płodowa – źródło czynników wzrostu i hormonów



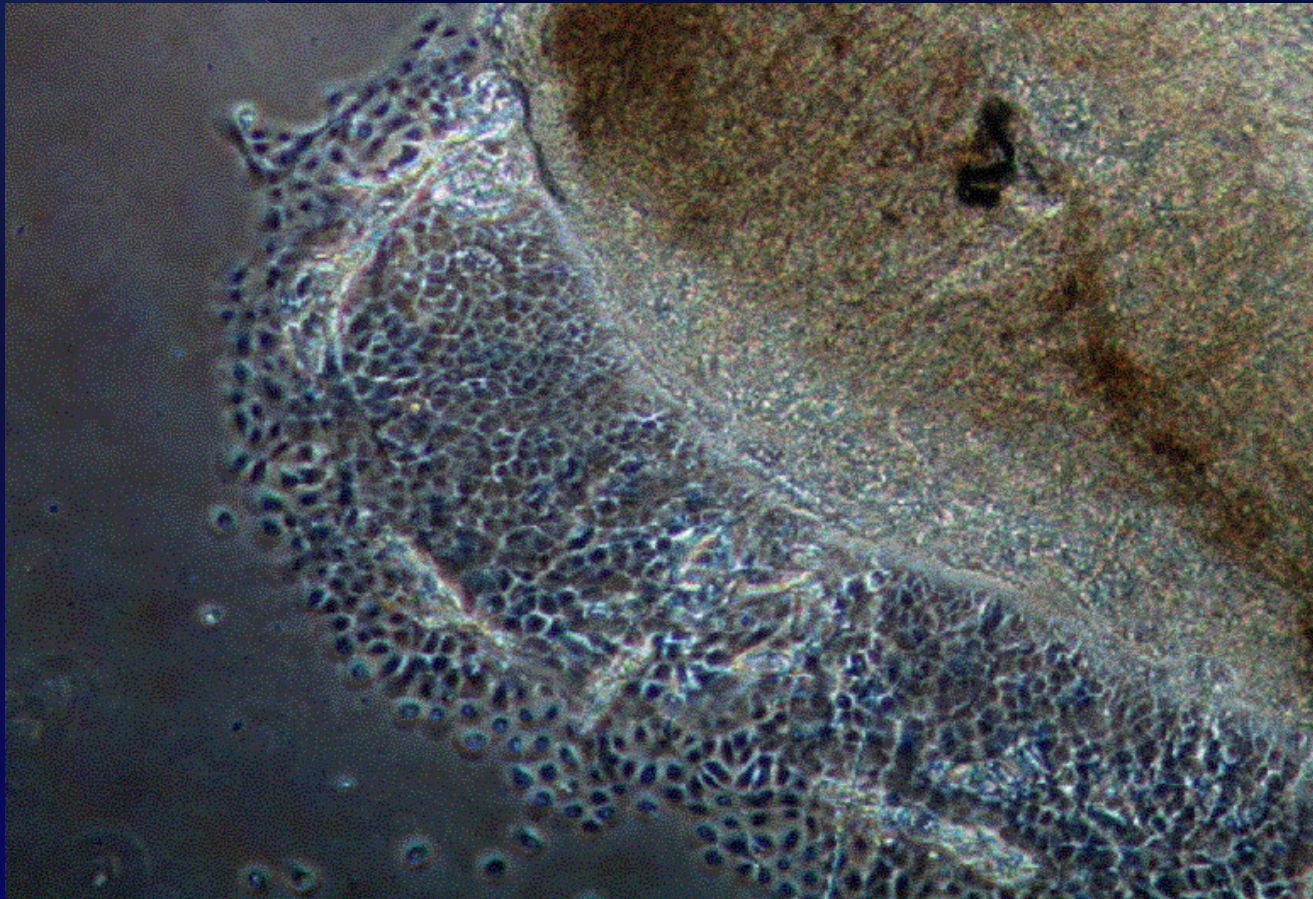
INKUBATOR

Zapewnia optymalną temperaturę, wilgotność, stężenie dwutlenku węgla i tlenu.



IZOLACJA KOMÓREK LUB ICH ZESPOŁÓW

1. Hodowanie w naczyniu eksplantatu (wyosobnionego fragmentu tkanki lub narządu) przez czas konieczny do wypełnienia z niego komórek.



IZOLACJA KOMÓREK LUB ICH ZESPOŁÓW

Rozdzielenie eksplantatu na pojedyncze komórki metodą enzymatyczną:

a) gdy mało substancji międzykomórkowej np. tkanki płodowe – trypsyną

b) gdy dużo substancji międzykomórkowej np. chrząstka – kolagenazą z dodatkiem deoksyrybonukleazy

Rozdzielenie explantatu na większe fragmenty np. uzyskanie pęcherzyków tarczycy lub wysepek trzustkowych – kolagenazą

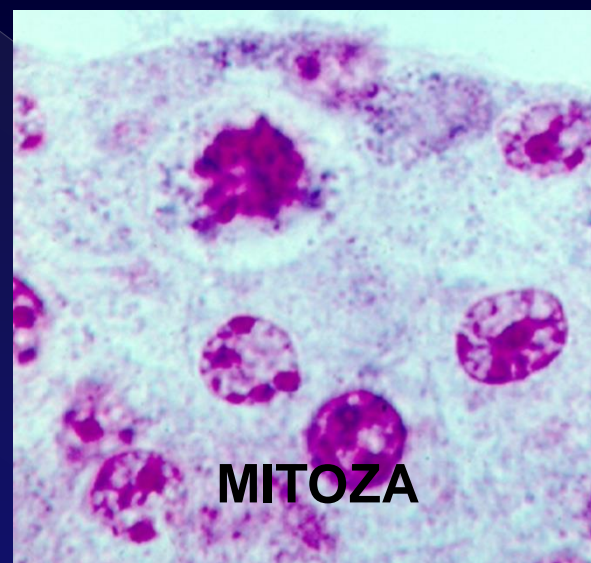
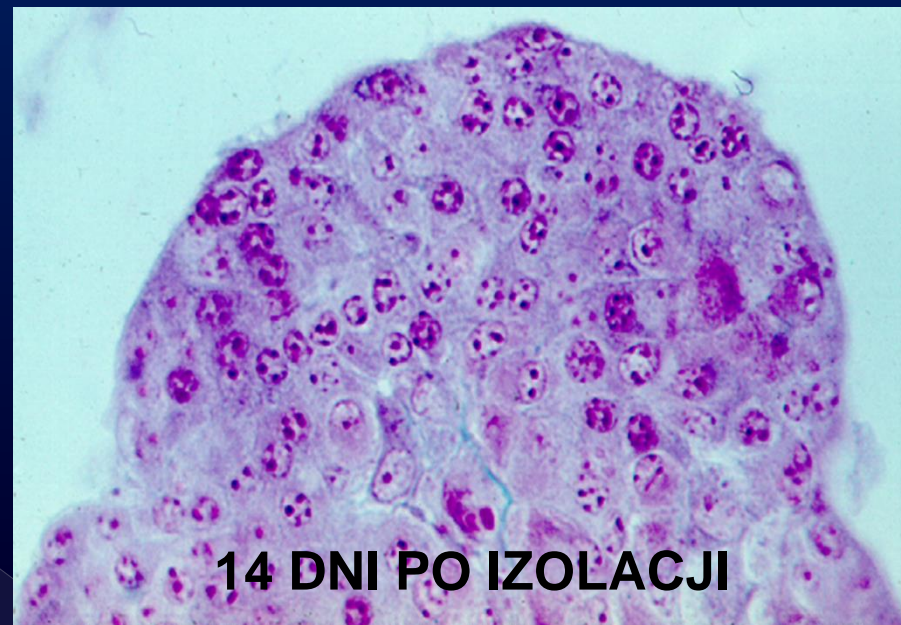
Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig.

Stanislaw Moskalewski Department of Histology and Embryology, Medical University of Warsaw

General and Comparative Endocrinology 1965; 44(3):342-53. DOI: 10.1016/0016-6480(65)90059-6



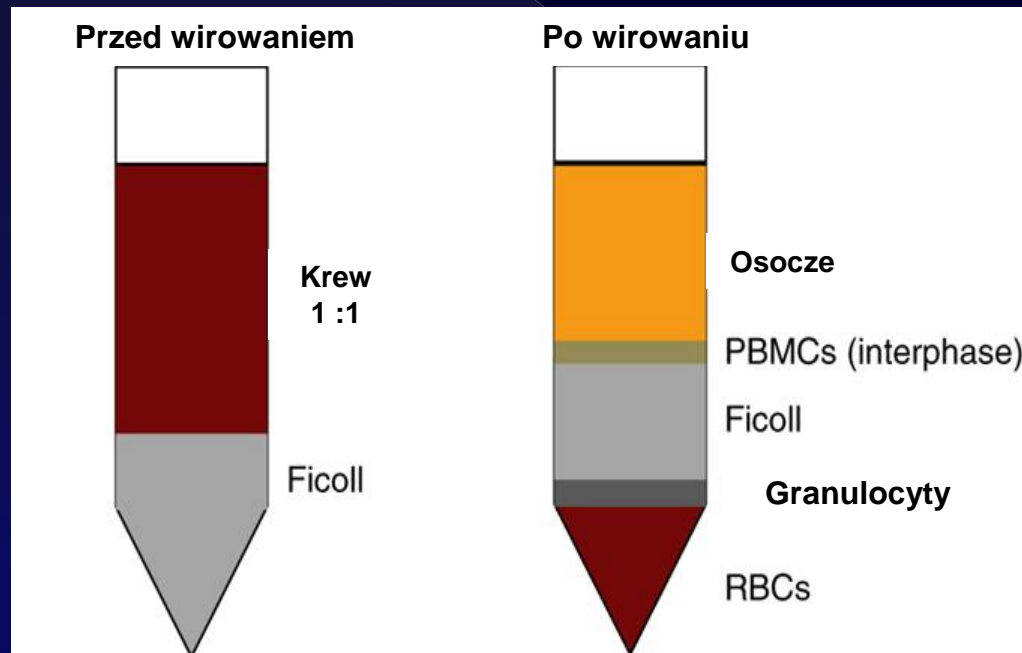
WYSEPKA LANGERHANSA



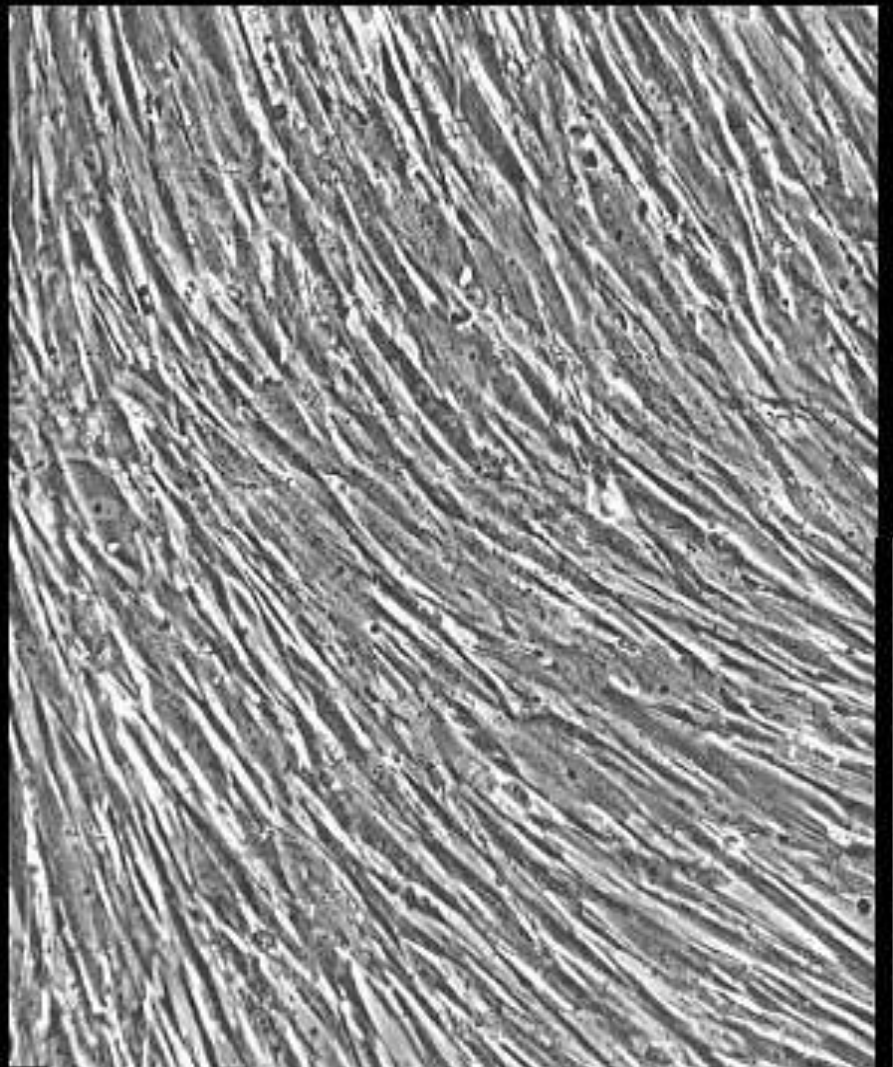
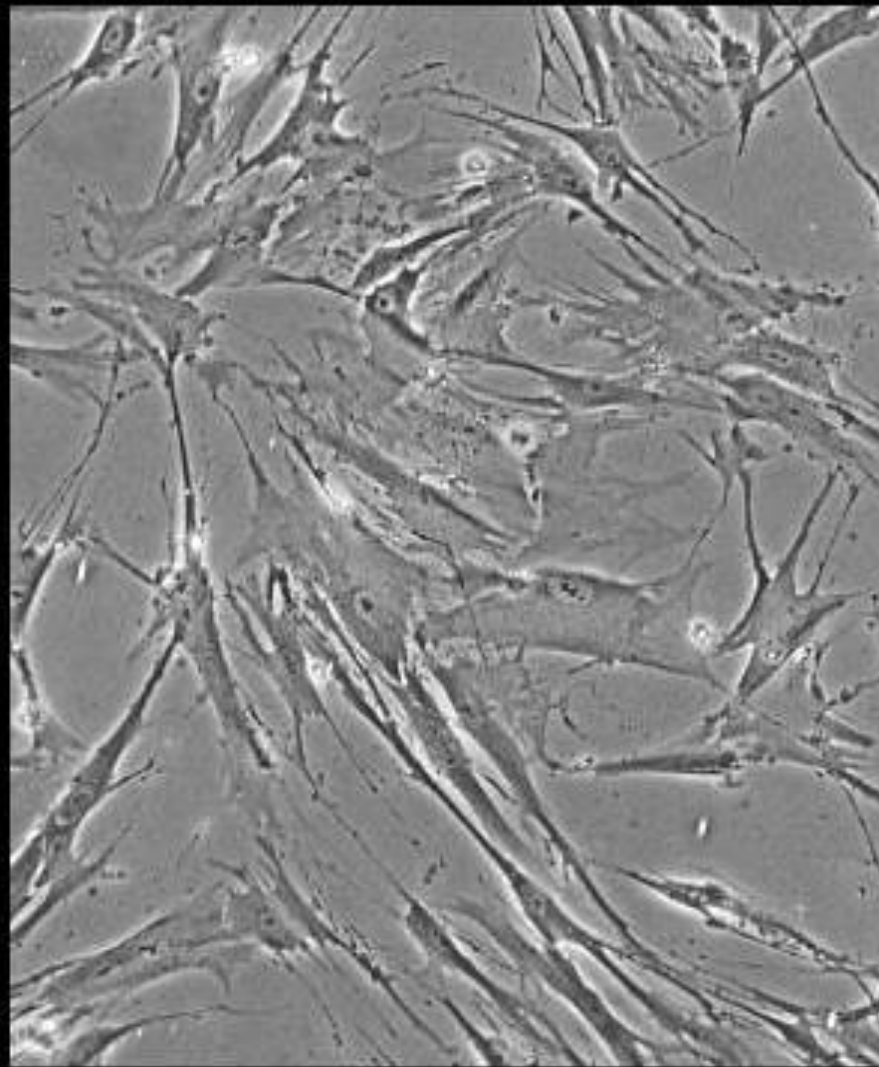
IZOLACJA KOMÓREK LUB ICH ZESPOŁÓW

Rozdzielanie heterogennej populacji komórek np. komórek krwi:
Przez wirowanie w gradiencie gęstości – komórki rozdzielane zgodnie ze stałą sedymentacji

Krew zmieszana z antykoagulantem, rozcieńczoną 1 : 1, nawarstwioną na wodny roztwór obojętnego, rozgałęzionego, wysokocząsteczkowego polisacharydu (gęstość 1.075g/ml) poddawano wirowaniu.



FIBROBLASTY W HODOWLI



ZAHAMOWANIE KONTAKTOWE

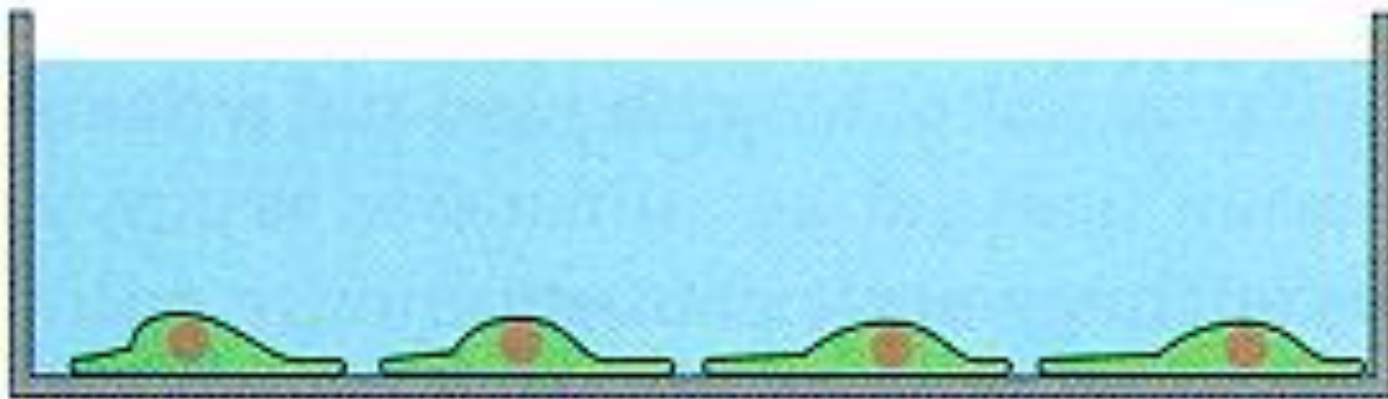
zjawisko hamowania podziałów komórek przy zetknięciu się komórek ze sobą; obserwowane w hodowlach komórkowych prowadzonych na podłożach stałych; rezultatem jest hodowla składająca się z jednej warstwy komórek stykających się z podłożem. W tym punkcie prawidłowe komórki przestają się dzielić.

KONTAKTINHIBINA – glikoproteina występująca w błonie komórek

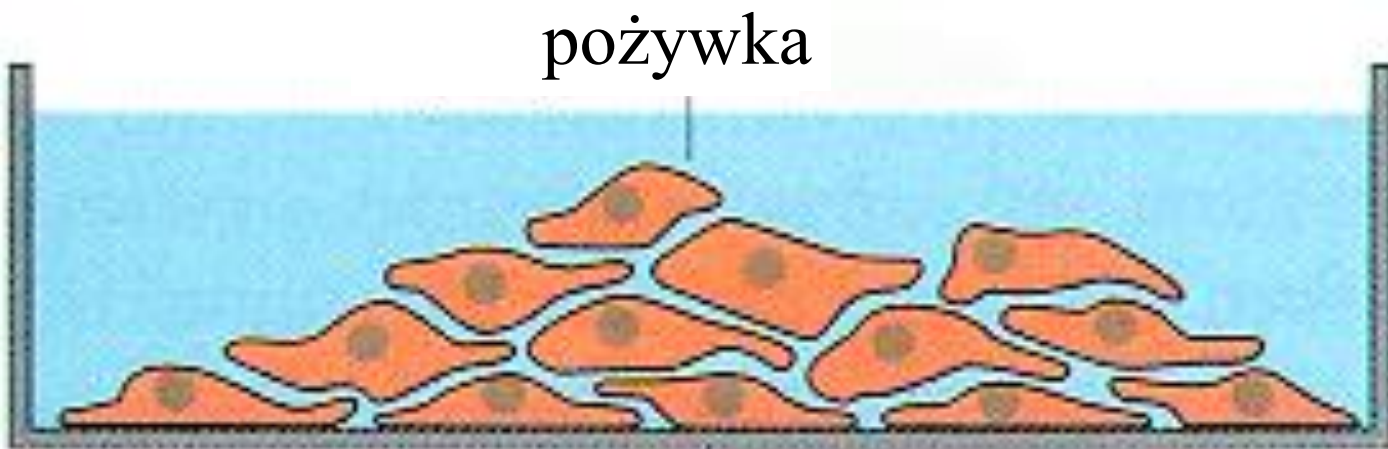
CiR – receptor dla kontaktinhibiny

Połączenie receptora z ligandem powoduje zmiany w układzie kinaz zależnych od cyklin (brak aktywności kompleksu CDK4 z cykliną D), co prowadzi do zahamowania podziałów komórkowych.

Fibroblasty stransformowane – brak CiR



komórki
prawidłowe
(diploidalne)



pożywka

komórki
nowotworowe
(hetero-
ploidalne)

dno płytki

ZAHAMOWANIE KONTAKTOWE – KOMÓRKI DIPLO- I HETEROPLOIDALNE

LICZBA PODWOJEŃ POPULACJI

Ludzkie prawidłowe fibroblasty młodego osobnika w hodowli przechodzą kilkadziesiąt podwojeń populacji (50-60) – limit Hayflicka

Profesor
Leonard Hayflick



TELOMERY

Chromosomy liniowe są mniej stabilne niż koliste, ale warunkują różnorodność genetyczną żyjących organizmów (rekombinacje).

Jednak końce 3' oraz 5' są podatne na działanie enzymów degradujących DNA, a także chromosomy liniowe mogą ulegać fuzji.

