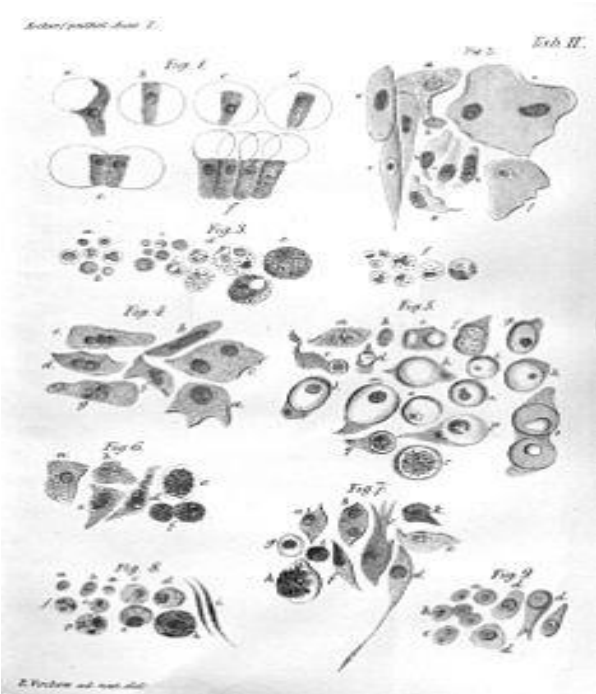




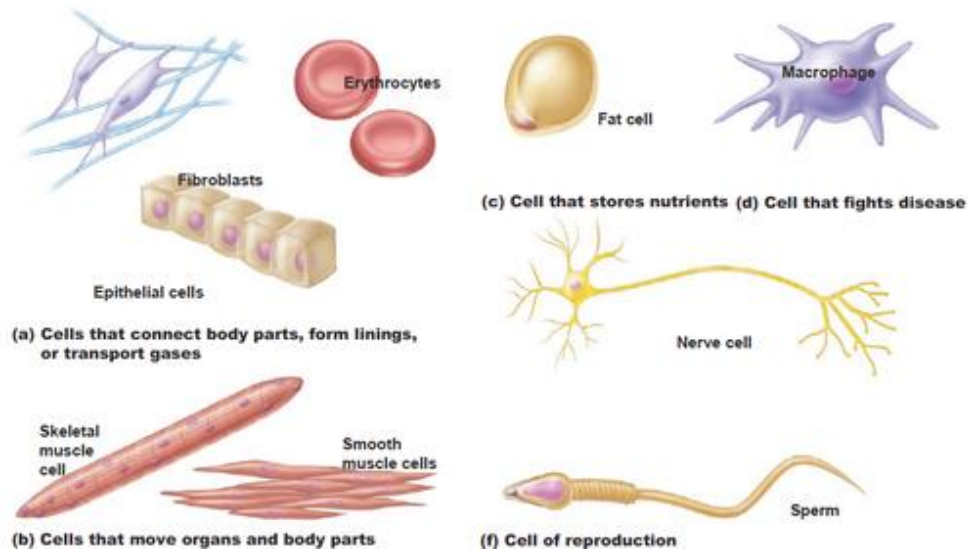
Οργανοτυπικές Καλλιέργειες

Καθηγητής-Διευθυντής Βασίλης Γοργούλης
Επ. Καθηγητής Ιωάννης Πατέρας
Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας
Ιατρική Σχολή
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Αθήνα, Οκτώβριος 2018

Το κύτταρο (Cell)



Virchow's Cell Theory



<http://anatomyandphysiology.com/cell-theory-the-cellular-basis-of-life/>

Οι διάφοροι τύποι κυττάρων πέρα από τις μορφολογικές έχουν κοινούς μηχανισμούς για τις βασικές λειτουργίες

Το δομικό στοιχείο των ιστών είναι το κύτταρο (cell). Τα κύτταρα εμφανίζουν **μεγάλη ποικιλομορφία ανάλογα με την λειτουργία που επιτελούν.**

Ωστόσο πίσω από την μεγάλη ετερογένεια σε επίπεδο μορφολογίας, τα κύτταρα χρησιμοποιούν **κοινούς μηχανισμούς για τις βασικές λειτουργίες** τους συμπεριλαμβανομένου της αντιγραφής και σύνθεσης του DNA, της παραγωγής πρωτεϊνών, την μεταφοράς της ενέργειας καθώς και της μετακίνηση ουσιών.