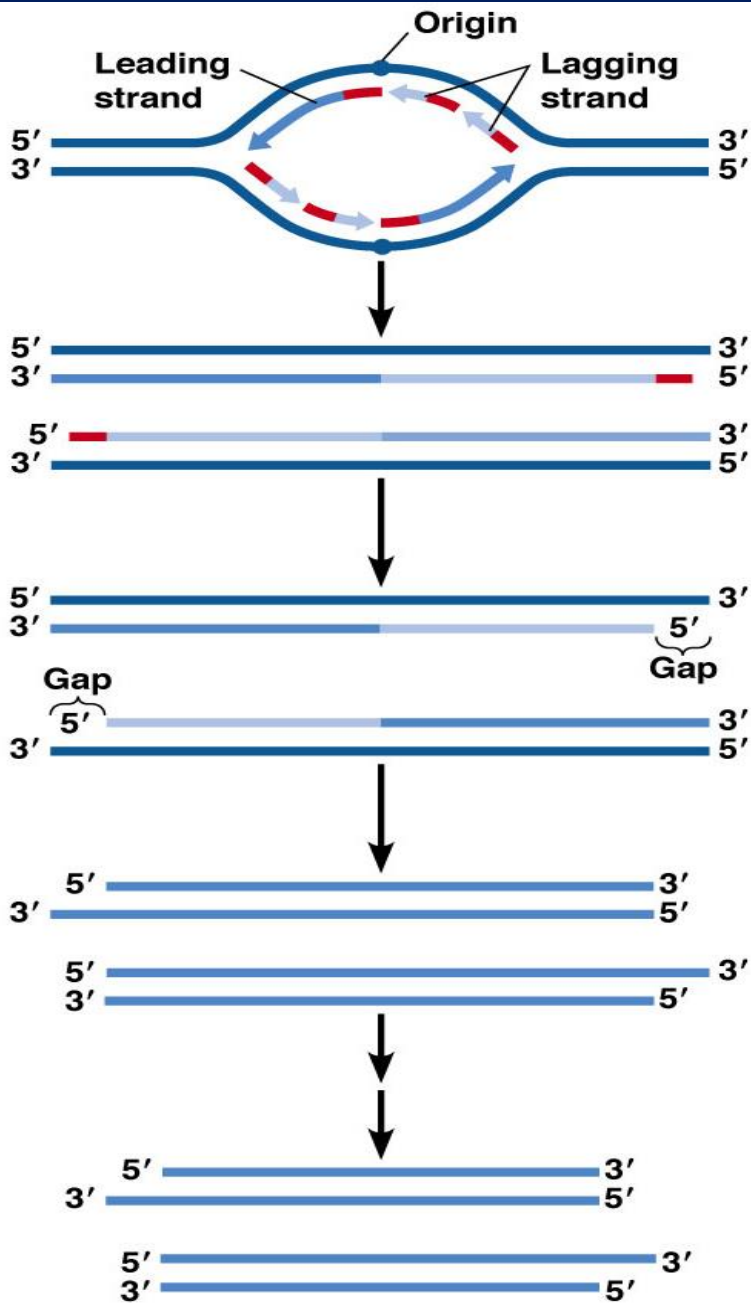
Uszkodzeniom chromosomów zapobiegają – TELOMERY- powtarzające się sekwencje niekodującego DNA (TTAGGG) wraz z białkami zlokalizowane na końcach chromosomów.

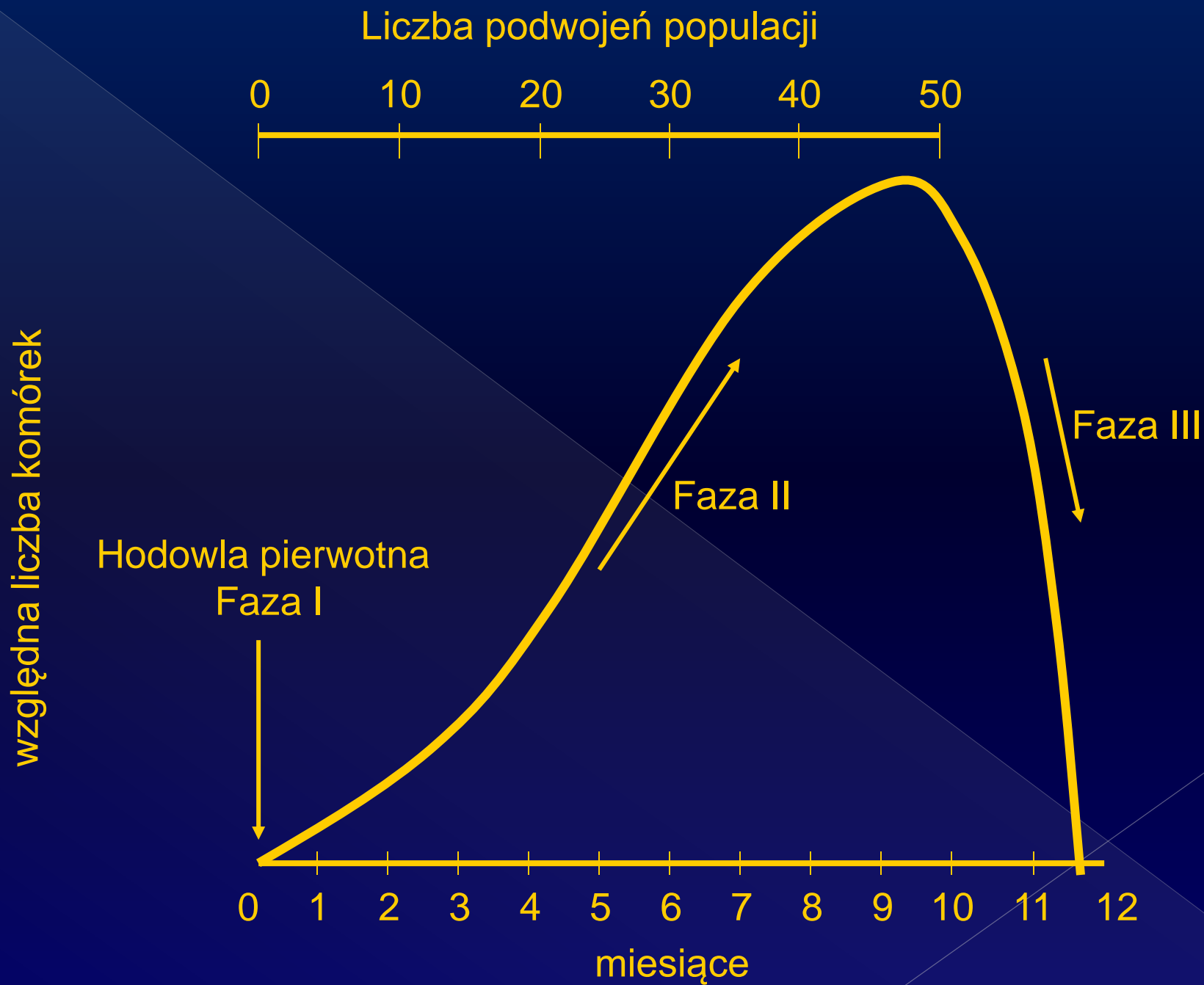
Podczas każdego cyklu replikacyjnego komórka traci 50-200 bp telomerowego DNA.

Gdy telomery osiągną krytyczną długość – ETAP STARZENIA KOMÓRKI (zahamowanie cyklu komórkowego zależne od białka p53)

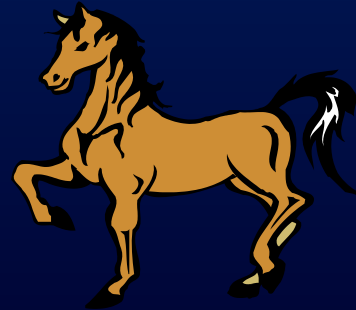
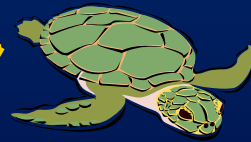
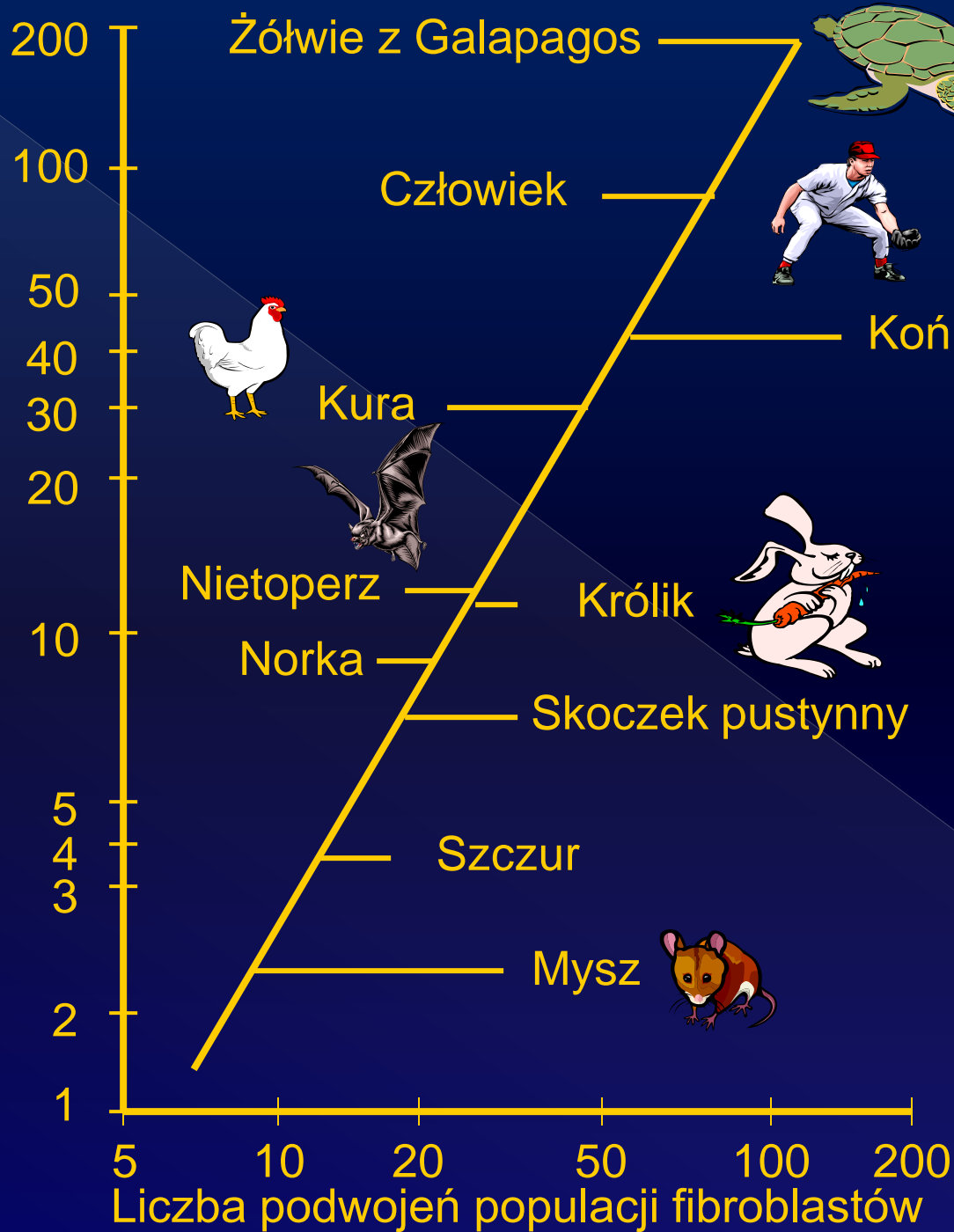
Problem replikacji końców - utrata telomerowego DNA podczas replikacji

Polimeraza DNA może czytać i syntetyzować DNA tylko w jednym kierunku, zaczynając od startera.





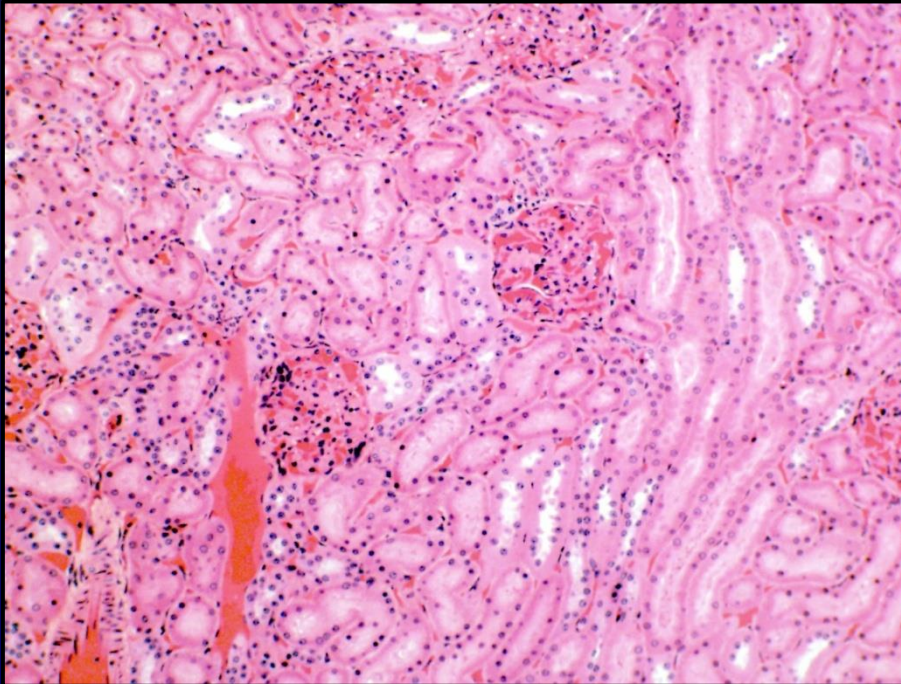
Maksymalna długość życia (w latach)



BADANIE KOMÓREK I TKANEK

Co można badać?

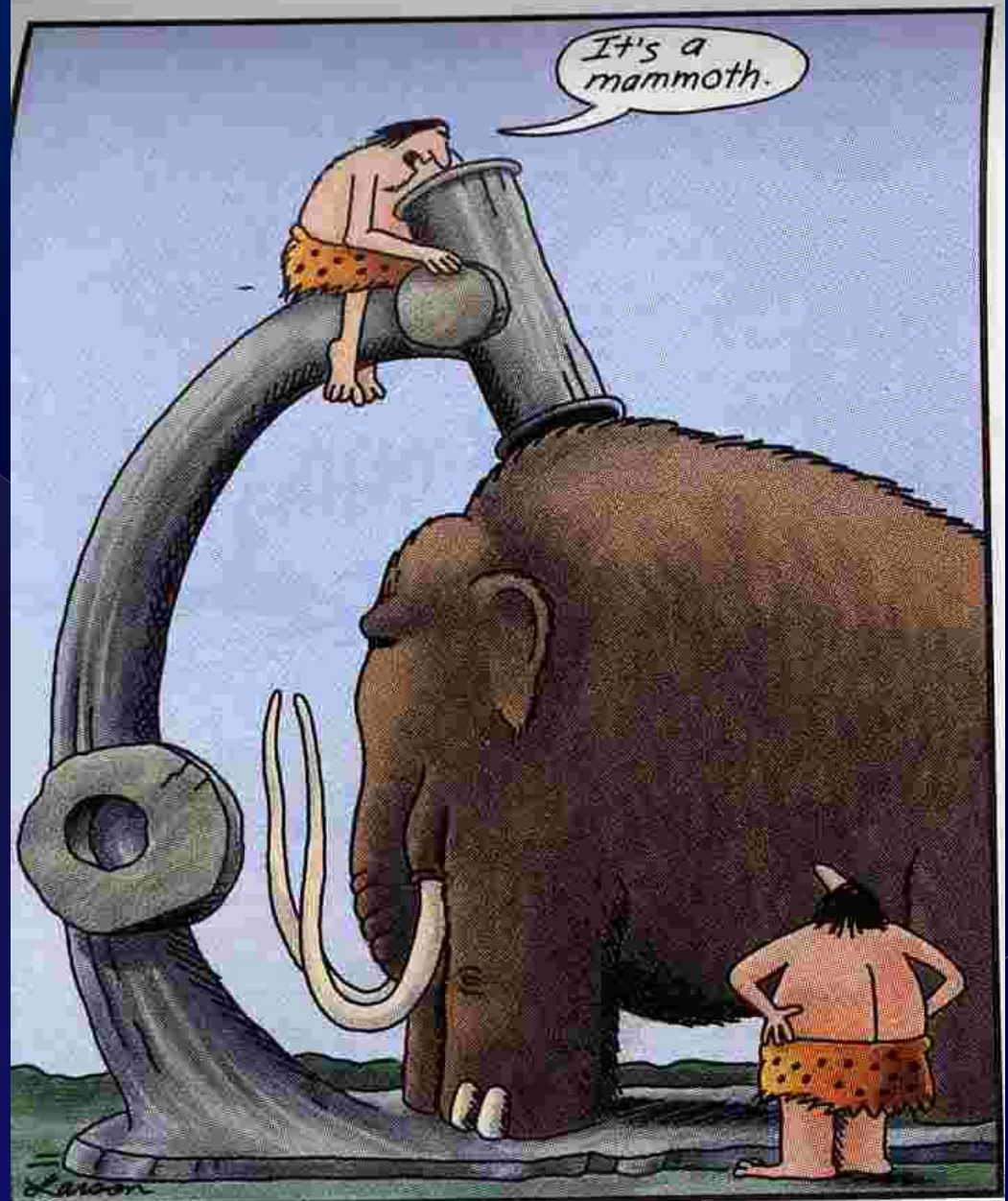
Budowę komórek/tkanek Mikroskop światłny/elektronowy



HISTORIA

MIKROSKOP:
JEDNO Z
NAJWCZEŚNIEJSZYCH
NARZĘDZI WCZESNYCH
BIOLOGÓW KOMÓRKI

Pierwsze mikroskopy optyczne Zachariasz i Hans Janssen - Holandia. Antonie van Leeuwenhoek udoskonalił konstrukcję mikroskopów i rozwinął ich produkcję w XVII wieku. Obserwował żywe komórki – plemniki, pierwotniaki, erytrocyty.



Wczesny mikroskop

CYTO- i HISTOCHEMIA

(wykrywanie związków chemicznych występujących w komórkach, tkankach i w substancji międzykomórkowej)

-BARWNE REAKCJE HISTOCHEMICZNE

-AUTORADIOGRAFIA

-IMMUNOHISTOCHEMIA



REAKCJA P.A.S (Periodic acid–Schiff)- WYKRYWANIE WIELOCUKRÓW

WIELOCUKRY



KWAS
NADJODOWY

(utlenianie grup glikolowych)



GRUPY ALDEHYDOWE

ODCZYNNIK SCHIFFA

(bezbarwna fuksyna zasadowa)

CZERWONE ZABARWIENIE

(GLIKOGENOZY, NOWOTWORY)

ODCZYNNIKA SCHIFFA



Reakcja PAS w jelicie – komórki kubkowe



HISTOENZYMOLOGIA

ENZYM

(np. fosfataza zasadowa,
dehydrogenaza kwasu bursztynowego)



SUBSTRAT



PRODUKT

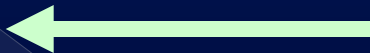


ZWIĄZEK POŚREDNI

STRĄT

(barwny, nierozpuszczalny)

FOSFORAN Beta-NAFTYLU



FOSFATAZA ZASADOWA

Beta-NAFTOL

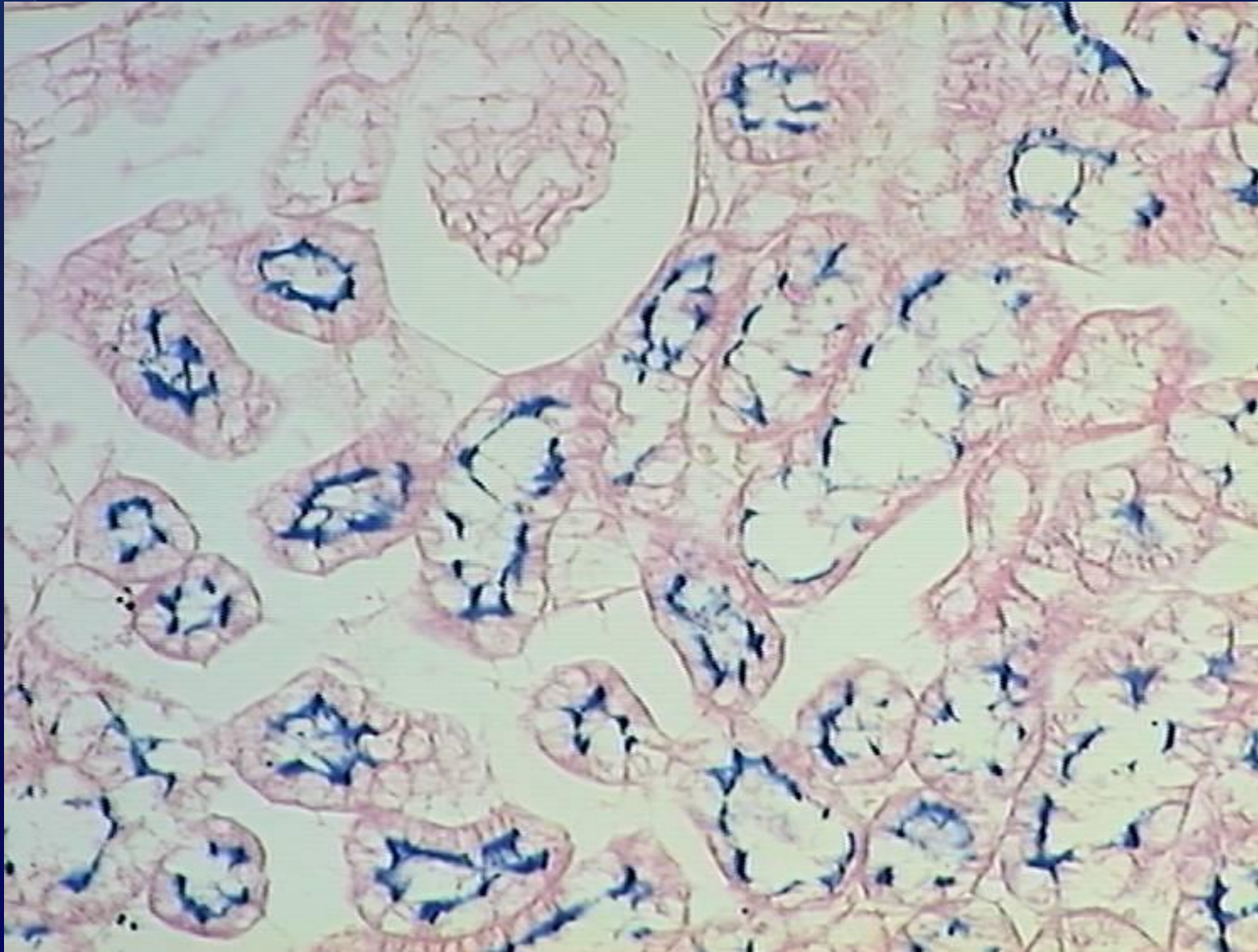


BARWNIK DWUAZOWY

BARWNY KOMPLEKS

**(GUZY WYWODZĄCE SIĘ Z TROFOBLASTU,
PRZERZUTY RAKA GRUCZOŁU KROKOWEGO)**

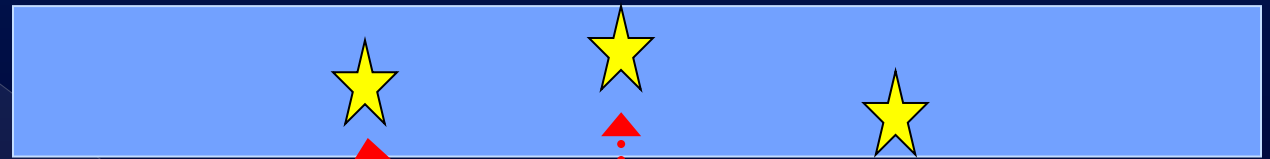
Kanaliki bliźsze nerki wykazujące aktywność fosfatazy zasadowej



AUTORADIOGRAFIA

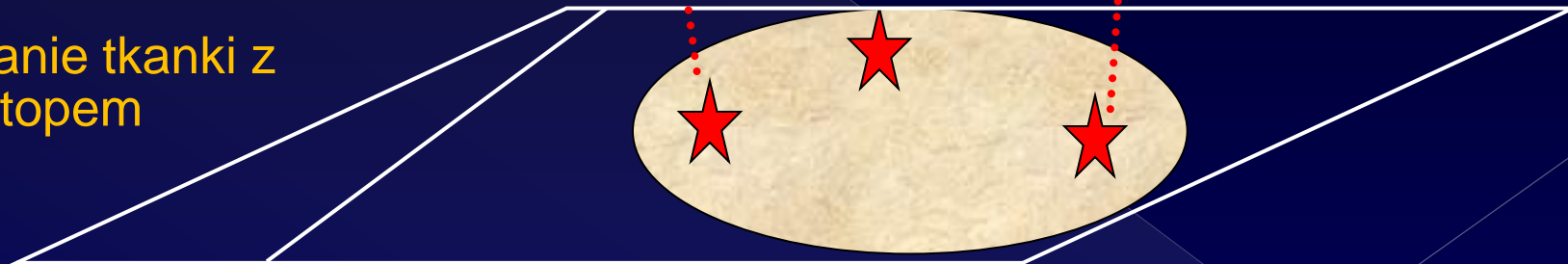
Promieniowanie uderza w ziarna srebra w emulsji i ujawnia je.
Powstanie obrazu utajonego; srebro metaliczne

Ekspozycja emulsji
na promieniowanie
(AgBr w żelatynie)

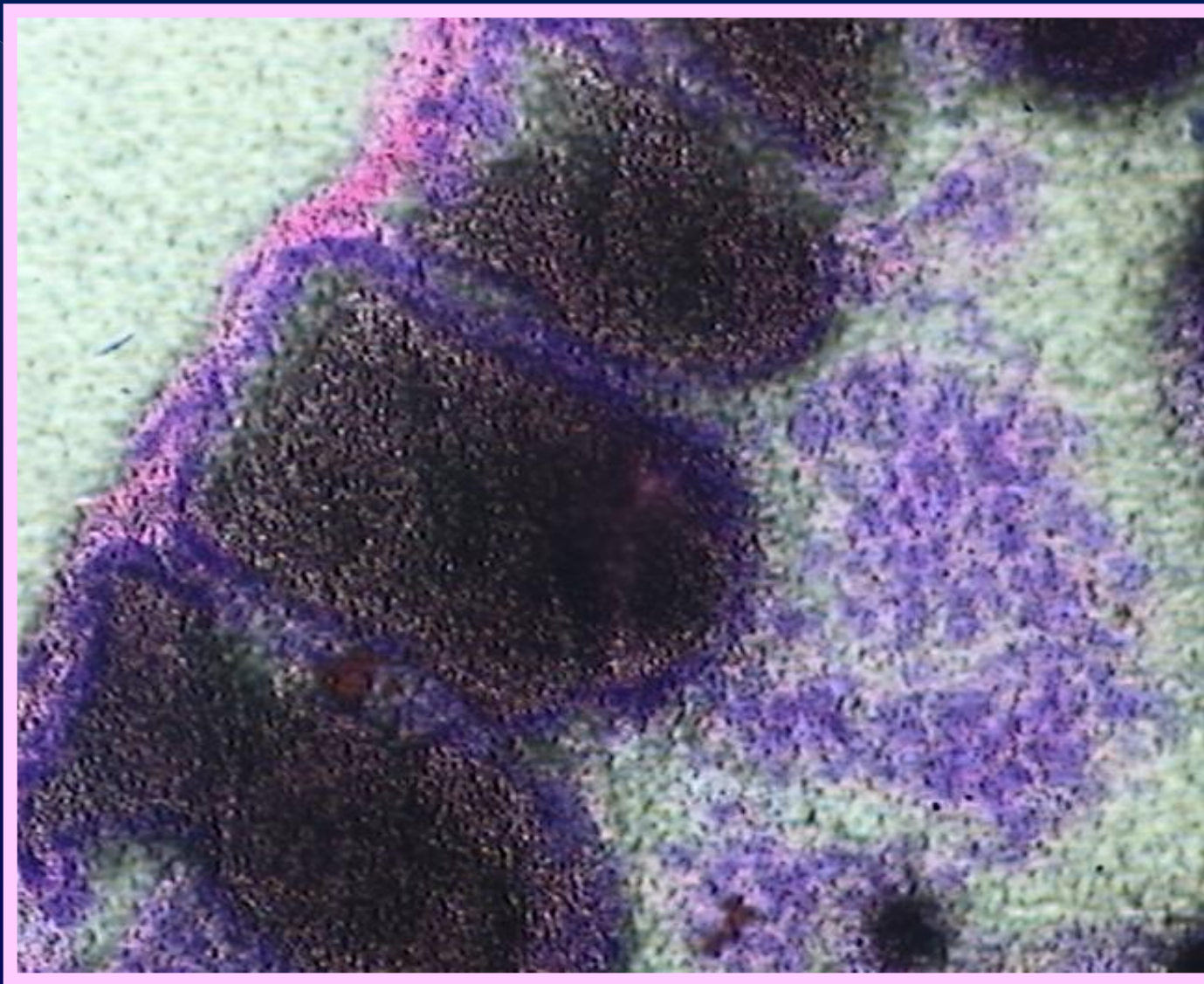


Izotop emituje
promieniowanie (zwykle beta)

Inkubowanie tkanki z
izotopem



Obróbka fotograficzna przetwarza obraz utajony w obraz widzialny.
Nad miejscem preparatu gdzie w tkance wbudowany był izotop
widoczne są czarne ziarna srebra.



TARCZYCA - jod¹³¹

IMMUNOHISTOCHEMIA

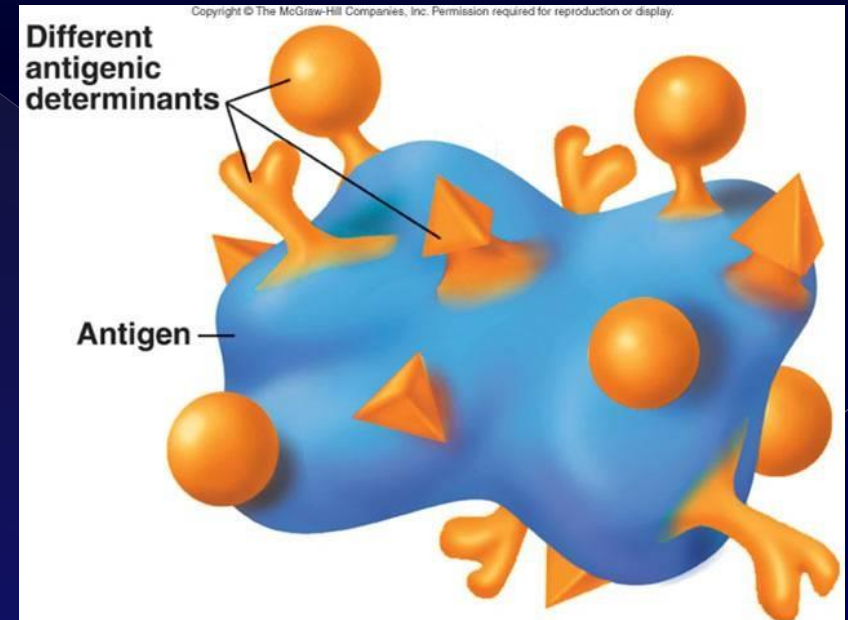
Wykrywanie antygenów obecnych w komórkach i tkankach za pomocą przeciwciał:

monoklonalnych i poliklonalnych



$F(ab)_2$

Fc



METODY ZNAKOWANIA PRZECIWCIAŁ

- **FLUOROCHROMY** (np. pochodne fluoresceiny)
- **METALE** (np. ferrytyna; złoto koloidalne)
- **IZOTOPY** (np. ^3H ; ^{125}J ; ^{35}P ; ^{14}C)
- **ENZYMY** (np. fosfataza zasadowa, peroksydaza)

IMMUNOHISTOCHEMIA

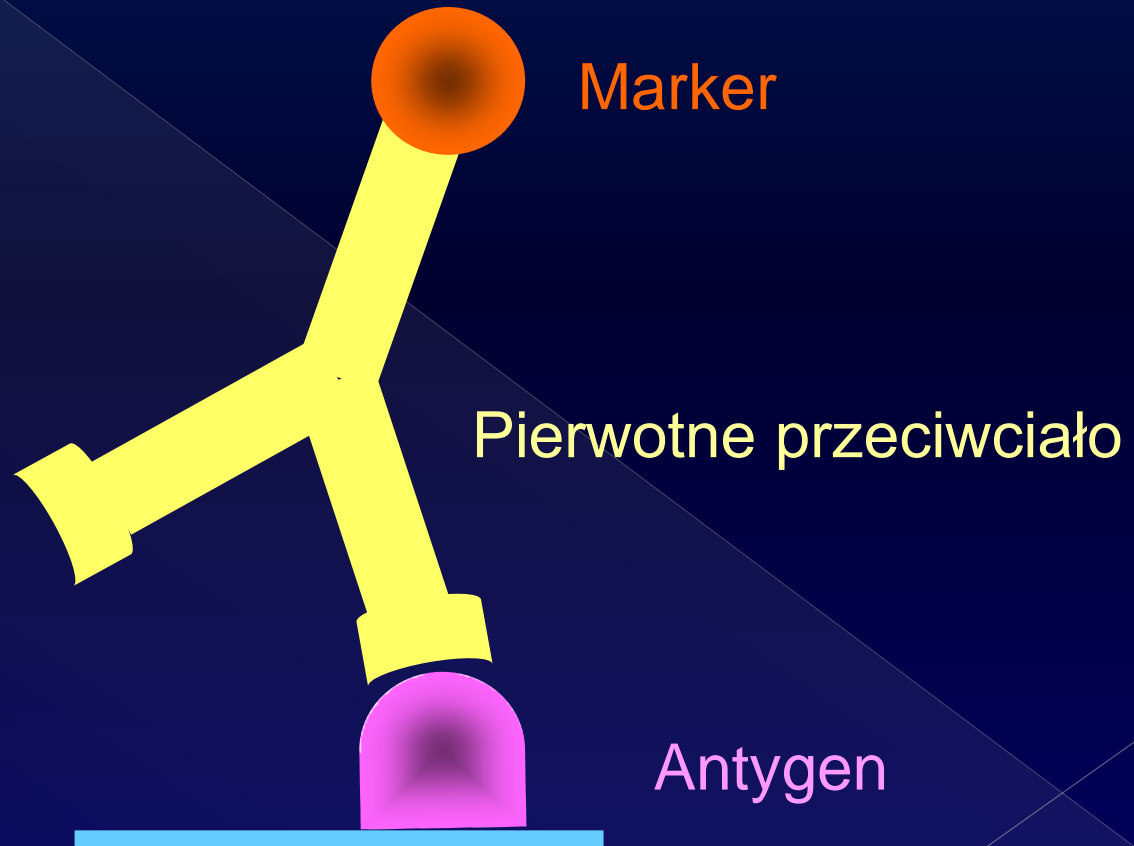
- METODA BEZPOŚRENIA

-z użyciem pierwotnego przeciwciała

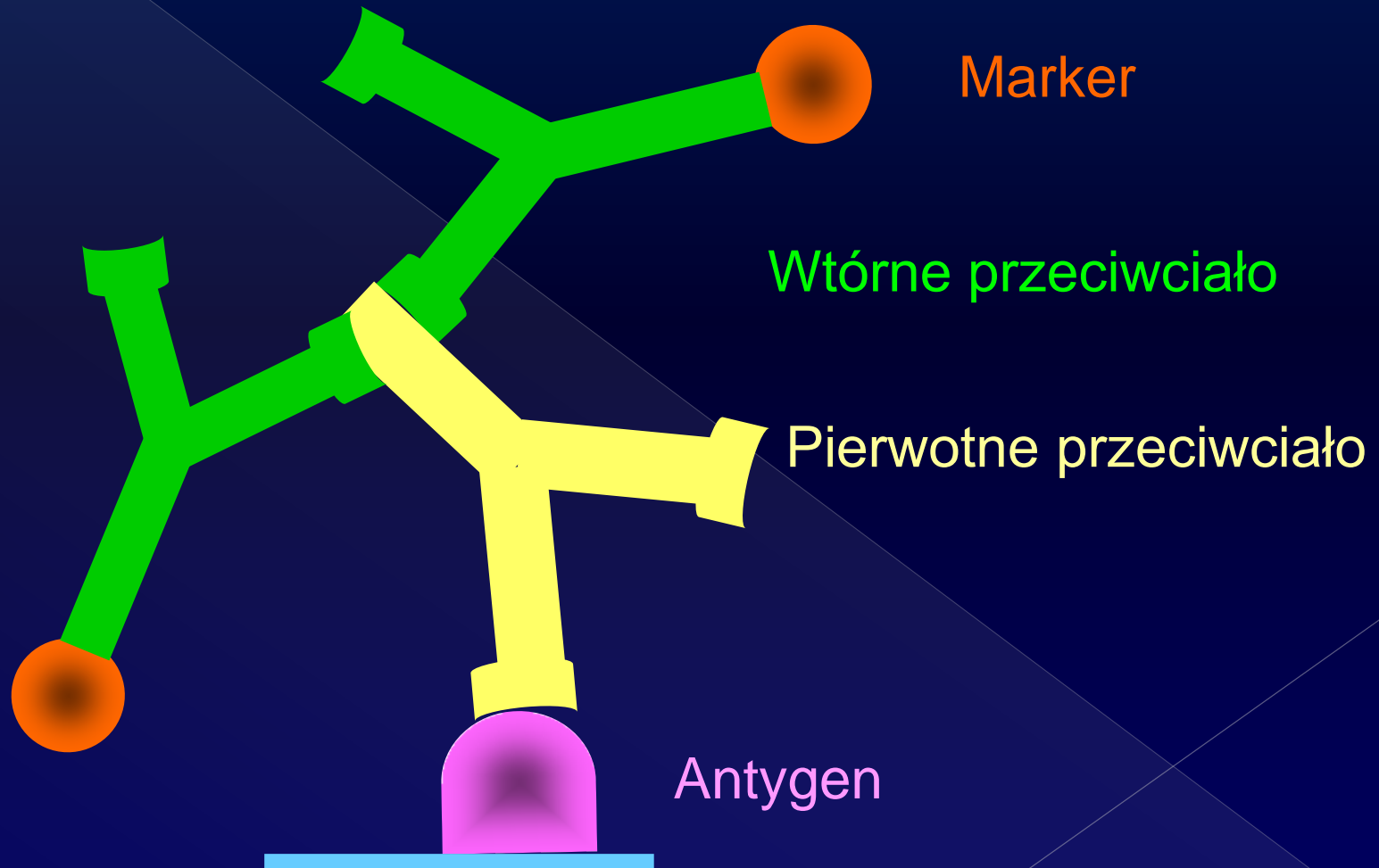
- METODA POŚREDNIA

-z użyciem dalszych przeciwciał

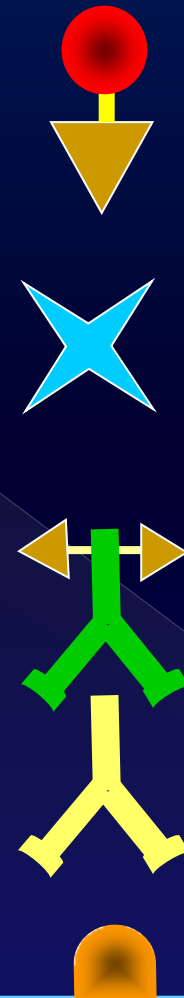
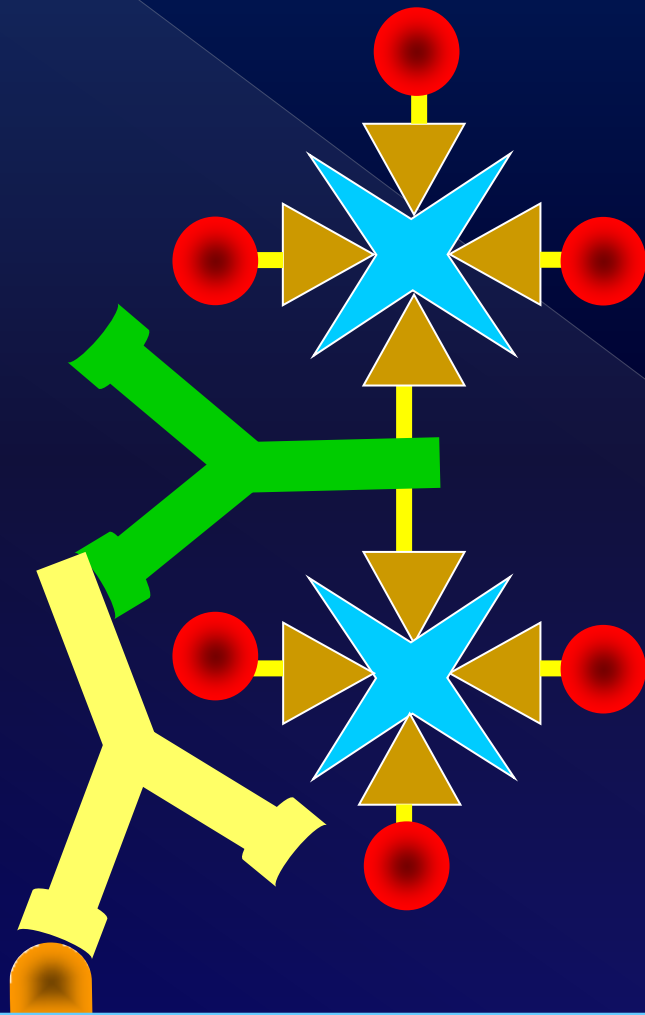
IMMUNODETEKCJA BEZPOŚREDNIA



IMMUNODETEKCJA POŚREDNIA



IMMUNODETEKCJA POŚREDNIA



biotynylowany
znacznik

streptawidyna
lub awidyna

Biotynylowane
wtórne
przeciwciało

Pierwotne przeciwciało

antygen

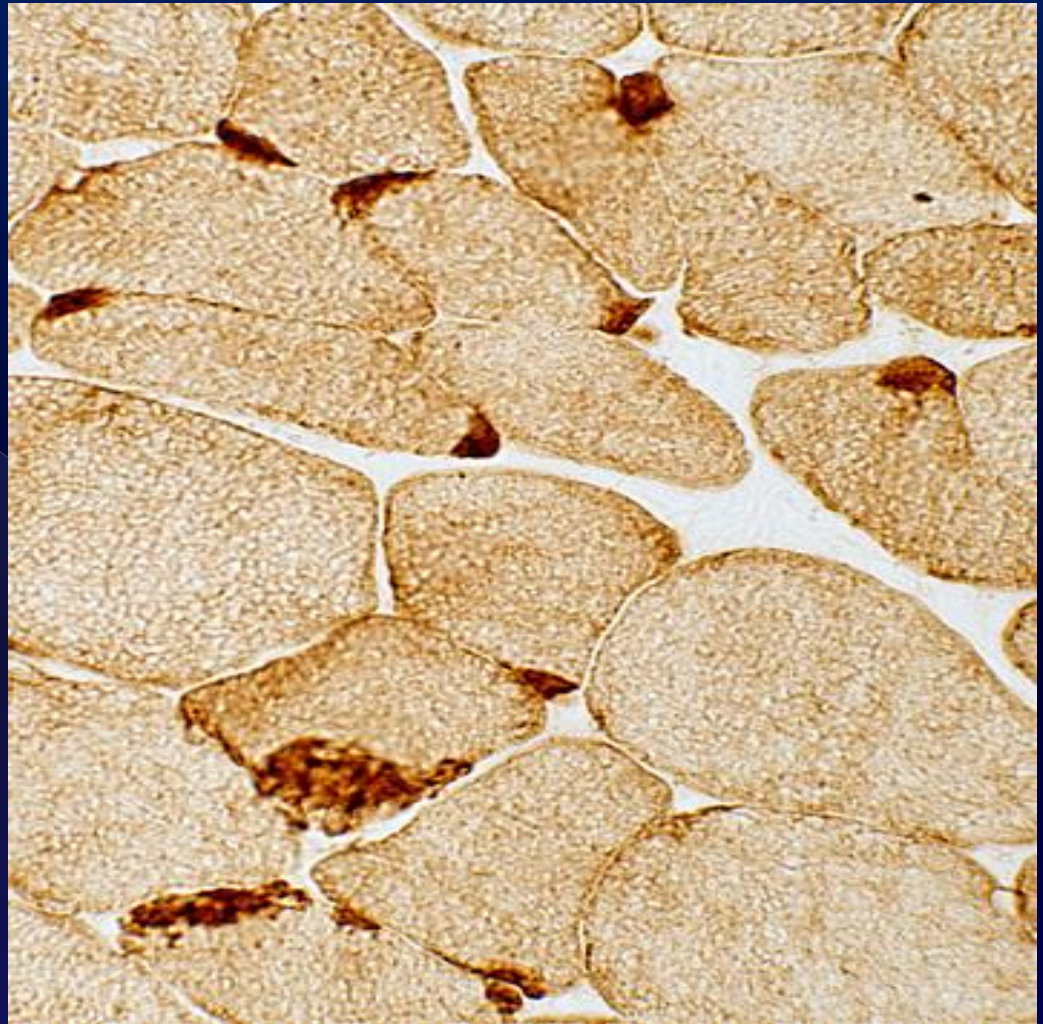
PEROKSYDAZA

SUBSTRAT H_2O_2

Dwuaminobenzzydina
(DAB)

(chromogen, donor
wodoru)