<https://www.lakeandsummerstyle.com/youve-done-your-dna-now-what/>

Τι είναι ο ιστός;

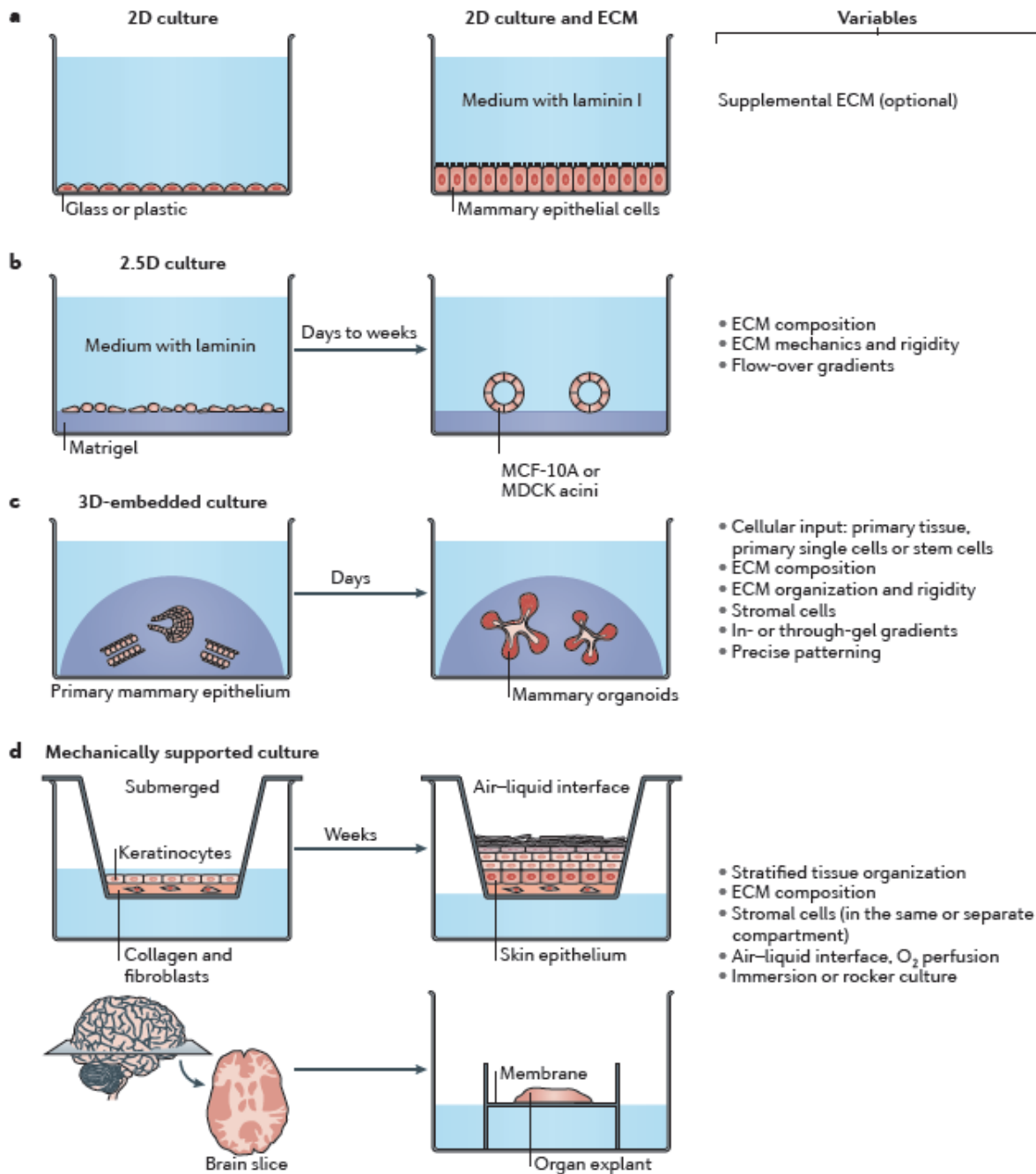
Ιστός (Tissue)

Ο ιστός συνιστά **συνάθροιση κυττάρων διατεταγμένων με σαφή και οργανωμένο τρόπο**. Με τη βοήθεια του μικροσκοπίου έχουν αναγνωρισθεί

τέσσερις βασικοί τύποι ιστού:

- 1) **επιθηλιακός ιστός** (εναλλακτικά επιθήλιο, epithelium)
- 2) **Συνδετικός ιστός** (connective tissue)
- 3) **Μυϊκός ιστός** (muscle tissue)
- 4) **Νευρικός ιστός** (nervous tissue)