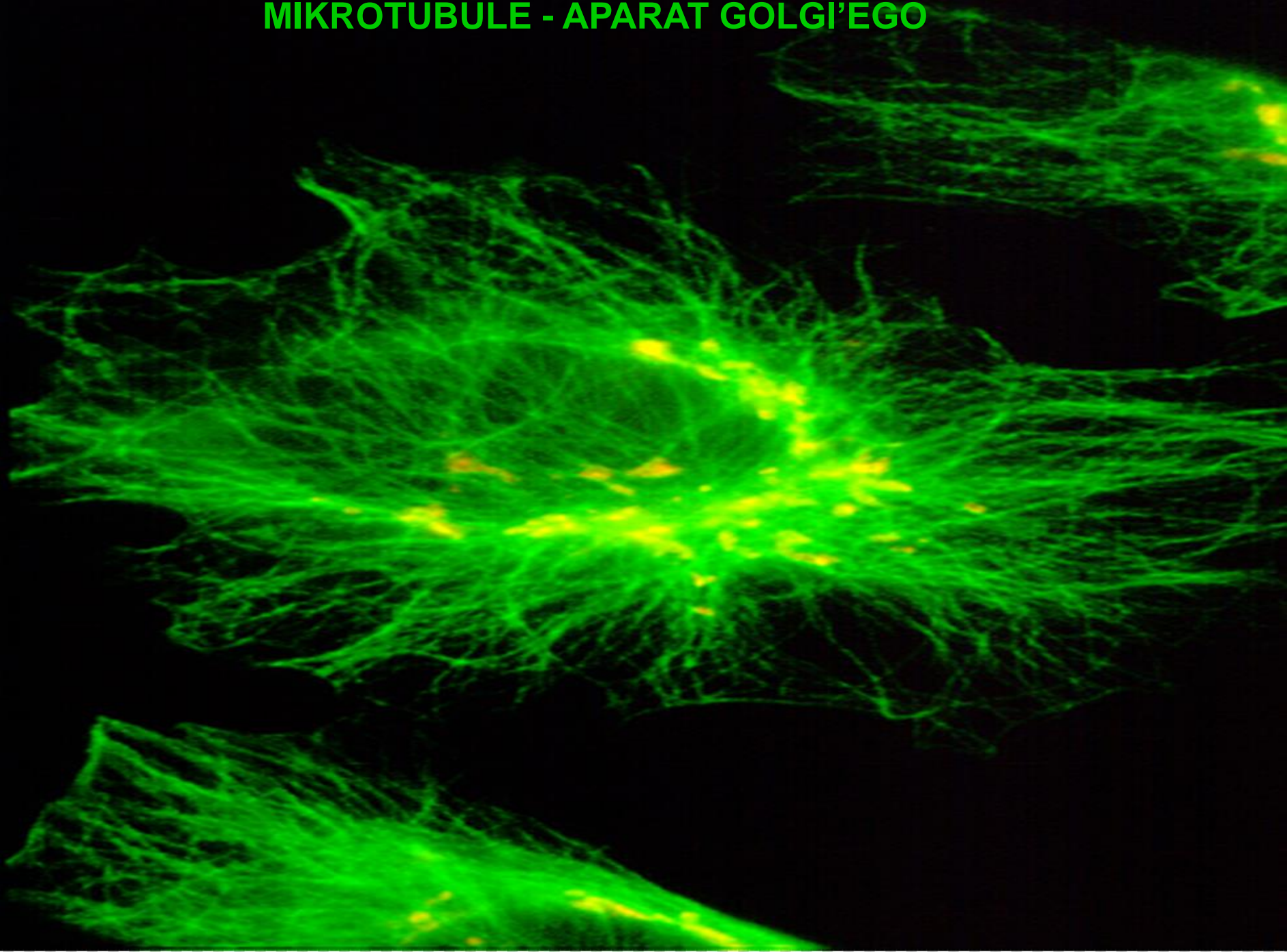
Utlenienie



BRUNATNY STRĄT

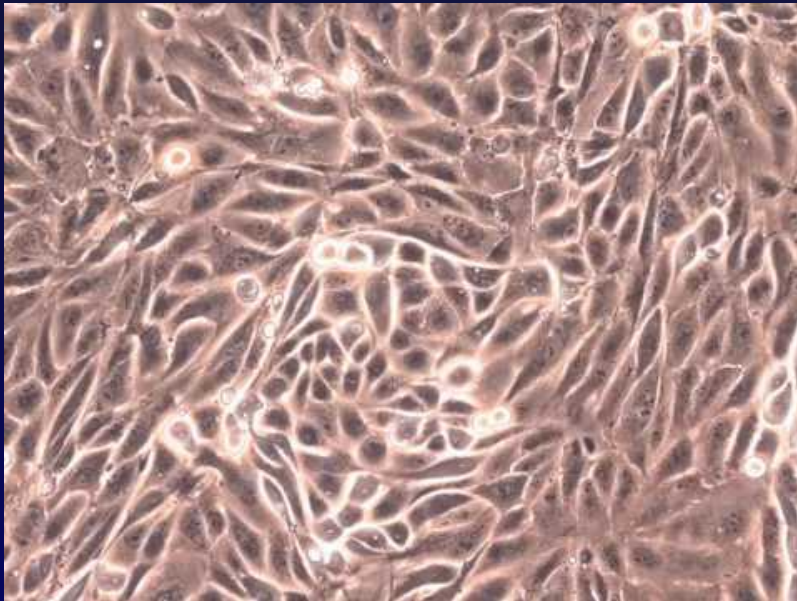
Wykrywanie desminy w komórkach
mięśni szkieletowych

MIKROTUBULE - APARAT GOLGI'EGO



Co jeszcze możemy zbadać?

**Hodowla
komórek/tkanek**

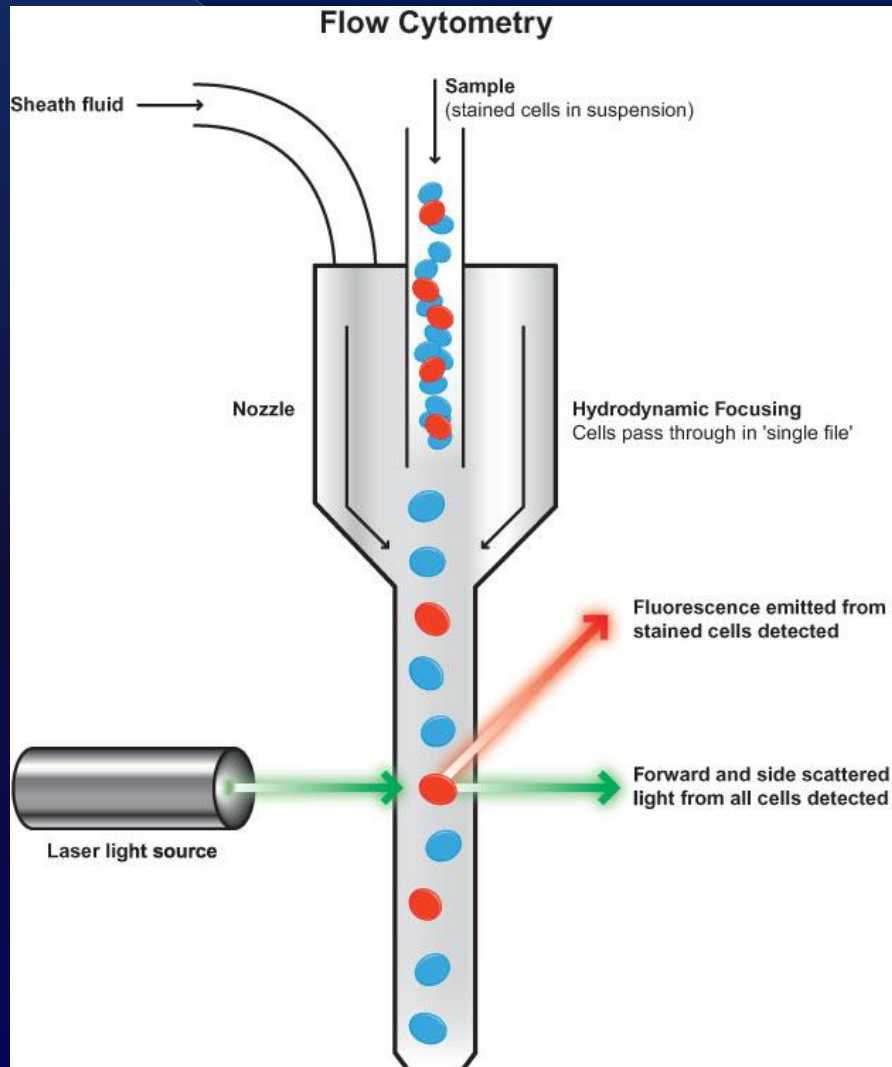


Hodowla komórek nabłonka nerki

Mikroskop odwrócony



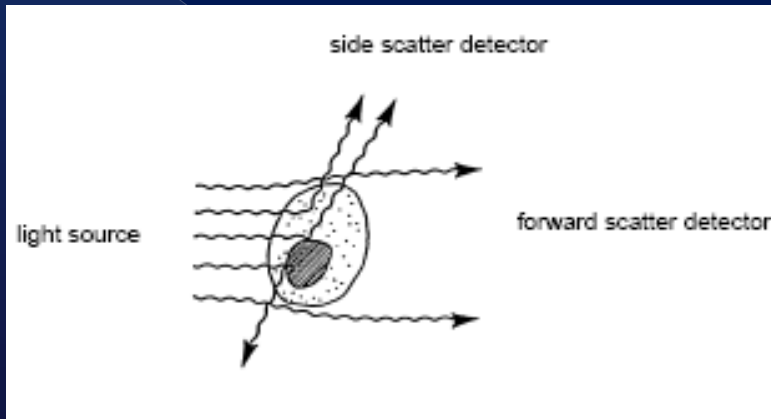
CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA



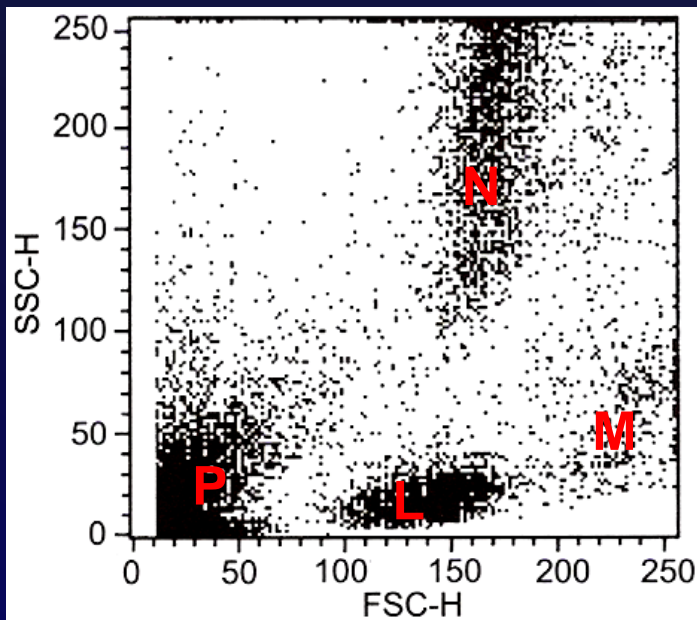
Cytometr przepływowy jest wyposażony w system pomiarowy, system optyczny (lampy, lasery), system detekcji sygnału oraz oprogramowanie umożliwiające przekształcenie ugięcia promienia światła forward-scattered light (**FSC**) i jego rozproszenia side scattered light (**SSC**), a także sygnału z fluorescencji w impulsy elektryczne.

Komórki pojedynczo przechodzą przez wiązkę światła lasera

CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA



FSC – Forward-scattered light (ugięcie wiązki) jest proporcjonalne do rozmiaru i pola powierzchni komórki.

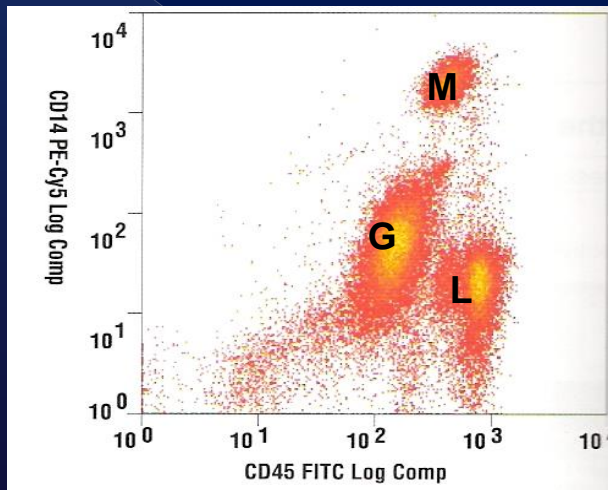


Ludzkie leukocyty krwi obwodowej
FSC/SSC.

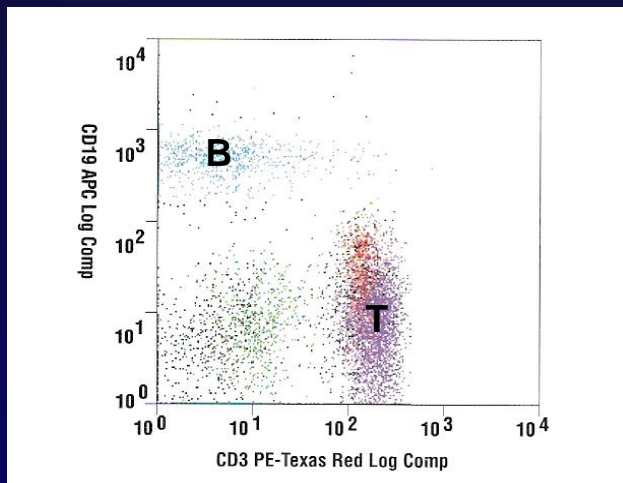
SSC - Side-scattered light (rozproszenie) jest proporcjonalne do ilości ziarnistości, pęcherzyków i komplikacji układu błon wewnątrzkomórkowych.

CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA

Leukocyty krwi obwodowej

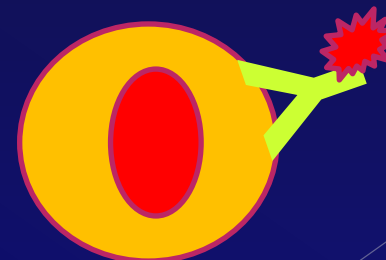


Anty-CD45 i anty-CD14.



Anty-CD3 i anty-CD19.

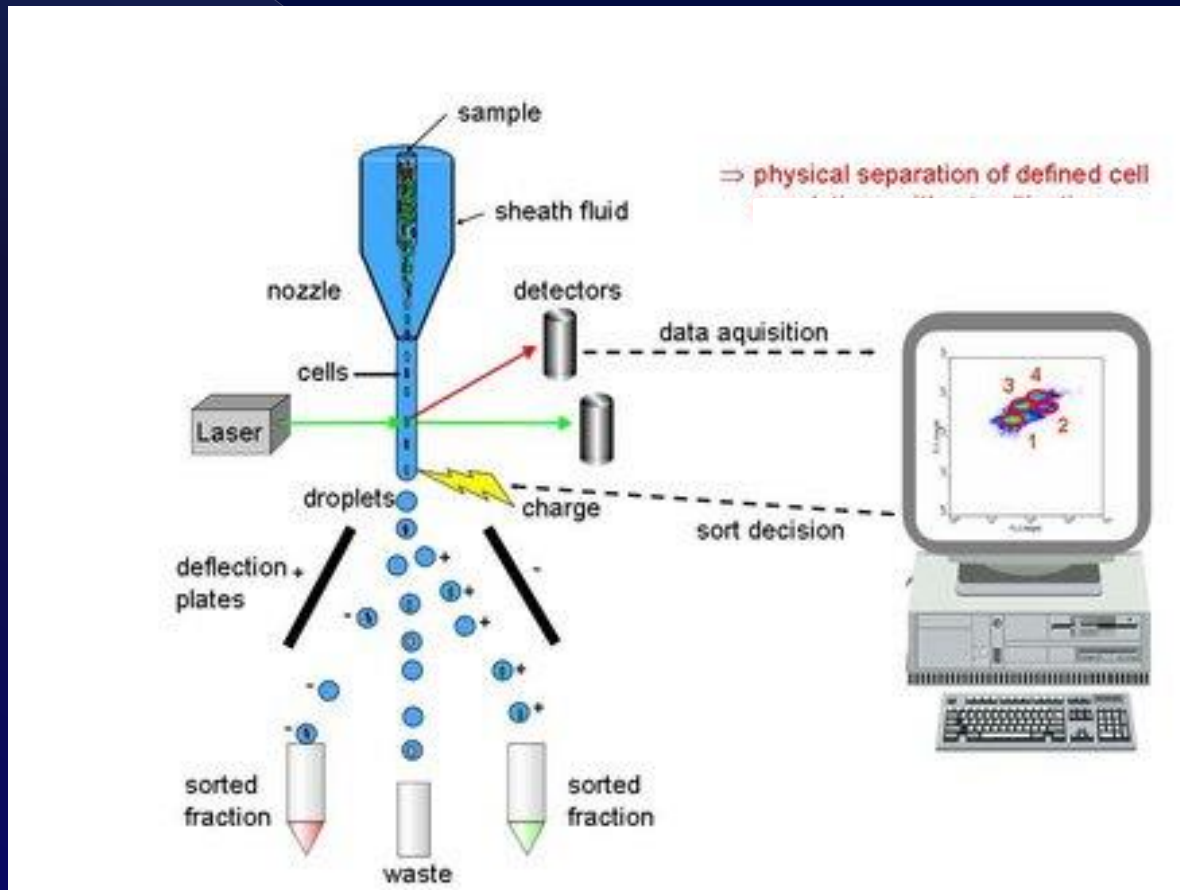
Sprzęgnięte z barwnikiem fluorescencyjnym przeciwciała są stosowane do identyfikacji poszczególnych komórek w zależności od ich markerów powierzchniowych. Można użyć jednocześnie kilku fluorochromów. Wybarwienie różnych komórek wraz z FSC i SSC tworzy wzór danej subpopulacji.



Przeciwciało
znakowane
fluorochromem

SORTOWANIE KOMÓREK

Umożliwia wychwytywanie i kolekcjonowanie komórek dla dalszej analizy (mikroskopowej, biochemicznej lub funkcjonalnej)



ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ

DIAGNOSTYKA:

- chorób rozrostowych układu chłonnego i krwiotwórczego
- wrodzonych i nabytych niedoborów odporności
- chorób autoimmunizacyjnych
- analiza komórek przeznaczonych do przeszczepów szpiku

MONITOROWANIE:

- przebiegu leczenia białaczek
- stanu układu odpornościowego pacjentów z HIV
- leczenia immunosupresyjnego u pacjentów po przeszczepach

Co jeszcze można zbadać?

Zawartość komórek

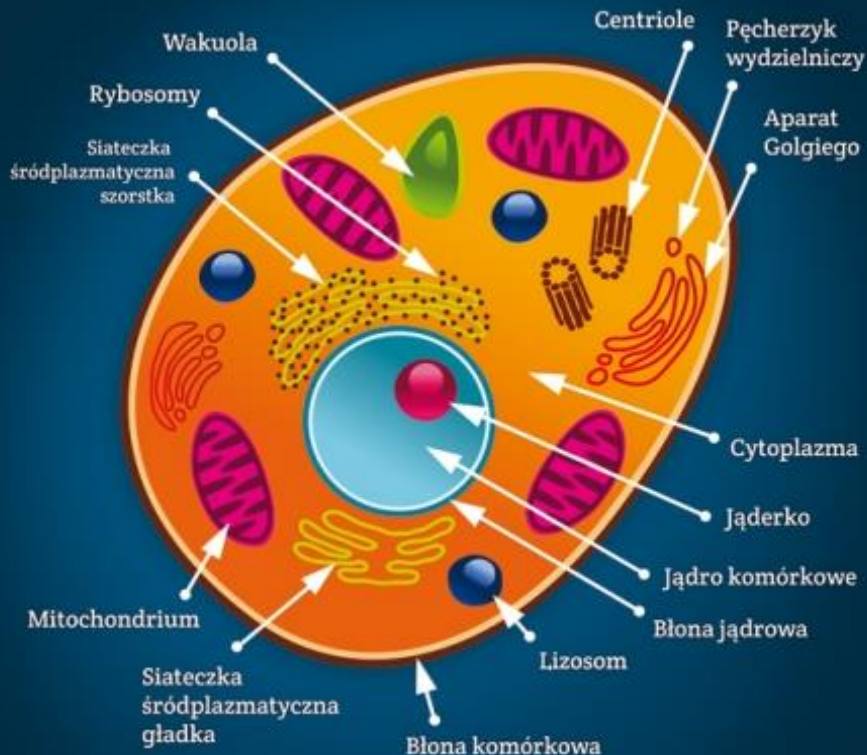
Organelle

Białka

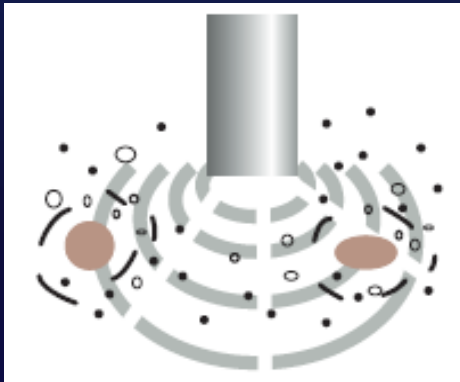
Sacharydy

Kwasy nukleinowe

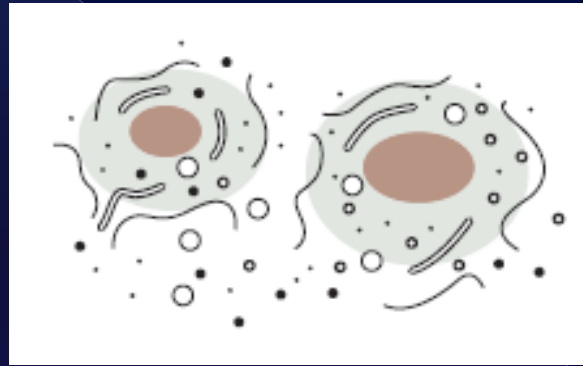
Lipidy



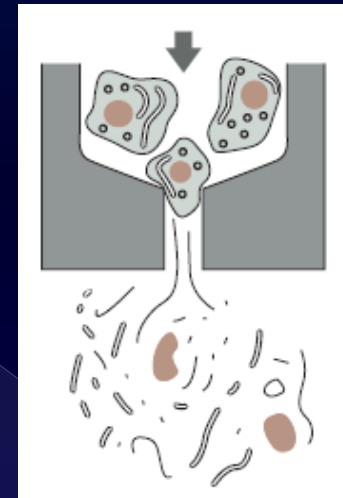
Izolacja materiału



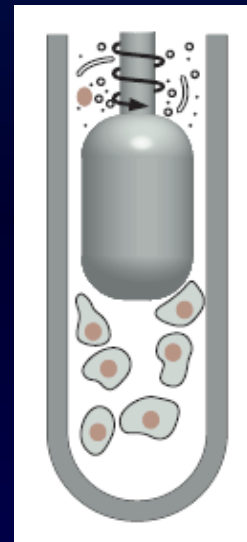
Rozbijanie komórek ultradźwiękami



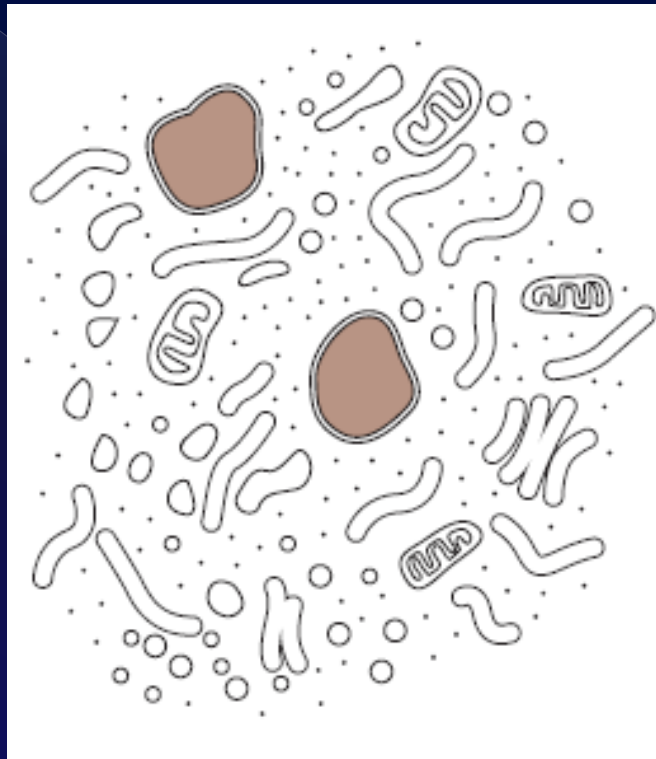
Niszczzenie błon komórkowych detergentami



Mechaniczne rozbijanie komórek



Izolacja materiału

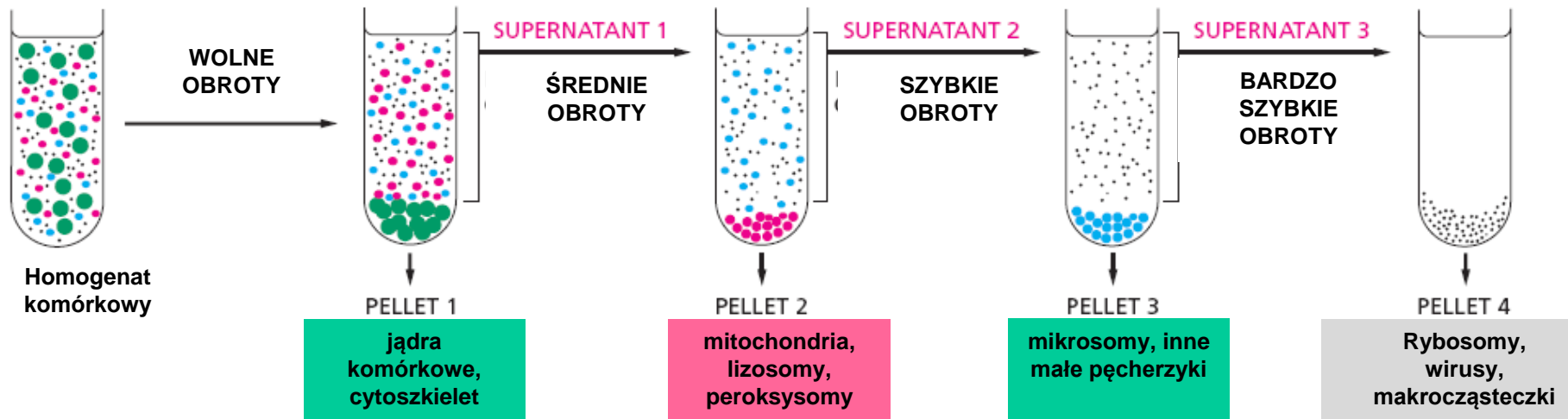


Homogenat z komórek

Frakcjonowanie

Wirowanie frakcjonujące

różnice w rozmiarze i gęstości: struktury o większym rozmiarze i gęstości tworzą peletki przy działaniu mniejszej siły odśrodkowej.



WESTERN BLOT

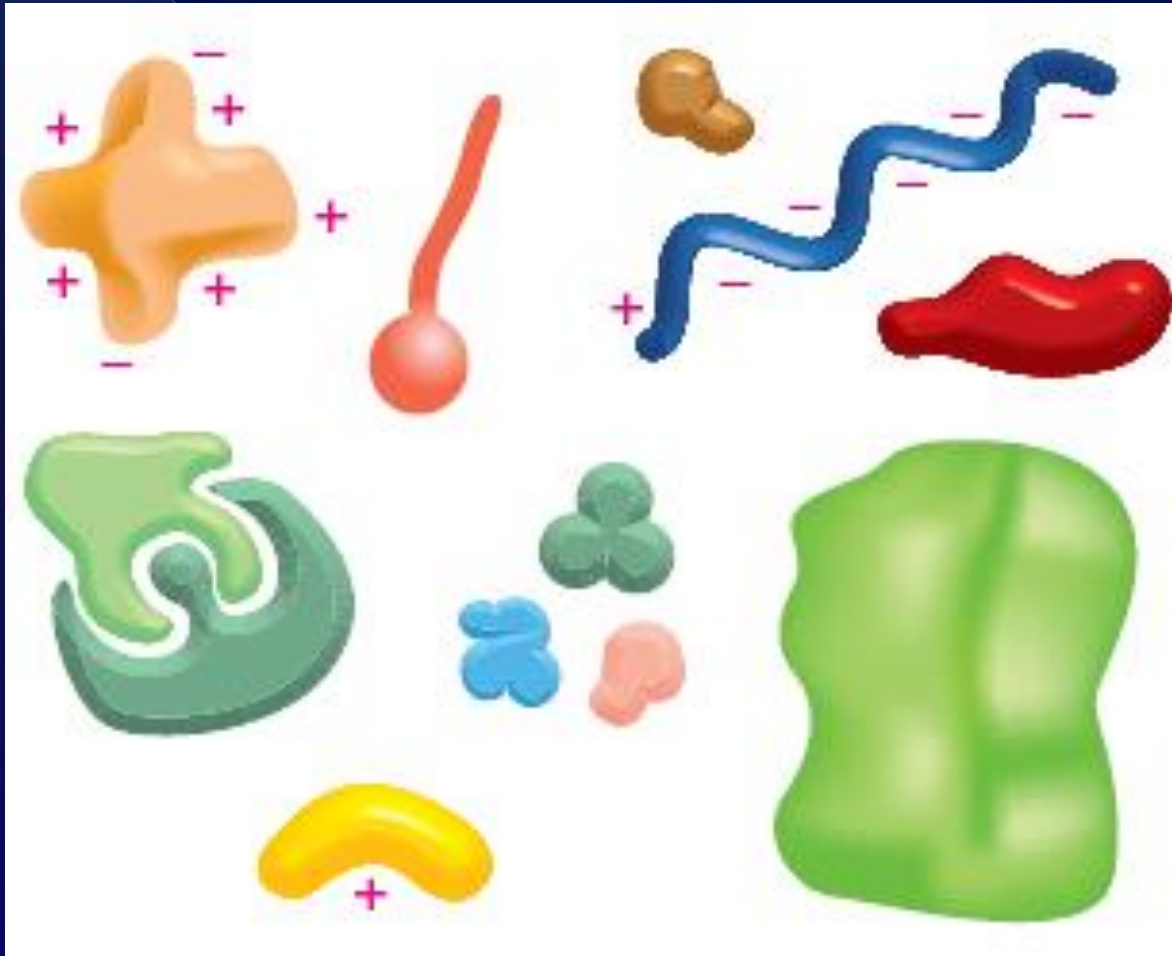
Metoda wykrywania białek w homogenatach tkankowych, ekstraktach komórkowych lub płynach ustrojowych.



W. Neal Burnette – amerykański biochemik, opublikował pracę, w której opisał technikę nazwaną przez niego Western blotting (1981)

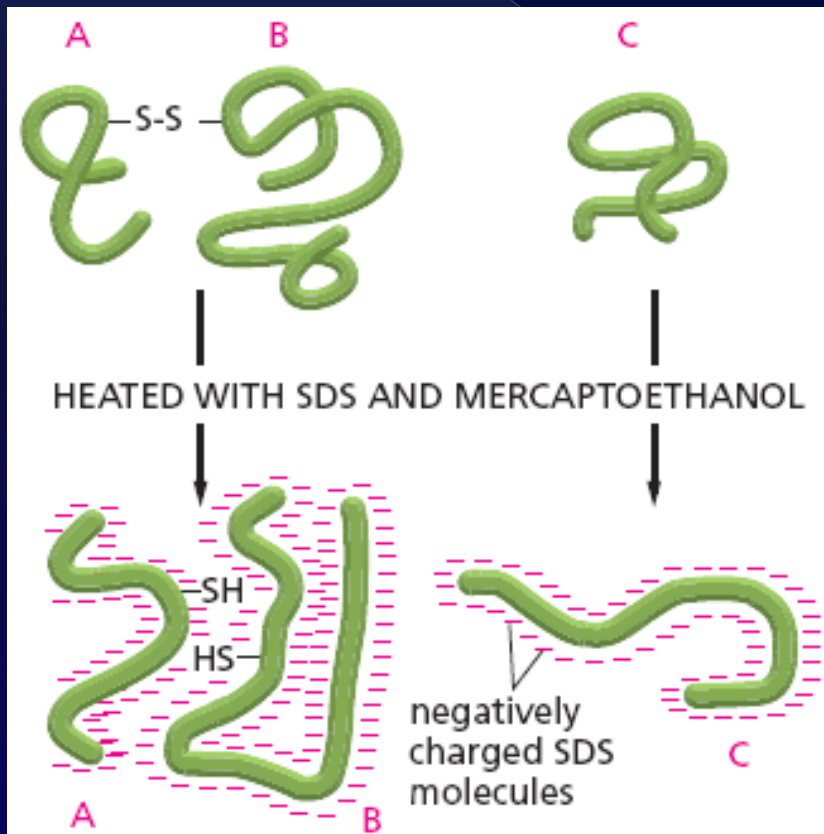
ANALIZA BIAŁEK

Rozdzielanie i wykrywanie



ANALIZA BIAŁEK

Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecylu sodu (SDS-PAGE).

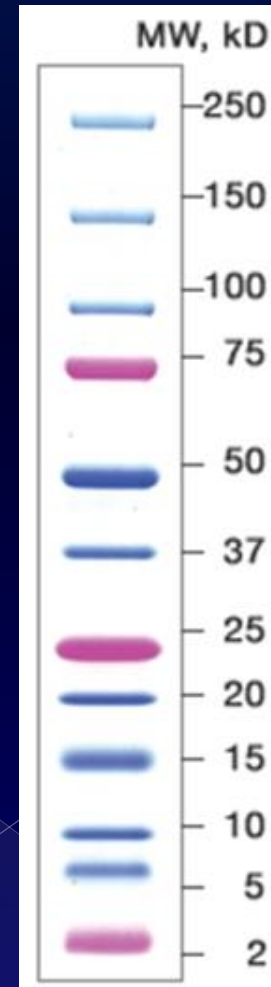
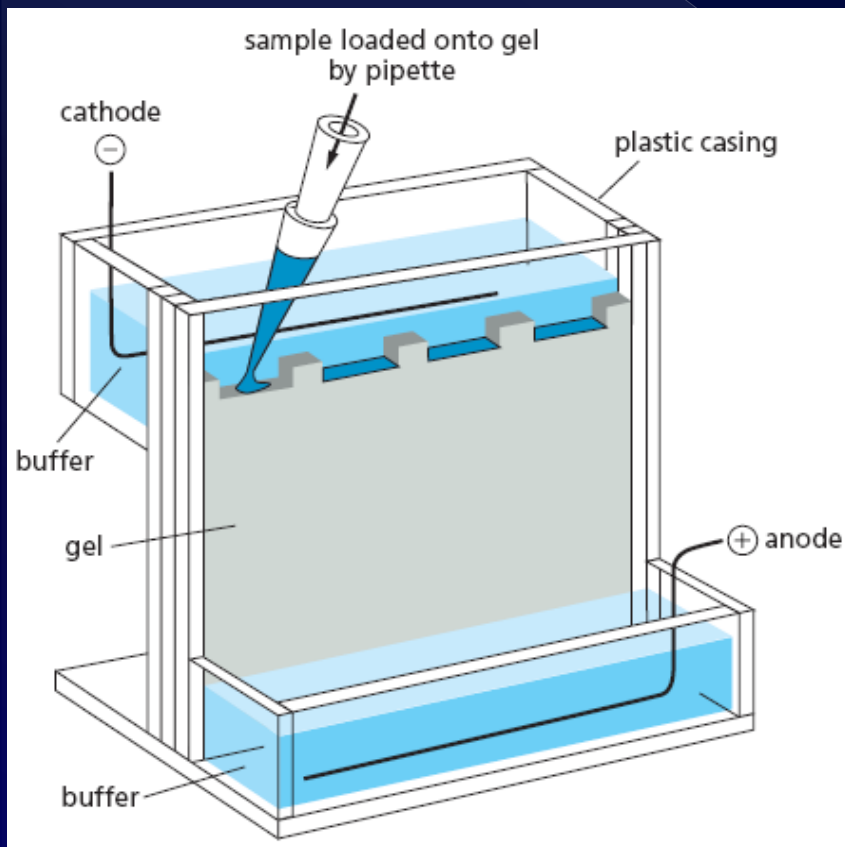


Białka w próbce są ogrzewane z ujemnie naładowanym detergentem SDS (anionowy surfaktant), który je opłascza, nadaje im jednolitej gęstości ładunek ujemny i rozwija. Mostki dwusiarczkowe (S-S) są redukowane przez merkaptoetanol

ANALIZA BIAŁEK

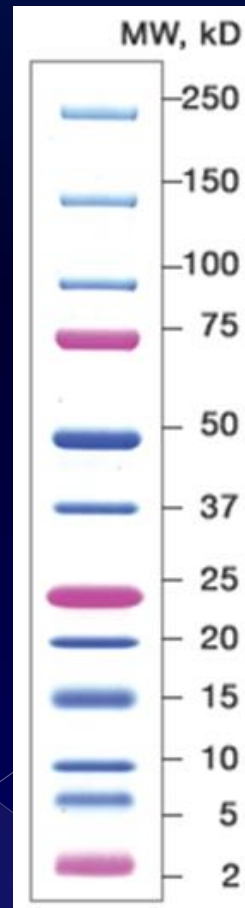
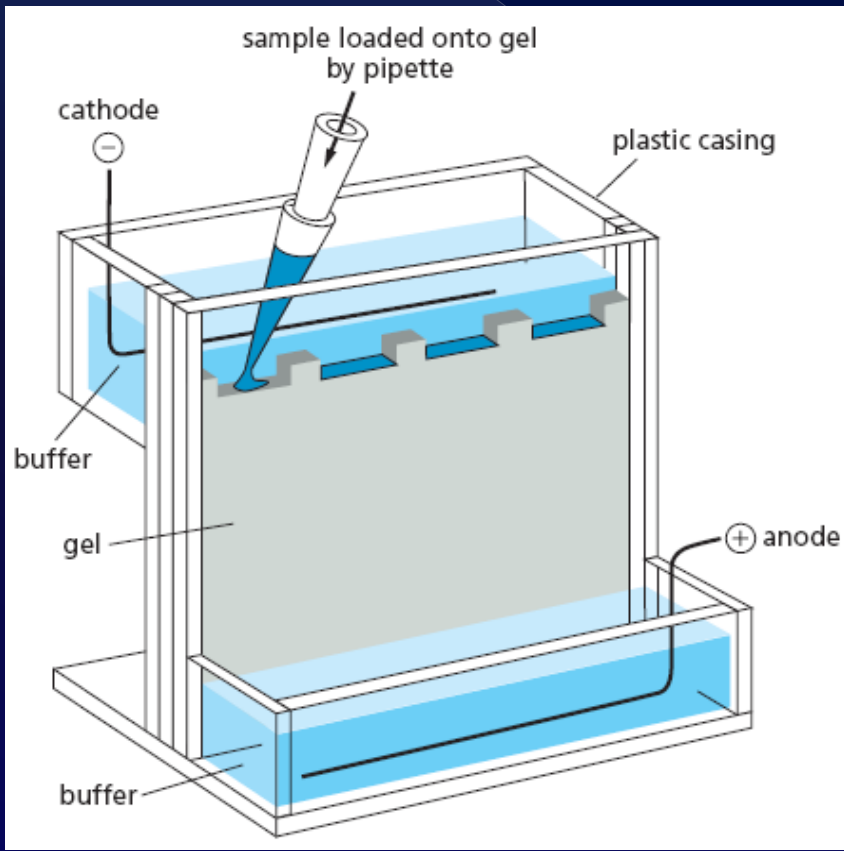
Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecyłu sodu (SDS-PAGE).

Próbkę umieszcza się w studziencie w żelu poliakrylamidowym, a następnie przykłada się pole elektryczne. Pod wpływem pola ujemnie naładowane kompleksy SDS-białka migrują w żelu w kierunku dodatniej anody. Małe białka szybciej, większe białka wolniej.



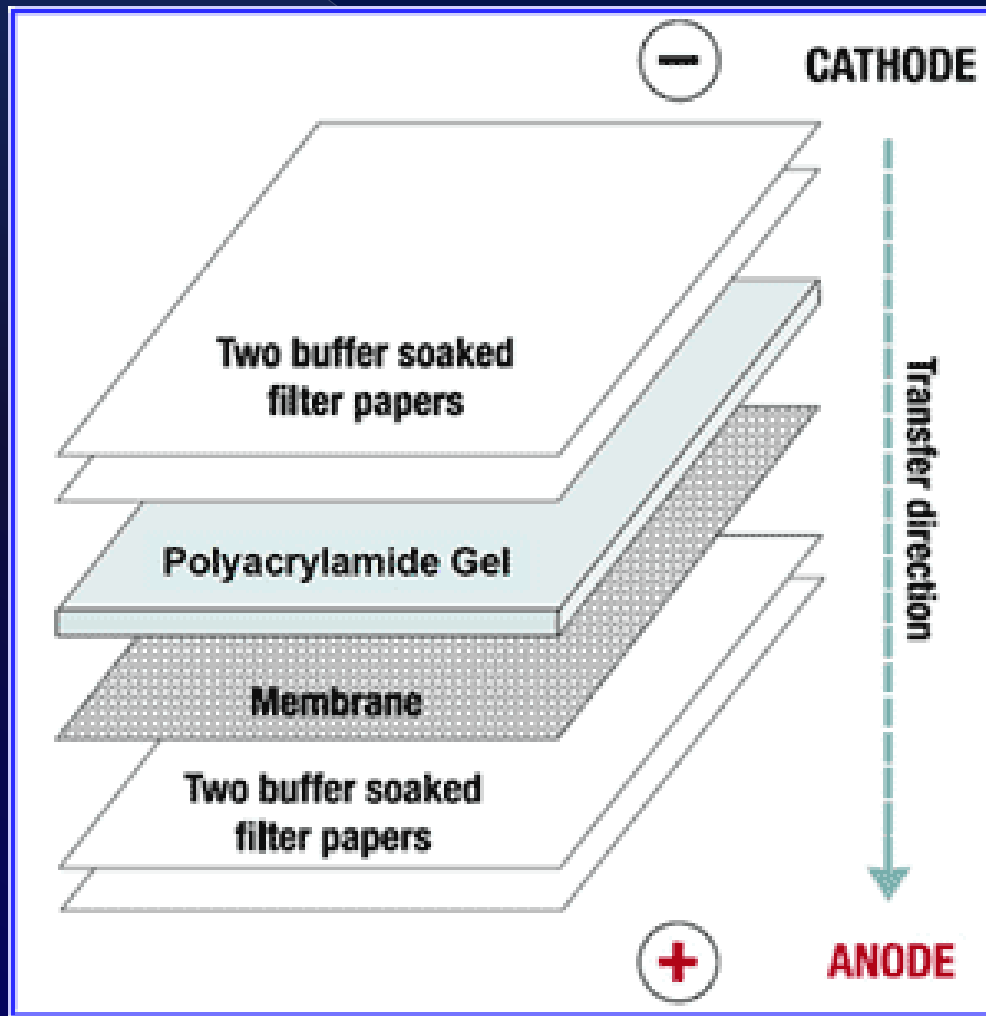
ANALIZA BIAŁEK

Elektroforeza



ANALIZA BIAŁEK

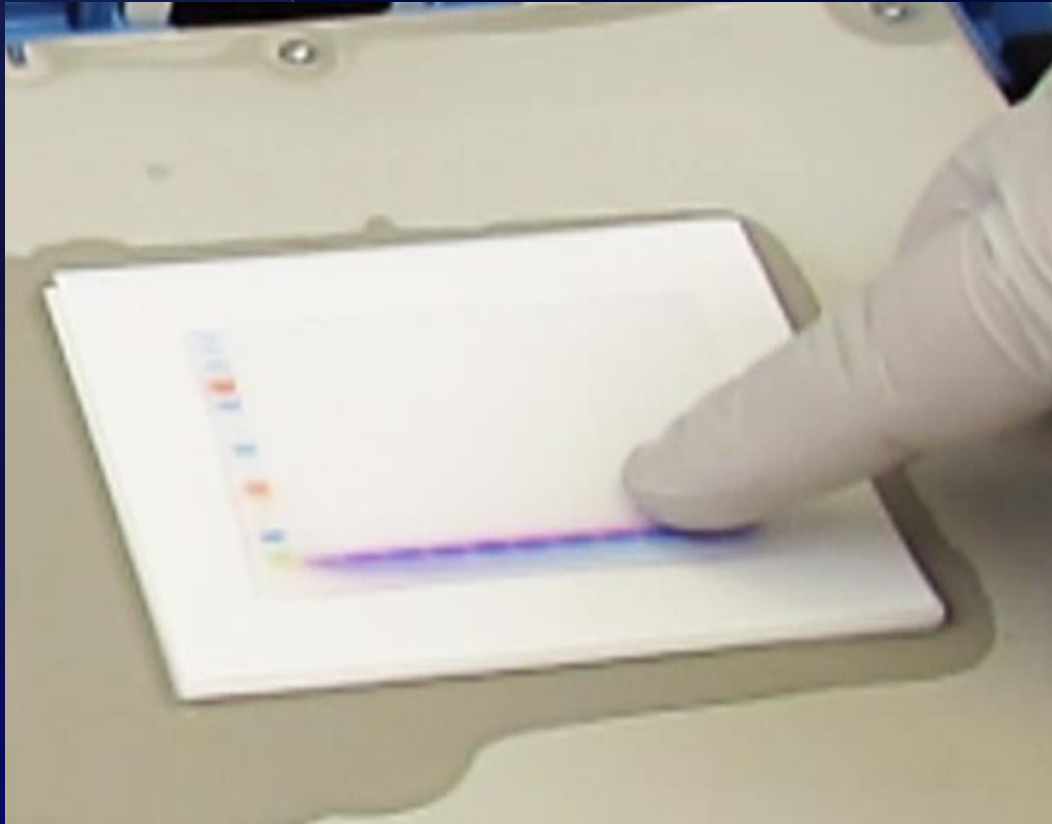
TRANSFER BIAŁEK Z ŻELU NA BŁONĘ



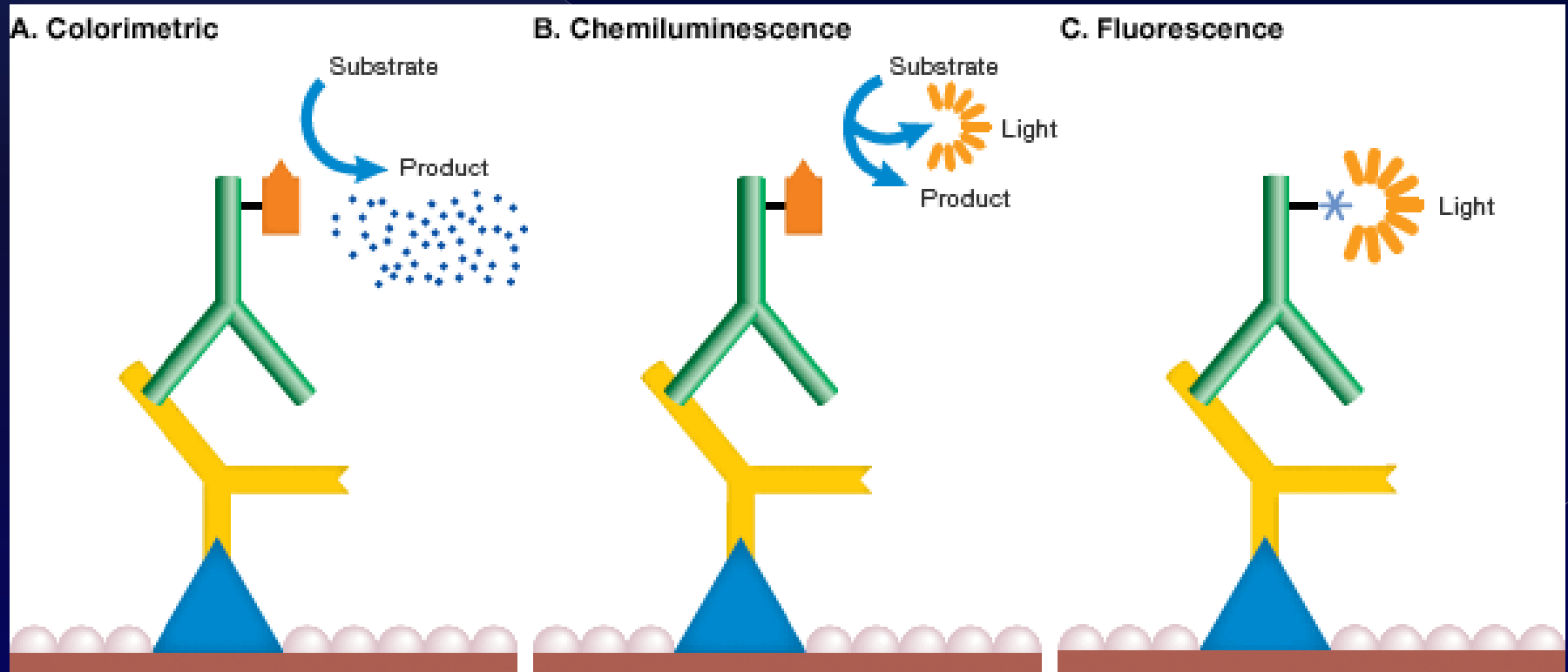
Żel z rozwiniętym zestawem białek umieszcza się następnie w urządzeniu, które umożliwia (pod wpływem pola elektrycznego) przeniesienie białek z żelu na powierzchnię specjalnych błon (np. błony nitrocelulozowej lub z polifluorku winylidenu (PVDF), która silnie adsorbuje białka.