Τύποι κυτταροκαλλιιεργειών



Δισδιάστατες (2D) κυτταροκαλλιέργειες

- Η ανάπτυξή τους ξεκίνησε ήδη από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα

- Με τις δισδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες μπορούμε να

πραγματοποιήσουμε **μία πλειάδα χειρισμών** (όπως εκλεκτική αποσιώπηση

γονιδίων – αναστολή συγκεκριμένων βιολογικών λειτουργιών) το οποίο

μας βοηθάει στην κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη λειτουργία

των κυττάρων

-Ως εκ τούτου οι 2D κυτταροκαλλιέργειες διαδραμάτισαν

καθοριστικό ρόλο στην άνθιση της μοριακής και κυτταρικής βιολογίας

-Ωστόσο ένας σοβαρός **περιορισμός είναι η απουσία εξωκυττάριας**

θεμέλιας ουσίας καθώς και άλλων τύπου κυττάρων που απαντούν

στους ιστούς

OBSERVATIONS ON THE LIVING DEVELOPING NERVE FIBER.¹

BY
ROSS G. HARRISON.

The immediate object of the following experiments was to obtain a method by which the end of a growing nerve could be brought under direct observation while alive, in order that a correct conception might be had regarding what takes place as the fiber extends during embryonic development from the nerve center out to the periphery.

The method employed was to isolate pieces of embryonic tissue, known to give rise to nerve fibers, as for example, the whole or fragments of the medullary tube, or ectoderm from the branchial region, and to observe their further development. The pieces were taken from frog embryos about 3 mm. long at which stage, *i. e.*, shortly after the closure of the medullary folds, there is no visible differentiation of the nerve elements. After carefully dissecting it out, the piece of tissue is removed by a fine pipette to a cover slip upon which is a drop of lymph freshly drawn from one of the lymph-sacs of an adult frog. The lymph clots very quickly, holding the tissue in a fixed position. The cover slip is then inverted over a hollow slide and the rim sealed with paraffine. When reasonable aseptic precautions are taken, tissues will live under these conditions for a week and in some cases specimens have been kept alive for nearly four weeks. Such specimens may be readily observed from day to day under highly magnifying powers.

While the cell aggregates, which make up the different organs and organ complexes of the embryo, do not undergo normal transformation in form, owing, no doubt, in part, to the abnormal conditions of mechanical tension to which they are subjected; nevertheless, the individual tissue elements do differentiate characteristically. Groups of epidermis cells round themselves off into little spheres or stretch out into long bands, their cilia remain active for a week or more and a typical cuticular border develops. Masses of cells taken from the myotomes differentiate into muscle fibers showing fibrillæ with typical striations. When portions of myotomes are left attached to a piece of the medullary cord the muscle fibers which develop will, after two or three days, exhibit frequent contractions. In pieces of nervous tissue numerous fibers are formed, though, owing to the fact that they are developed largely within the mass

¹Read before the Society for Experimental Biology and Medicine at the 23d meeting, New York, May 22, 1907.