ANALIZA BIAŁEK

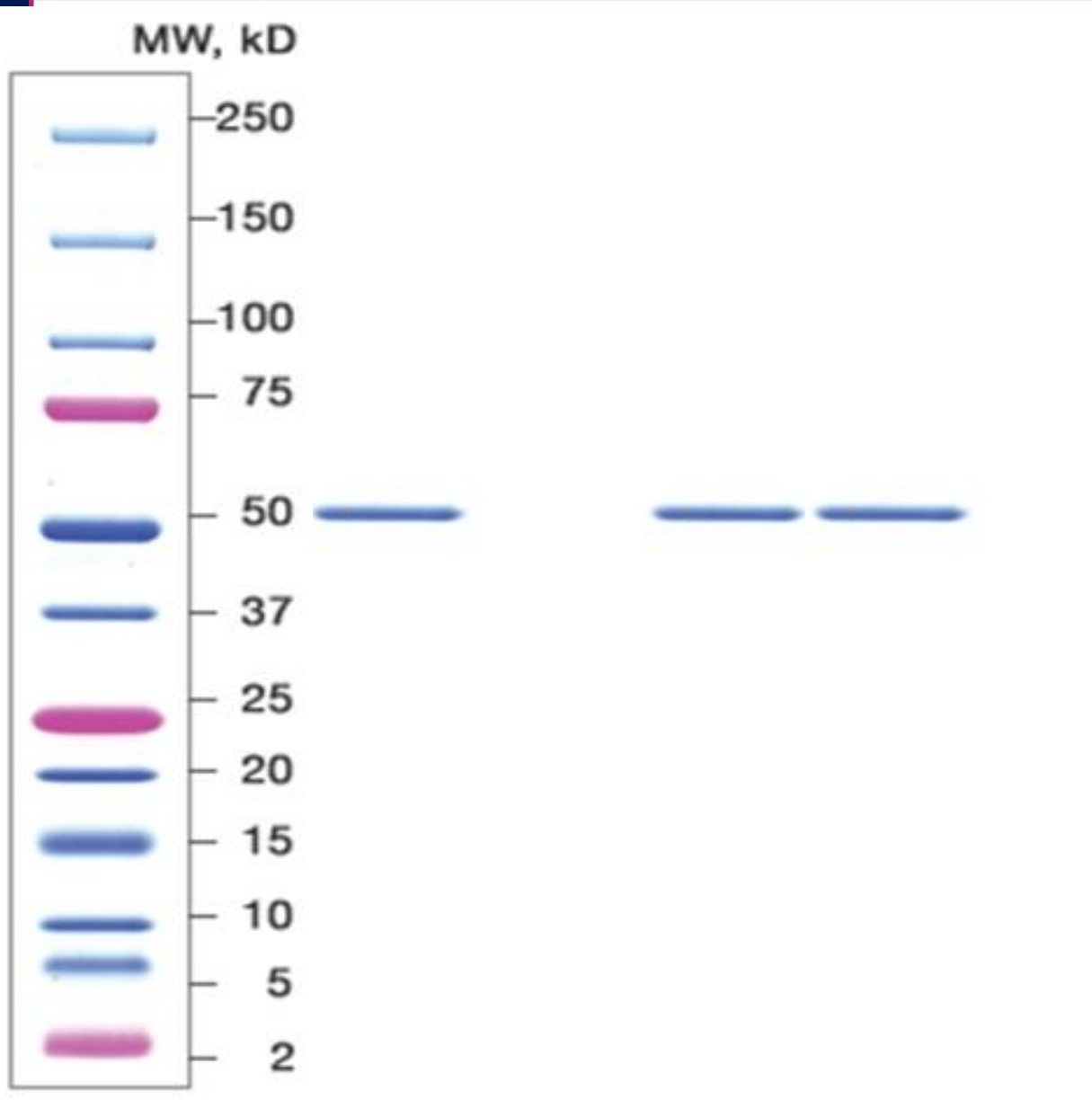
WESTERN BLOT Błona PVDF po transferze



WESTERN BLOT - RÓŻNE METODY DETEKCJI



WESTERN BLOT - WYNIK



ANALIZA BIAŁEK

ELISA - test immunoenzymatyczny, wykrywanie i ocena ilościowa białek z użyciem przeciwciał związanych z enzymem

1966 - opłaszczenie przeciwciałami lub antygenem płytki - Wide and Jerker Porath

1971 - Peter Perlmann and Eva Engvall at Stockholm University - test ELISA

Enzyme

Linked

Immunsorbent

Assay

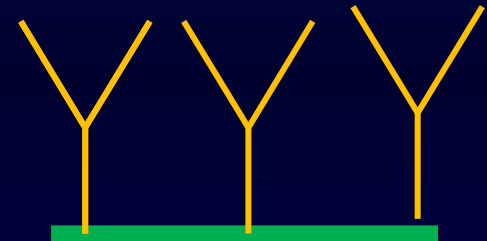
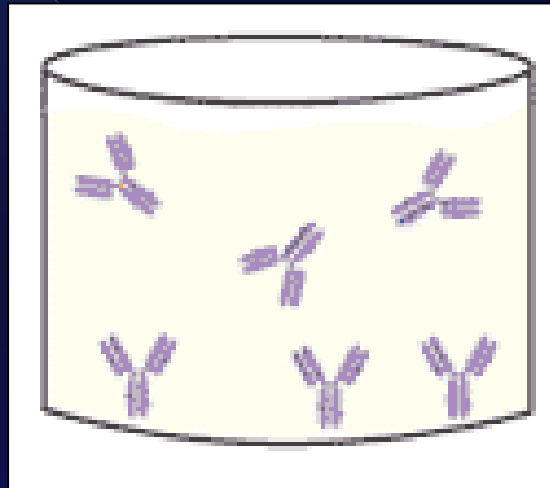


Wykrywanie i ocena ilościowa białek

ANALIZA BIAŁEK

ELISA

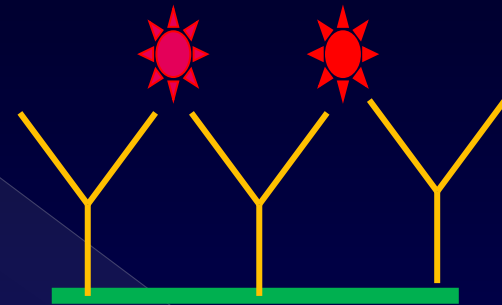
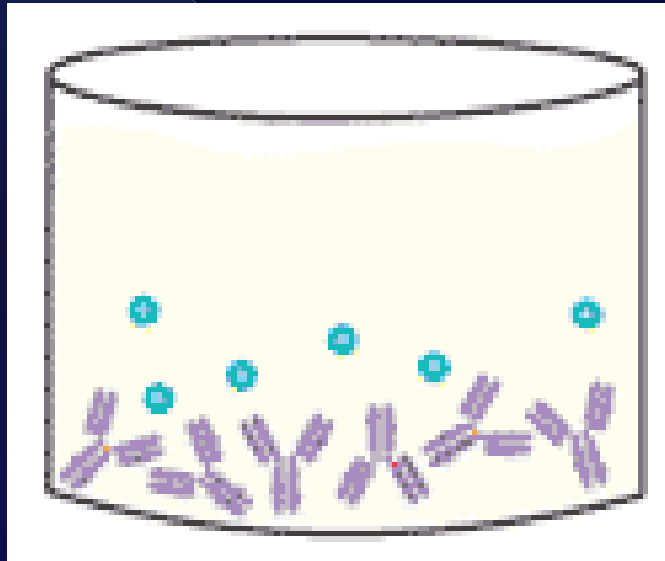
Płytki 96-studzienkowa



Dno płytki jest pokryte przeciwciałami wychwytyjącymi

ANALIZA BIAŁEK

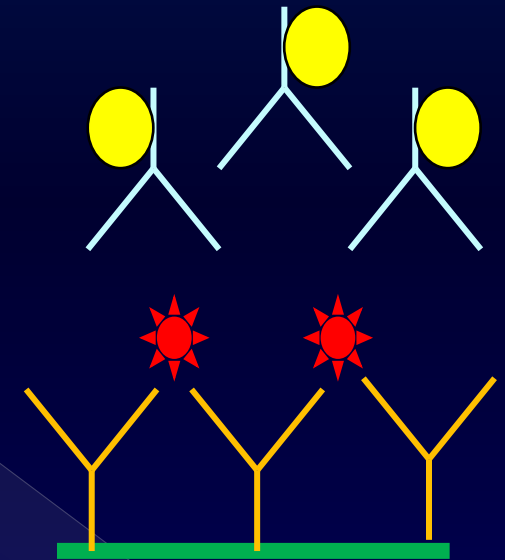
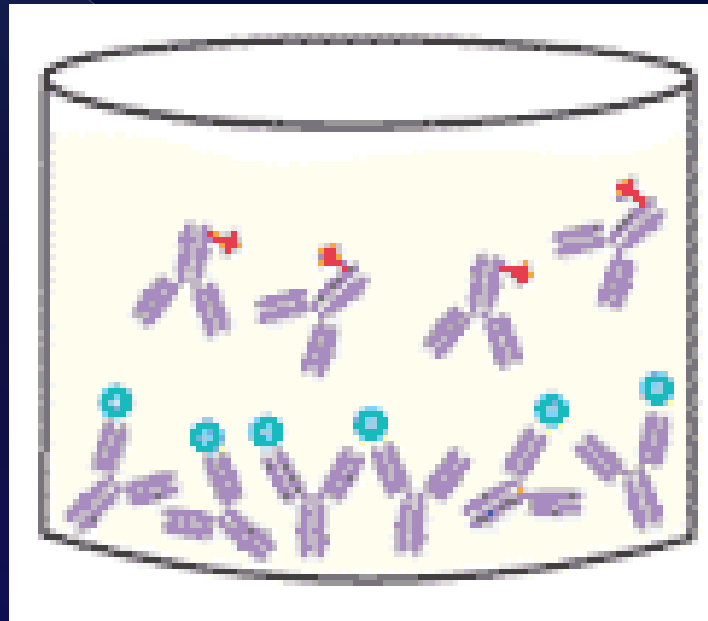
ELISA



Próbka z badanym białkiem

ANALIZA BIAŁEK

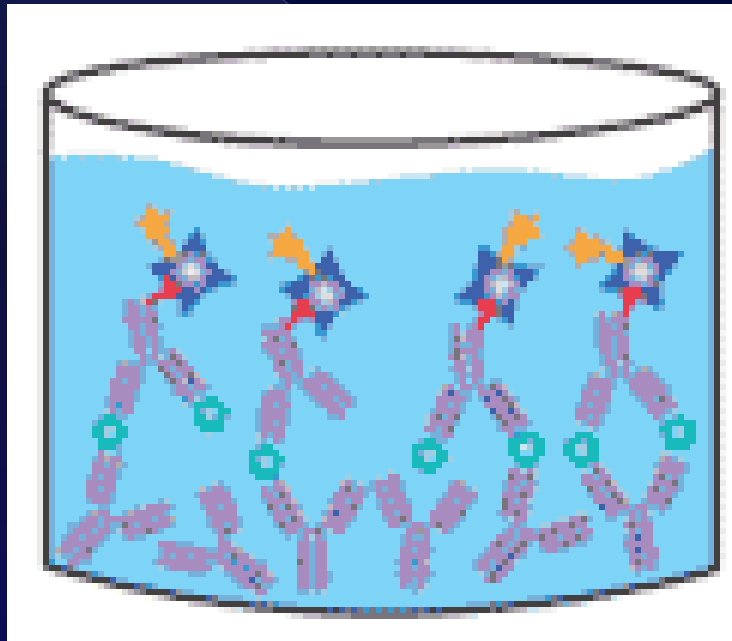
ELISA



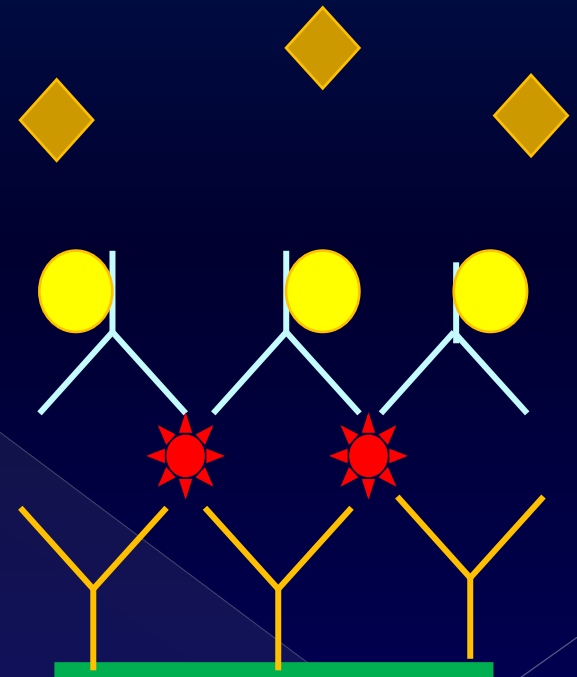
Przeciwciała sprzęgnięte z enzymem

ANALIZA BIAŁEK

ELISA

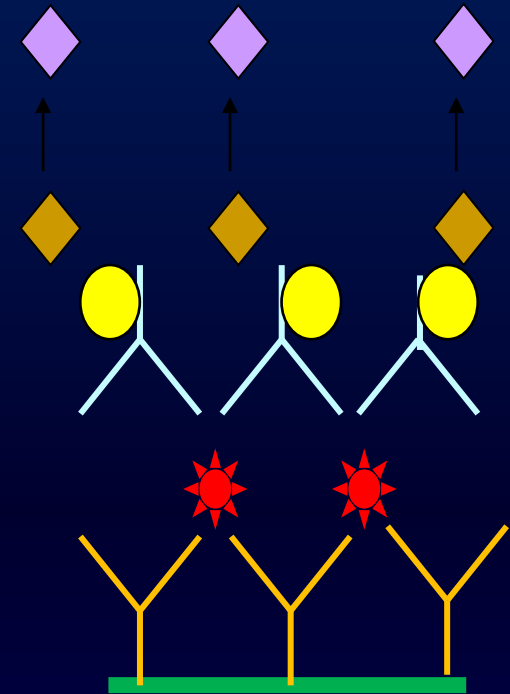
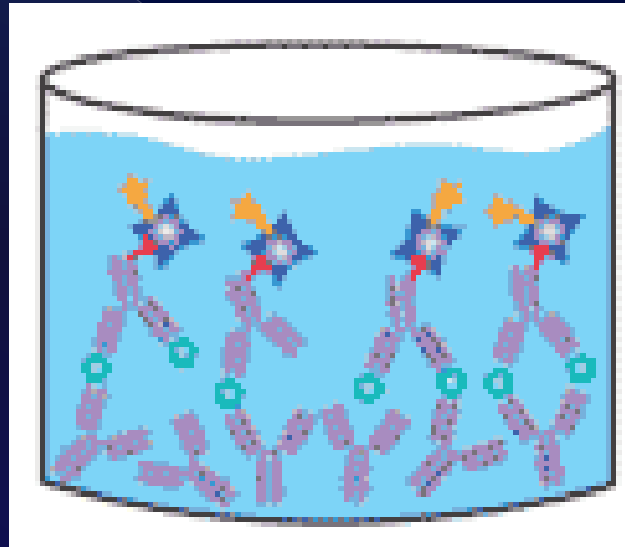


Dodanie substratu



ANALIZA BIAŁEK

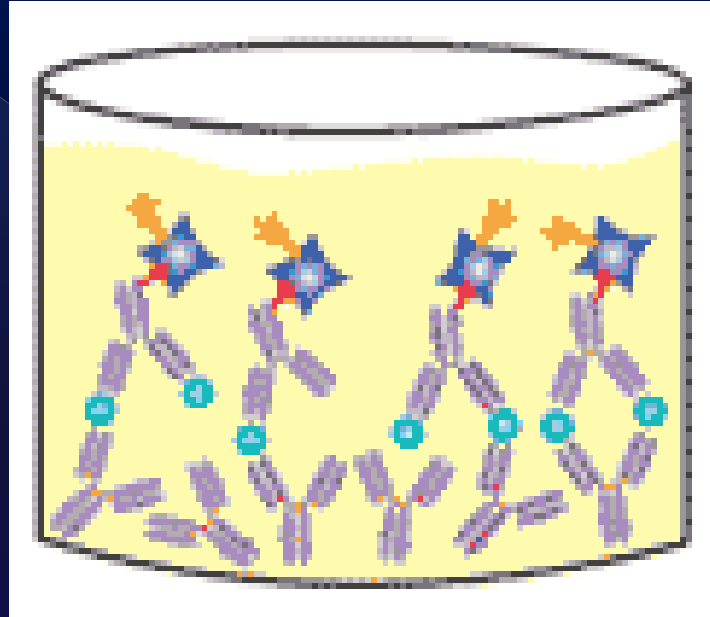
ELISA



Przekształcenie bezbarwnego substratu w barwny produkt.
Intensywność barwy zależy od ilości badanego białka.

ANALIZA BIAŁEK

ELISA



Dodanie roztworu stopującego reakcję

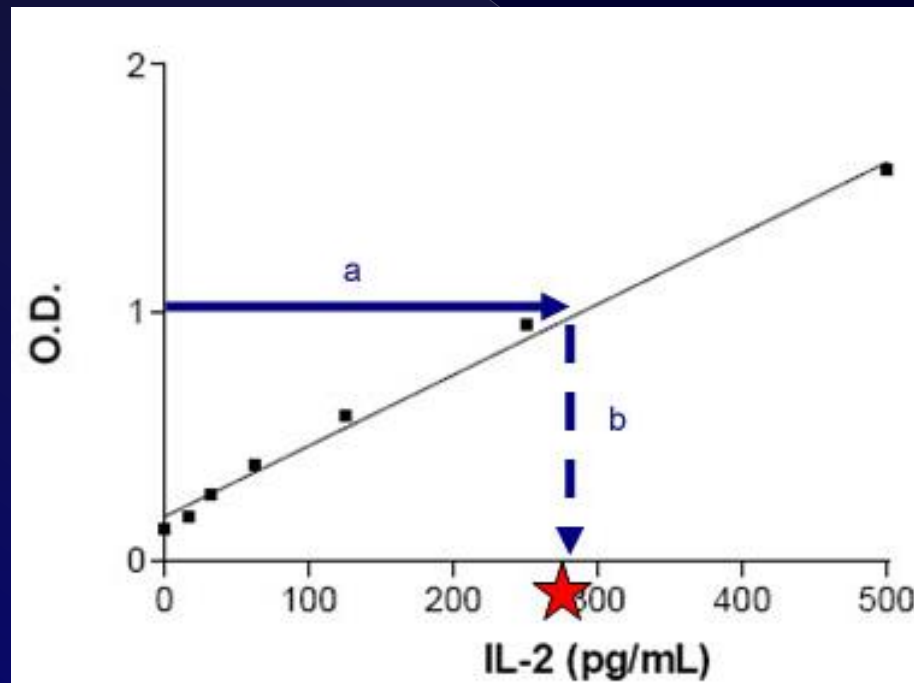
Odczyt absorbcji

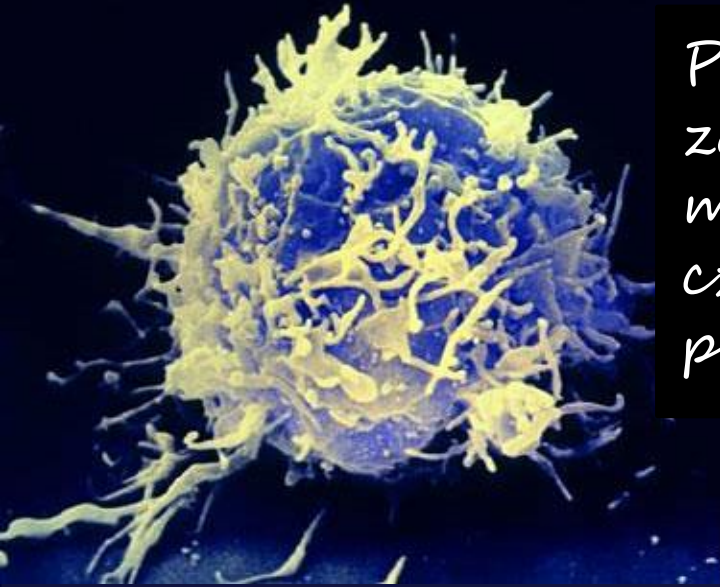
ANALIZA BIAŁEK

ELISA

Standard

Nieznane stężenie
badanego białka



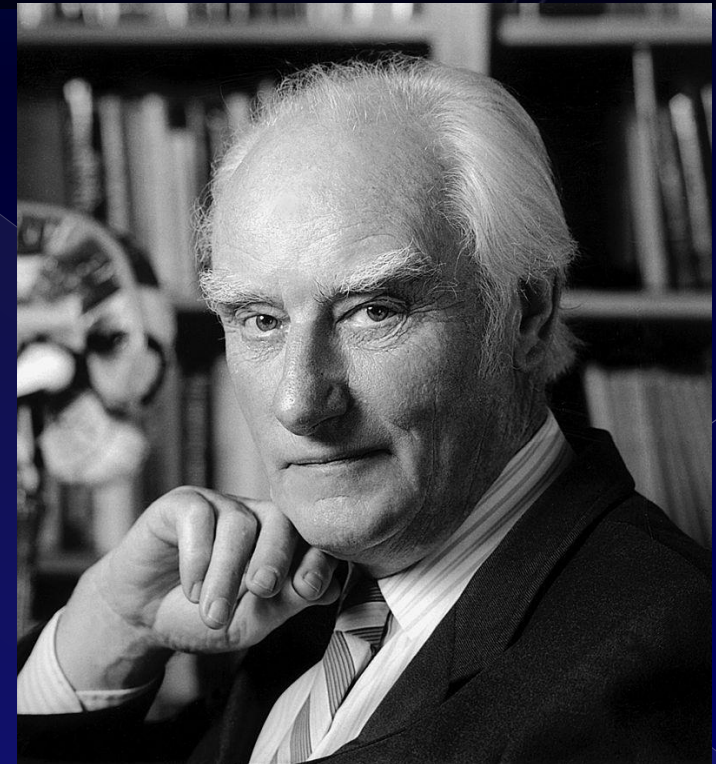


Prawie wszystkie aspekty życia są zaprojektowane na poziomie molekularnym i bez zrozumienia cząsteczek możemy mieć tylko bardzo pobieżne zrozumienie samego życia.

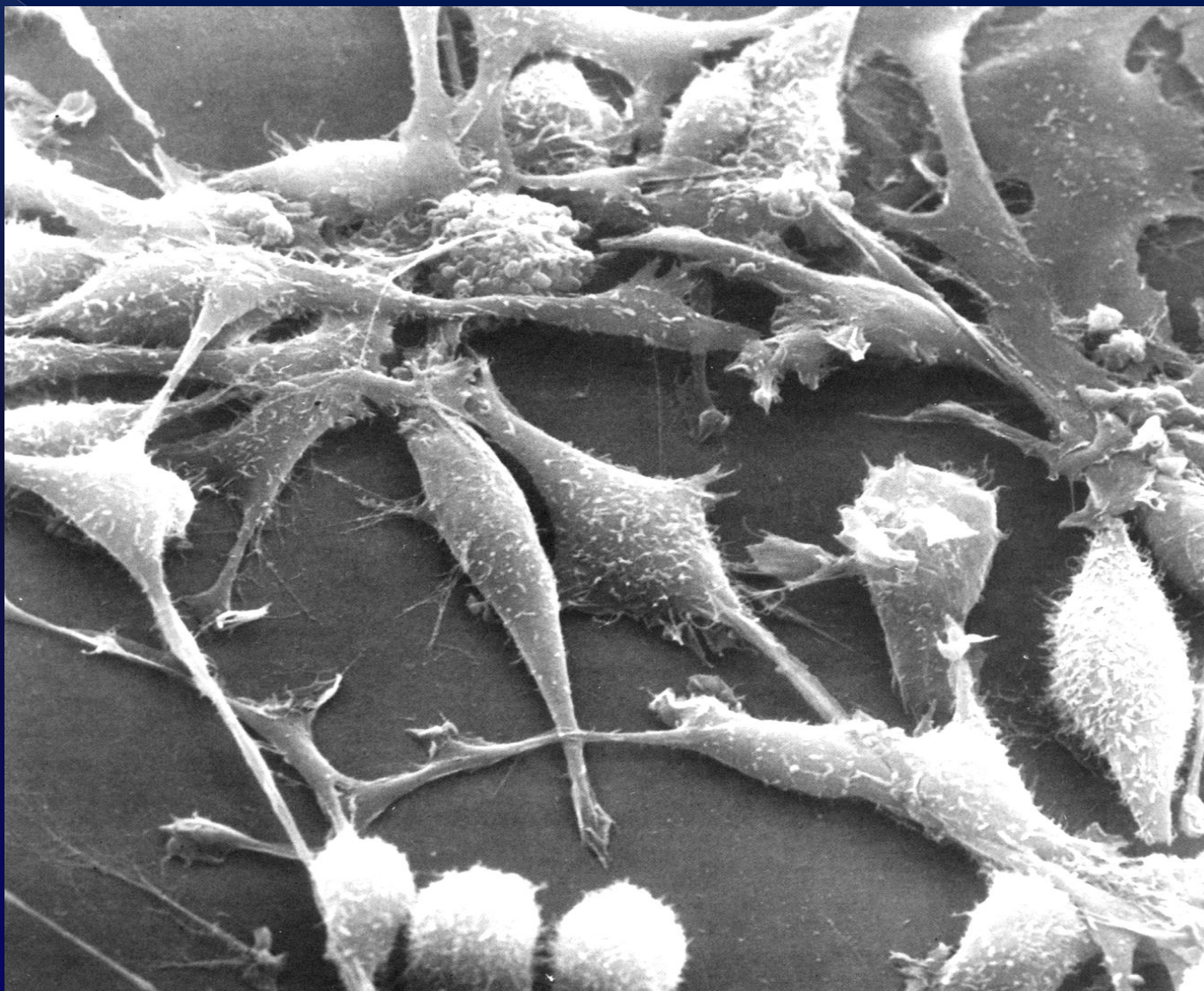
Francis Crick

University of Texas MMB35

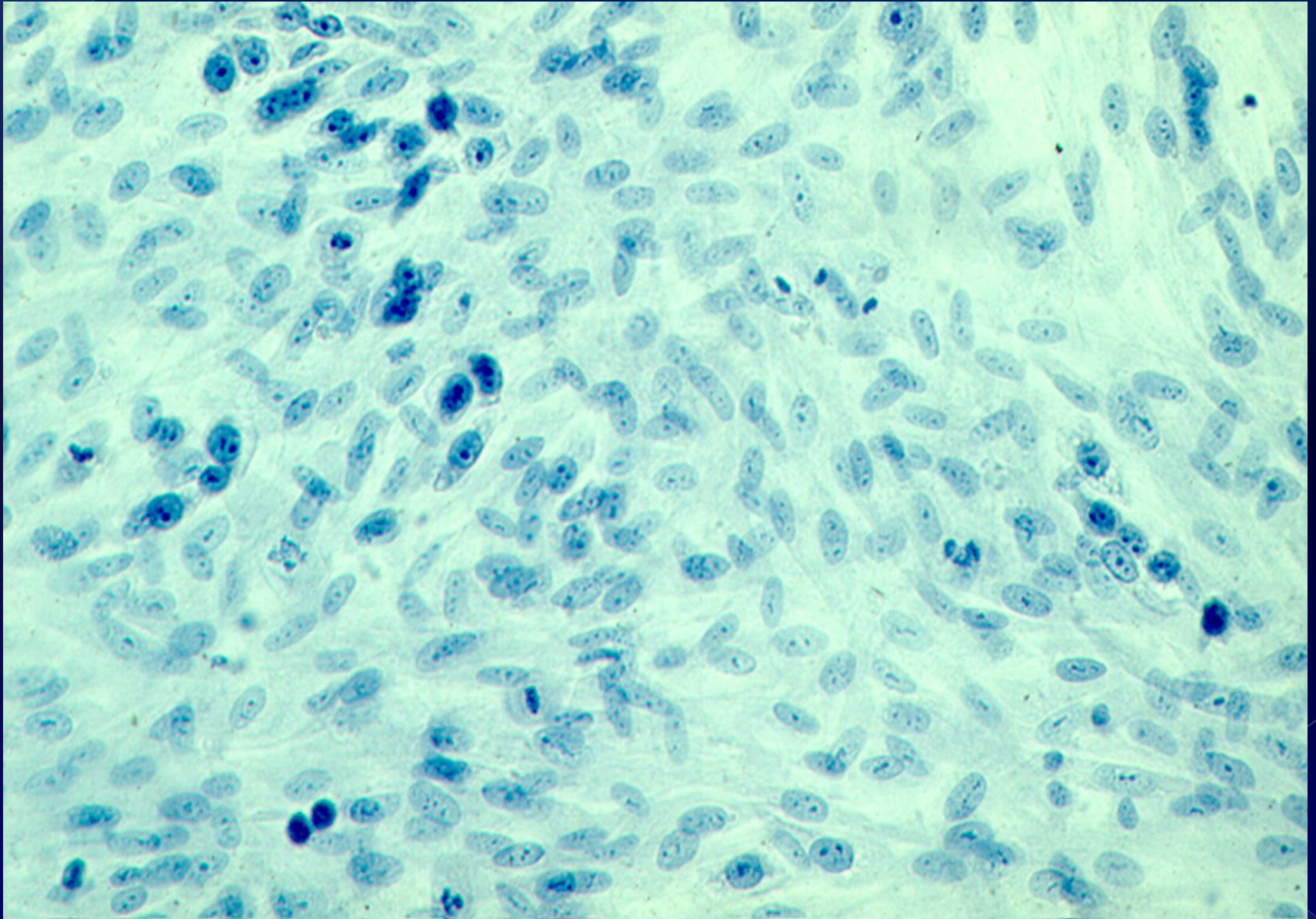
Francis Crick (1916 – 2004)
angielski biolog molekularny,
biofizyk, genetyk,
współodkrywca struktury
molekularnej DNA wraz z
Jamesem Watsonem w 1953
roku (Nagroda Nobla w 1962).



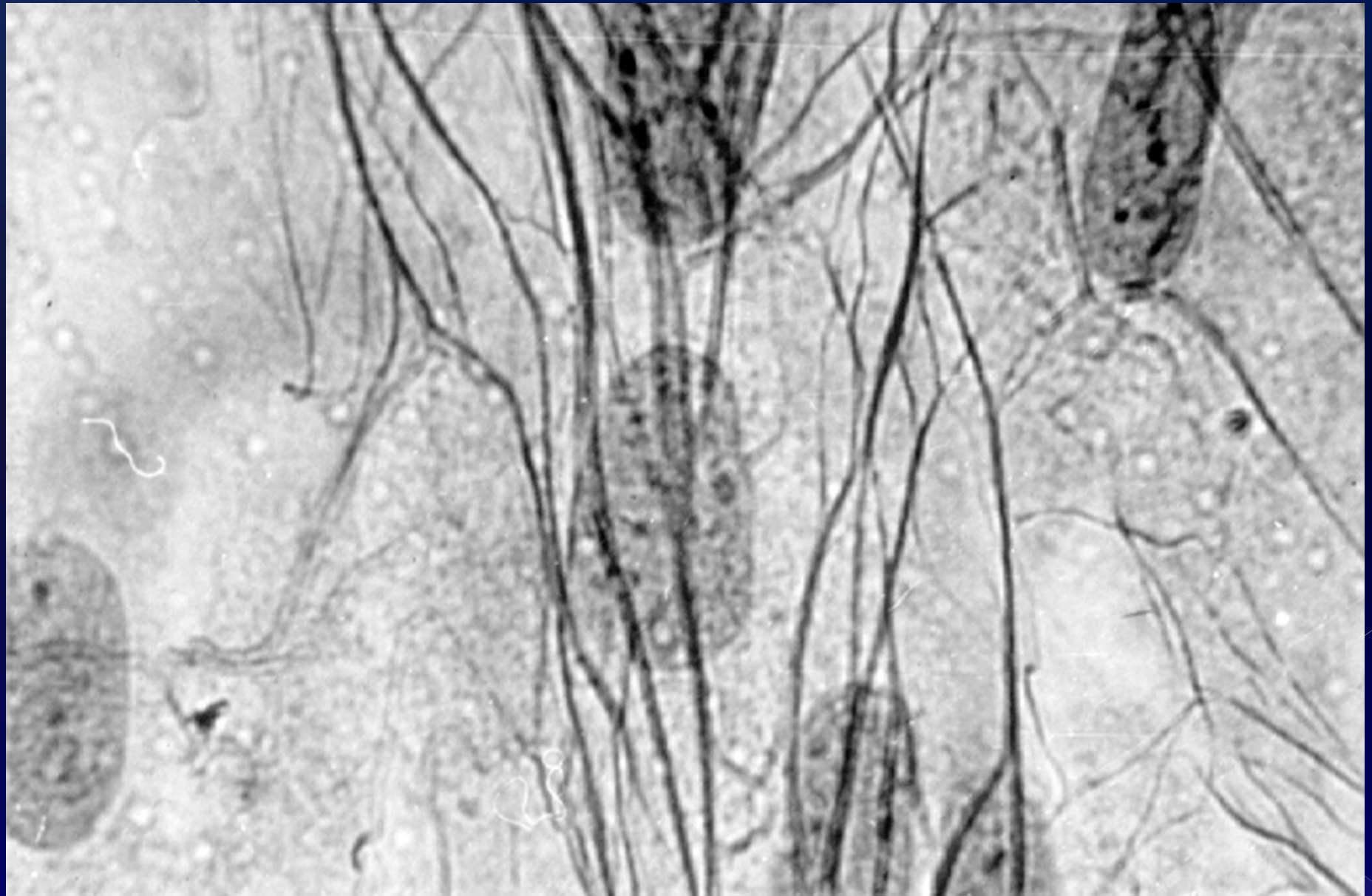
FIBROBLASTY W HODOWLI



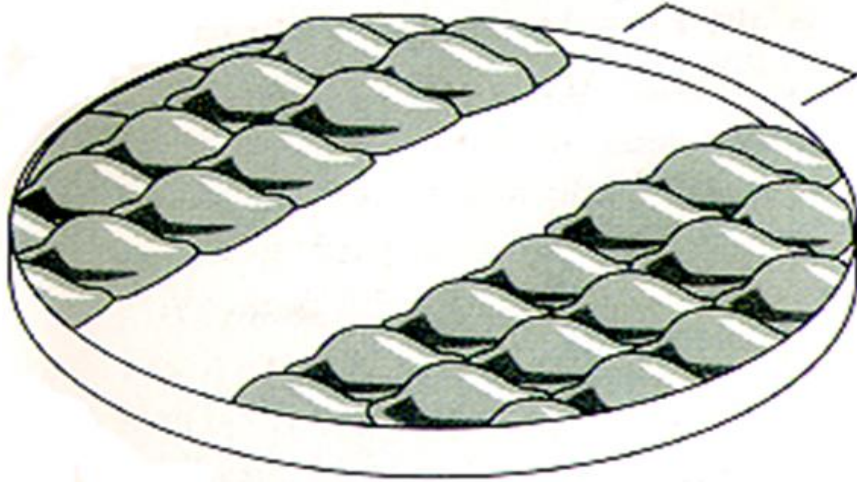
FIBROBLASTY W HODOWLI



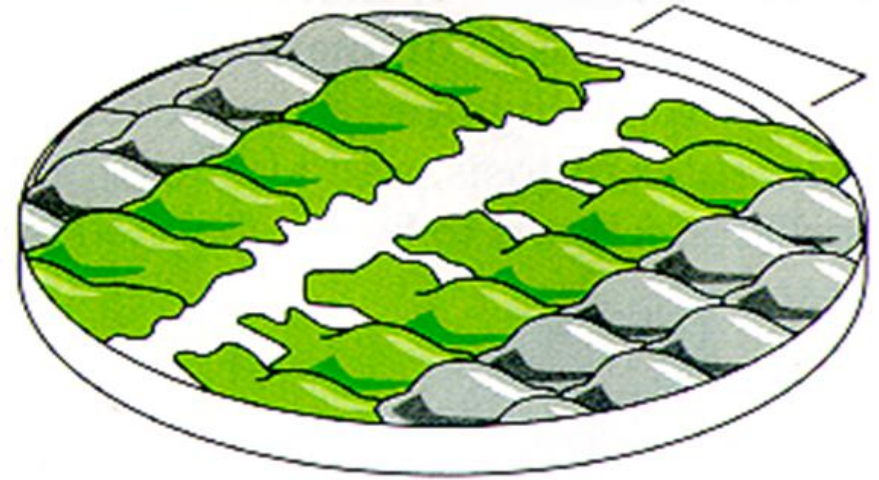
CHONDROCYTY, WŁÓKNA SPRĘŻYSTE



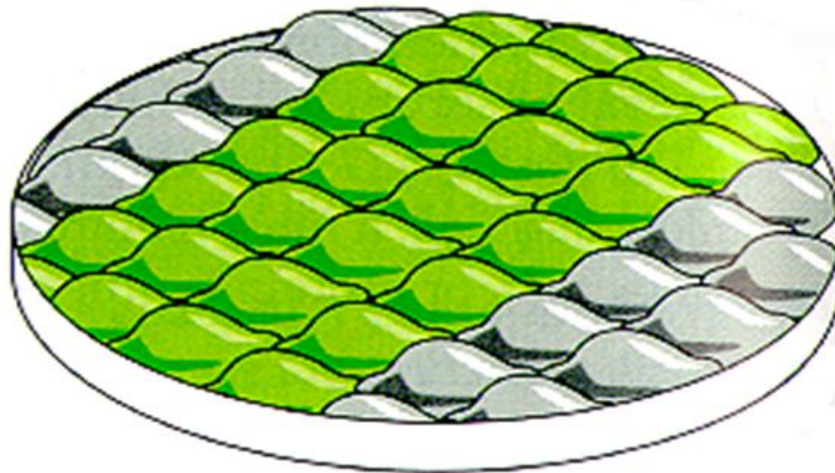
zlewna hodowla jednowarstwowa
komórki zdrapane w środku



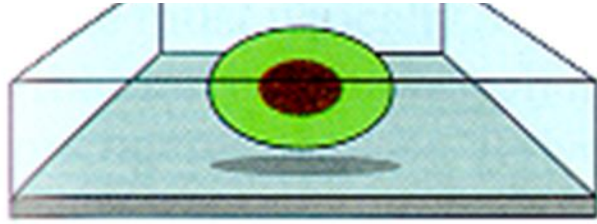
komórki spłaszczają się
i zaczynają syntezę DNA



komórki wypełniły
ubytek

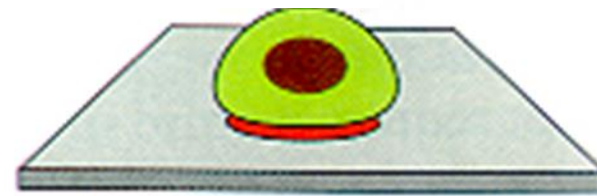


komórka zawieszona
w agarze



8%

komórka umieszczona na kępcie adhezyjnej
małej dużej



30%



90%

(A)

prawdopodobieństwo
wejścia w fazę S

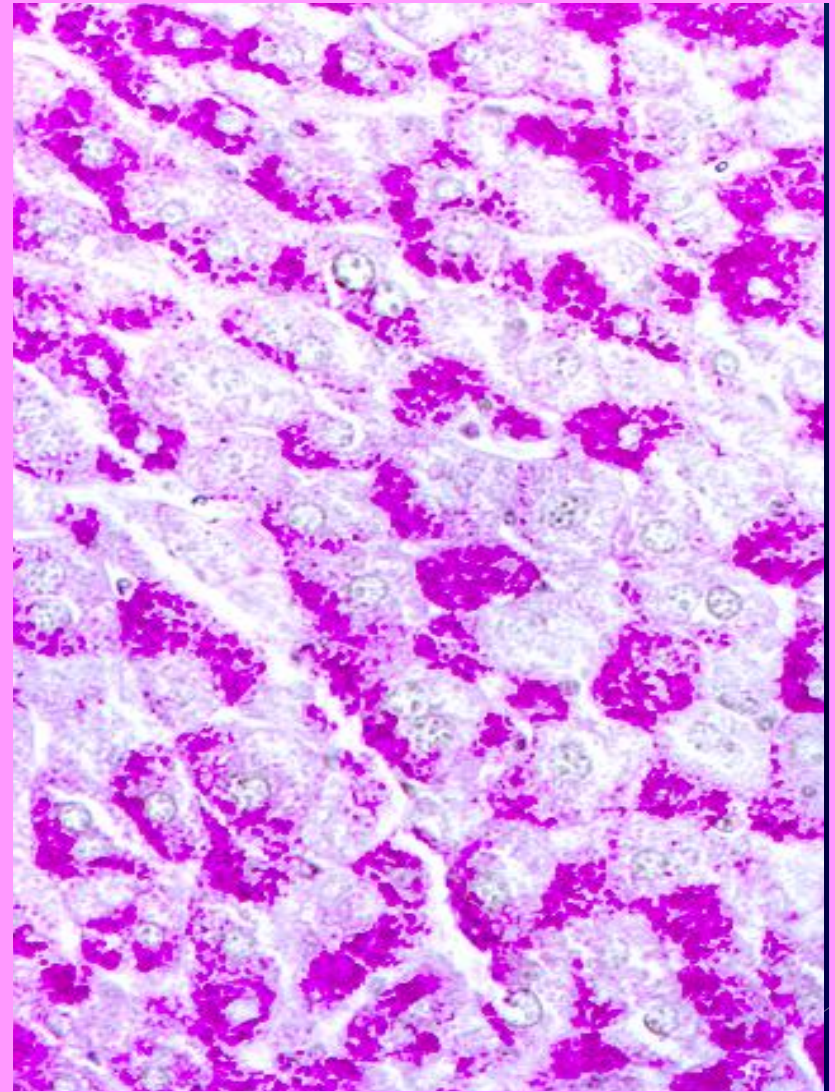
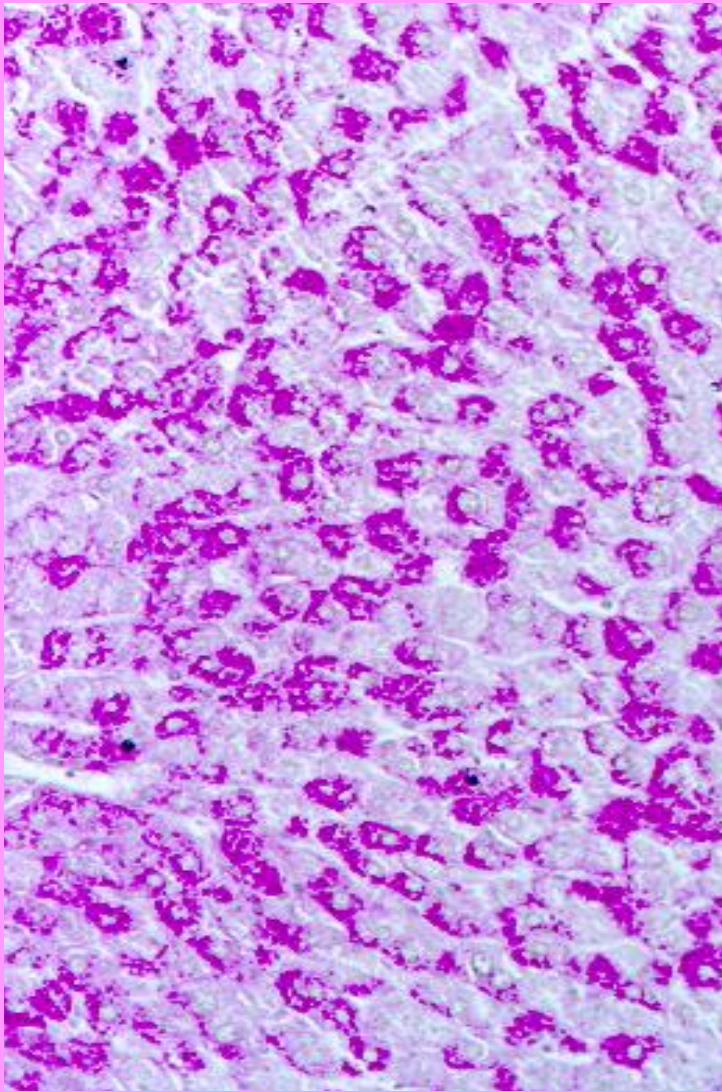


(B)



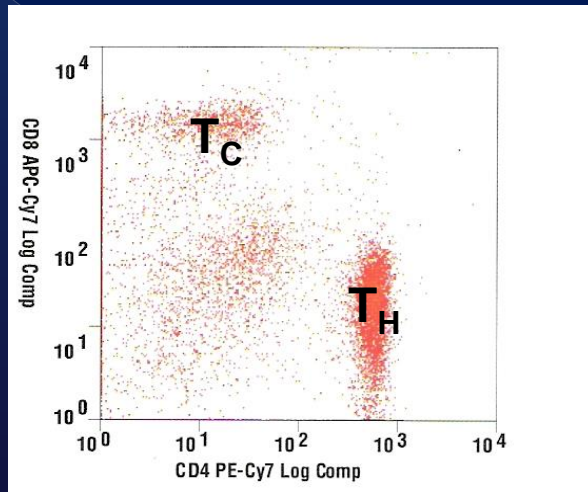
(C)

50 μ m

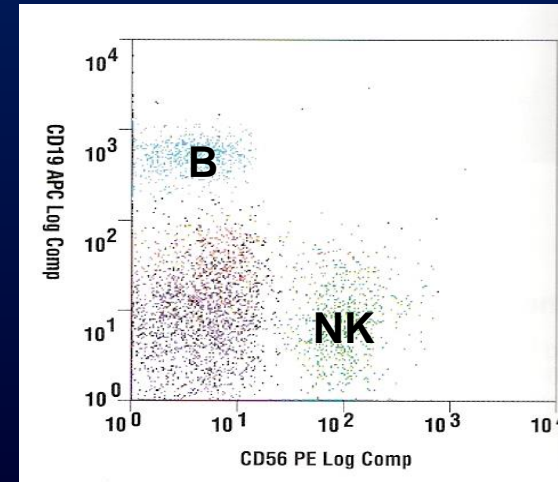


Reakcja PAS - wątroba - glikogen

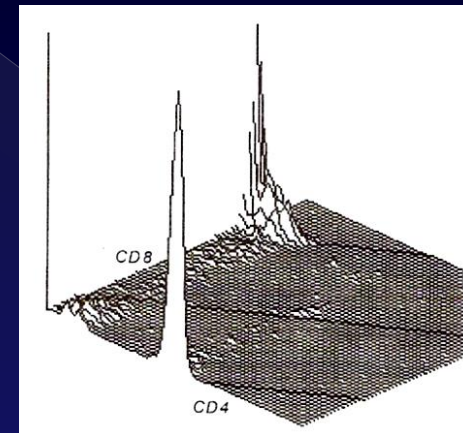
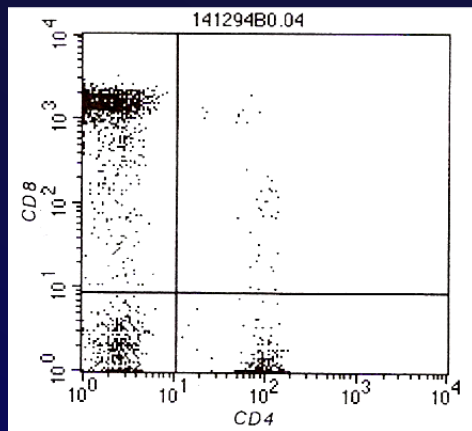
CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA



Anty-CD4 i anty-CD8.



Anty-CD56 i anty-CD19.



Barwienie anty-CD4 i anty-CD8. Limfocyty z wykresu kropkowego przedstawiono obok na histogramie (trzeci wymiar obrazuje liczbę komórek).

CYTOMETR



METODY BADANIA KOMÓREK I TKANEK

1. Historia hodowli komórek i tkanek. 1895 – hodowla płytki nerwowej zarodka kurczęcia w ciepłym roztworze soli fizjologicznej (Wilhelm Roux). 1907 - hodowla cewy nerwowej żaby w skrzepie żabiej limfy. Wyrastanie wypustek z komórek nerwowych (Ross Harrison). Optymalizacja warunków hodowli poprzez stosowanie różnych środowisk hodowlanych (osocza, surowicy, wyciągu z zarodków kurcząt) i określanie potrzeb komórek w zakresie ciśnienia osmotycznego, pH, zapotrzebowania na sole (Burrows, Carrel, Ebeling, Lewis). lata 20 XX wieku – hodowle tkanek zarodkowych. Zaobserwowano zdolność komórek do różnicowania. Hodowla w skrzepie w szkiełku zegarkowym – hodowla narządowa. -lata 40 XX wieku – pierwsze sztuczne pożywki zawierające sole mineralne, aminokwasy, witaminy. -1952 – zastosowanie trypsyny jako czynnika rozdzielającego tkankę na pojedyncze komórki i umożliwiającą oddzielanie ich od szkła (Moscona H, Moscona A)
2. Współczesna hodowla komórek i tkanek. Oprzyrządowanie laboratoriów umożliwia zachowanie jałowości hodowli. Wprowadzenie plastikowych naczyń jednorazowych, o odpowiednio przygotowanej powierzchni, wykorzystywanie czynników wzrostowych dla uzyskania proliferacji i wzrostu różnych typów komórek, wyprowadzenie licznych stałych linii komórkowych. Inkubator zapewnia optymalną temperaturę, wilgotność, stężenie dwutlenku węgla i tlenu.
3. Zastosowania hodowli komórek i tkanek. Badania podstawowe in vitro, diagnostyka, produkcja szczepionek (polio, odra, świnka, różyczka), produkcja enzymów, hormonów, cytokin, produkcja przeciwciał monoklonalnych, uzyskiwanie komórek do przeszczepów.
4. Podstawowe definicje.
Hodowla tkanek - badanie komórek, tkanek i narządów przetrzymywanych lub rosnących in vitro ponad 24 godziny(poniżej 24h – inkubacja).
Hodowla pierwotna - hodowla wyprowadzona z komórek, tkanek lub narządów pobranych bezpośrednio z organizmu.
Linia komórkowa- powstaje z hodowli pierwotnej po założeniu pierwszej podhodowli (po pierwszym pasażu).
Ustalona linia komórkowa – linia, którą można pasażować dowolnie długo (nieśmiertelna)
Diploidalna linia komórkowa - linia, w której przynajmniej 75% komórek ma taki sam kariotyp jak prawidłowe komórki somatyczne gatunku, z którego wyprowadzono hodowlę.
Heteroploidalna linia komórkowa - linia komórkowa, w której mniej niż 75% komórek ma diploidalny kariotyp. Czas podwojenia populacji - odstęp czasu, w którym liczba komórek podwaja się. Transformacja komórek - zmiana komórek prawidłowych w komórki nowotworowe, spowodowana wprowadzeniem nowego materiału genetycznego lub mutacją. Wzrost hodowli - zwiększanie się masy komórek (dawniej określenie to dotyczyło zwiększania się ich liczby). Proliferacja, rozmnażanie - zwiększanie się liczby komórek w hodowli.
5. POŻYWKI HODOWLANE. Odpowiednie ciśnienie osmotyczne 340 ± 5 mOsm/Kg H₂O i pH w zakresie do 7,2 do 7,4. SKŁAD POŻYWKI: sole mineralne, aminokwasy, glukoza, kwasy tłuszczowe, witaminy, zasady purynowe i pirymidynowe, czerwień fenolowa, surowica płodowa – źródło czynników wzrostu i hormonów.
6. Izolacja komórek lub ich zespołów. Hodowanie w naczyniu eksplantatu (wyosobnionego fragmentu tkanki lub narządu) przez czas konieczny do wypełnienia z niego komórek. Rozdzielenie eksplantatu na pojedyncze komórki metodą

enzymatyczną: a) gdy mało substancji międzykomórkowej np. tkanki płodowe – trypsyną, b) gdy dużo substancji międzykomórkowej np. chrząstka – kolagenazą z dodatkiem deoksyrybonukleazy. Rozdzielenie explantatu na większe fragmenty np. uzyskanie pęcherzyków tarczycy lub wysepek trzustkowych – kolagenazą. Rozdzielanie heterogennej populacji komórek np. komórek krwi: a) wirowanie w gradiencie gęstości – komórki rozdzielane zgodnie ze stałą sedymentacji, b) przepuszczanie przez kolumnę magnetyczną wypełnioną kulkami z odpowiednimi przeciwciałami – komórki rozdzielane zgodnie z ich powierzchniowymi markerami (magnetic assisted cell sorting –MACS)

7. Zahamowanie kontaktowe. zjawisko hamowania podziałów komórek przy zetknięciu się komórek ze sobą; obserwowane w hodowlach komórkowych prowadzonych na podłożach stałych; rezultatem jest hodowla składająca się z jednej warstwy komórek stykających się z podłożem. W tym punkcie prawidłowe komórki przestają się dzielić. Zawierają kontaktinhibinę – glikoproteinę występującą w błonie komórkowej i CiR – receptor dla kontaktinhibiny. Połączenie receptora z ligandem powoduje zmiany w układzie kinaz zależnych od cyklin (brak aktywności kompleksu CDK4 z cykliną D), co prowadzi do zahamowania podziałów komórkowych. W komórkach stransformowanych – brak CiR.
8. Limit Hayflicka. Ludzkie prawidłowe fibroblasty młodego osobnika w hodowli przechodzą kilkadziesiąt (40-60) podwojeń populacji (skracanie telomerów). Chromosomy liniowe są mniej stabilne niż koliste, ale warunkują różnorodność genetyczną żyjących organizmów (rekombinacje). Jednak końce 3' oraz 5' są podatne na działanie enzymów degradujących DNA, a także chromosomy liniowe mogą ulegać fuzji. Uszkodzeniom chromosomów zapobiegają – TELOMERY- powtarzające się sekwencje niekodującego DNA (TTAGGG) wraz z białkami zlokalizowane na końcach chromosomów. Podczas każdego cyklu replikacyjnego komórka traci 50-200 bp telomerowego DNA. Gdy telomery osiągną krytyczną długość – ETAP STARZENIA KOMÓRKI (zahamowanie cyklu komórkowego zależne od białka p53). Problem replikacji końców - utrata telomerowego DNA podczas replikacji polimeraza DNA może czytać i syntetyzować DNA tylko w jednym kierunku, zaczynając od startera.
9. Reakcja P.A.S. (Periodic acid–Schiff) - wykrywanie wielocukrów. Wielocukry, kwas nadjodowy (utlenianie grup glikolowych), grupy aldehydowe, odczynnik Schiffa (bezbarna fuksyna zasadowa), czerwone zabarwienie odczynnika Schiffa (glikogenozy, nowotwory).
10. Histoenzymologia. Enzym (np. fosfataza zasadowa, dehydrogenaza kwasu bursztynowego), substrat, produkt, związek pośredni, strą (barwny, nierozpuszczalny). Fosforan beta-naftyli, fosfataza zasadowa, beta-naftol, barwnik dwuazowy, barwny kompleks (guzy wywodzące się z trofoblastu, przerzuty raka gruczołu krokowego).
11. Autoradiografia. Inkubowanie tkanki z izotopem. Izotop emituje promieniowanie (zwykle beta). Ekspozycja emulsji na promieniowanie (AgBr w żelatynie). Promieniowanie uderza w ziarna srebra w emulsji i ujawnia je. Powstanie obrazu utajonego; srebro metaliczne. Obróbka fotograficzna przetwarza obraz utajony w obraz widzialny. Nad miejscem preparatu gdzie w tkance wbudowany był izotop widoczne są czarne ziarna srebra.
12. Immunohistochemia. Wykrywanie antygenów obecnych w komórkach i tkankach za pomocą przeciwciał: monoklonalnych i poliklonalnych. Metody znakowania

przeciwciał: - fluorochromy (np. pochodne fluoresceiny), - metale (np. ferrytyna; złoto koloidalne), - izotopy (np. ³H; ¹²⁵I; ³⁵S; ¹⁴C), - enzymy (np. fosfataza zasadowa, peroksydaza). Metody bezpośrednie, pierwsze przeciwciało ze znacznikiem. Metody pośrednie (wielostopniowe): - z użyciem dalszych przeciwciał (znakowanych, lub nieznakowanych), - bez użycia dalszych przeciwciał (np.: streptawidyna-biotyna).

13. Cytometria przepływowa. wyposażony w system pomiarowy, system optyczny (lampy, lasery), system detekcji sygnału oraz oprogramowanie umożliwiające przekształcenie ugięcia promienia światła forward-scattered light (FSC) i jego rozproszenia side scattered light (SSC), a także sygnału z fluorescencji w impulsy elektryczne. Komórki pojedynczo przechodzą przez wiązkę światła lasera. FSC – Forward-scattered light jest proporcjonalne do rozmiaru i pola powierzchni komórki. SSC - Side-scattered light jest proporcjonalne do ilości ziarnistości, pęcherzyków i komplikacji układu błon wewnątrzkomórkowych. Sprzęgnięte z barwnikiem fluorescencyjnym przeciwciała są stosowane do identyfikacji poszczególnych komórek w zależności od ich markerów powierzchniowych. Można użyć jednocześnie kilku fluorochromów. Wybarwienie różnych komórek wraz z FSC i SSC tworzy wzór danej subpopulacji. Cytometr umożliwia wychwytywanie i kolekcjonowanie komórek dla dalszej analizy (mikroskopowej, biochemicznej lub funkcjonalnej). Zastosowanie cytometrii przepływowej: diagnostyka: chorób rozrostowych układu chłonnego i krwiotwórczego, wrodzonych i nabytych niedoborów odporności, chorób autoimmunizacyjnych, analiza komórek przeznaczonych do przeszczepów szpiku, oraz monitorowanie: - przebiegu leczenia białaczek, -stanu układu odpornościowego pacjentów z HIV, - leczenia immunosupresyjnego u pacjentów po przeszczepach.
14. Izolacja zawartości komórek. Frakcjonowanie.
15. Western blot. Metoda wykrywania białek w homogenatach tkankowych, ekstraktach komórkowych lub płynach ustrojowych. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecyłu sodu (SDS-PAGE). Białka w próbce są ogrzewane z ujemnie naładowanym detergentem SDS (anionowy surfaktant), który je opłascza, nadaje im jednolitej gęstości ładunek ujemny i rozwija. Mostki dwusiarczkowe (S-S) są redukowane przez merkaptoetanol. Próbkę umieszcza się w studziencie w żelu poliakryloamidowym, a następnie przykładana się pole elektryczne. Pod wpływem pola ujemnie naładowane kompleksy SDS-białka migrują w żelu w kierunku dodatniej anody. Małe białka szybciej, większe białka wolniej. Transfer białek z żelu na błonę. Żel z rozwiniętym zestawem białek umieszcza się następnie w urządzeniu, które umożliwia (pod wpływem pola elektrycznego) przenoszenie białek z żelu na powierzchnię specjalnych błon (np. błony nitrocelulozowej), która silnie adsorbuje białka. Różne metody detekcji stosowanie przeciwciał różnie wyznakowanych metoda kolorymetryczna, chemiluminescencyjna, fluorescencyjna.
16. Wykrywanie i ocena ilościowa białek testem ELISA - test immunoenzymatyczny, wykrywanie i ocena ilościowa białek z użyciem przeciwciał związanych z enzymem. Dno płytki jest pokryte przeciwciałami wychwytyjącymi. Dodanie próbki z badanym białkiem. Dodanie przeciwciał sprzęgniętych z enzymem, dodanie substratu,

- przekształcenie bezbarwnego substratu w barwny produkt, intensywność barwy zależy od ilości badanego białka, dodanie roztworu stopującego reakcję, odczyt absorpcji.
17. Denaturacja DNA (topnienie DNA, mięknięcie DNA) – separacja podwójnej nici DNA na dwie pojedyncze nici wskutek zerwania wiązania wodorowych pomiędzy niemi (denaturacja termiczna, denaturacja chemiczna). Powolne ochładzanie DNA powoduje, że małe komplementarne obszary przeciwnych nici DNA łączą, dając obszary podwójnej helisy. Następnie reszta helisy szybko ulega denaturacji. Hybrydyzacja - zjawisko spontanicznego łączenia się komplementarnych nici kwasów nukleinowych (DNA z DNA, RNA z RNA lub DNA z RNA).
 18. Southern blot. Hybrydyzacja metodą Southerna – stosowana w biologii molekularnej metoda służąca do wykrywania określonych fragmentów DNA. 1. Cięcie DNA enzymami restrykcyjnymi, 2. Elektroforeza DNA, 3. Denaturacja alkaliczna DNA, 4. Transfer na błonę nitrocelulozową lub nylonową, 5. Dodanie wyznakowanej sondy – fragmentu DNA lub RNA. Southwestern blot - identyfikacja białek wiążących DNA poprzez ich zdolność do łączenia się z sondami DNA. Białka są poddawane elektroforezie i transferowane na błonę.
 19. Northern blot. Hybrydyzacja northern – stosowana w biologii molekularnej metoda służąca do detekcji określonych sekwencji RNA. Najczęściej stosuje się ją do wykrywania mRNA genów ulegających transkrypcji w komórce. RNA poddaje się rozdzielaniu elektroforetycznemu (elektroforezie) na żelu, po rozdzielaniu RNA przenosi się na odpowiednią membranę, membranę z RNA inkubuje się z sondą DNA lub RNA, następnie przeprowadza detekcję, czyli uwidacznianie sondy, która związała się do poszukiwanej sekwencji RNA na membranie.
 20. Hybrydyzacja *in situ* - wykrywanie sekwencji kwasów nukleinowych w komórkach, -wykorzystanie zdolności wiązania się jednoniciowych odcinków kwasów nukleinowych na zasadzie komplementarności (DNA: DNA; DNA:RNA; RNA:RNA), użycie sondy molekularnej (cDNA; RNA; oligonukleotydy) wyznakowanej izotopowo (³²P; ³⁵S) lub nieizotopowo (fluorescencja; biotyna+awidyna; enzym; digoksygenina), detekcja sondy związanej z odpowiednim odcinkiem kwasu nukleinowego.
 21. Reakcja łańcuchowa polimerazy. *Thermus aquaticus* – gatunek bakterii żyjący w wysokich temperaturach. Jest źródłem temperaturoopornej Taq polimerazy DNA wykorzystywanej w biologii molekularnej do reakcji PCR – techniki amplifikacji DNA. Bakterie te zostały odkryte w gorących źródłach Parku Narodowego Yellowstone. Termostabilna polimeraza DNA - polimeraza Taq syntetyzuje nową nić DNA z nukleotydów wykorzystując pojedynczą nić DNA jako matrycę i primery DNA do inicjacji syntezy. Wykrywanie swoistego mRNA. Liza komórek, izolacja RNA, Kopia mRNA syntetyzowana przez odwrotną transkryptazę, degradacja mRNA (Rnaza H), synteza komplementarnej nici DNA przez polimerazę DNA; koniec 5' oryginalnego mRNA służy jako primer, powstaje podwójna nić cDNA – kopia oryginalnego mRNA. Wykonanie reakcji PCR - cDNA jako matryca. Elektroforeza produktu PCR w żelu agarozowym - DNA barwione bromkiem etydyny.
 22. PCR w czasie rzeczywistym - Real-Time PCR - ilościowa ocena ekspresji genu. Pomiar po każdym cyklu, obliczenia, znakowane sondy lub primery (odpowiednia

sekwencja DNA). Fluorescencyjny barwnik (R), i wygaszacz (Q) są doczepione do końców 5' i 3'' sondy. Gdy sonda jest nienaruszona emisja fluorescencji jest wygaszona. Podczas każdego cyklu polimeraza DNA odcina R od sondy. Wtedy następuje emisja fluorescencji charakterystyczna dla barwnika. Emisja jest odczytywana, mierzona i analizowana przez specjalne oprogramowanie.

Preparaty do obejrzenia na części praktycznej:

1. Rozmaz limfocytów – preparat 204
2. Rozmaz granulocytów – preparat 205 – należy rozpoznać populacje granulocytów
3. Hodowla diploidalnych ludzkich fibroblastów (preparat 97a) – hodowla konfluentna – zahamowanie kontaktowe
4. Hodowla heteroploidalnych ludzkich fibroblastów transformowanych wirusem krowianki (preparat 300) – należy zwrócić uwagę na odmienny kształt fibroblastów i na brak zahamowania kontaktowego
5. Reakcja PAS w komórkach wątroby (preparat 222a) – cytoplazmie komórek widoczne są ziarna glikogenu. Ponieważ ulęgają one przemieszczeniu podczas sporządzania preparatu często zlokalizowane są w jednym biegunie komórki.
6. Reakcja PAS w jelicie (preparat 222 b) – komórki kubkowe, produkujące śluz, włókna siateczkowe zabarwione są na czerwono. Jądra komórkowe są wybarwione hematoksyliną
7. Reakcja z użyciem fosforanu alfa naftyli i soli dwuazowej wykrywająca aktywność fosfatazy zasadowej w nerce (preparat 220a). Fosfataza występuje w rąbku szczoteczkowym kanalików bliższych.