Τρισδιάστατες (3D) κυτταροκαλλιέργειες

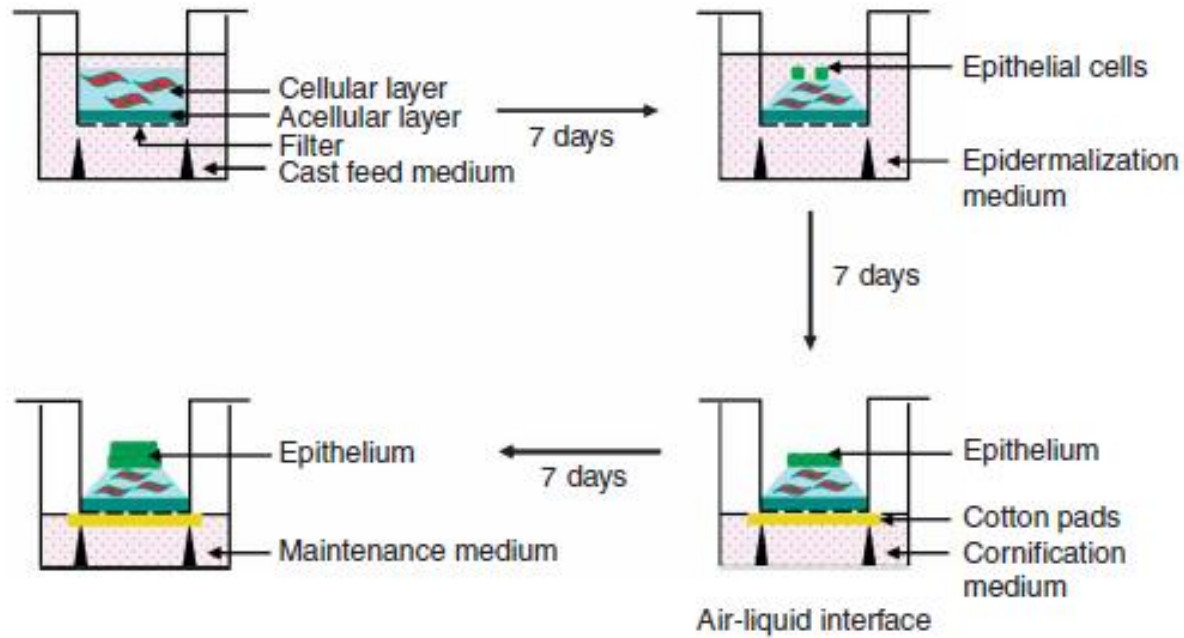
- Με τις 3D κυτταροκαλλιέργειες μπορούμε να εξετάσουμε τις
αλληλεπιδράσεις μεταξύ:

α) κυττάρων και εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας

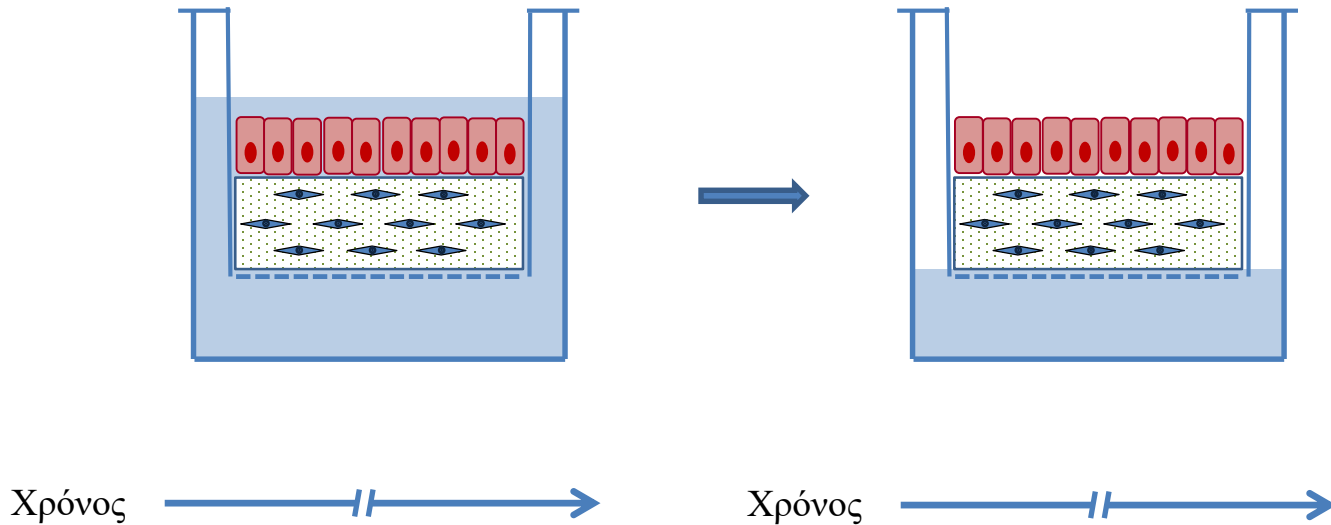
β) μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων (π.χ. ινοβλάστη με
επιθηλιακό κύτταρο)

- Ως εκ τούτου οι 3D κυτταροκαλλιέργειες αντανακλούν τις **δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών συστατικών που συνθέτουν τους ιστούς** και ως εκ τούτου **προσομοιάζουν τους ιστούς** σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι οι 2D κυτταροκαλλιέργειες.

Πειραματική Διαδικασία 3D ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ



**Πειραματική διαδικασία ανάπτυξης
τριδιάστατης (3D) καλλιέργειας με τη χρήση
εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (κολλαγόνο τύπου
I) – ανθρώπινων αθανατοποιημένων ινοβλαστών –
ανθρώπινων αθανατοποιημένων επιθηλιακών
κυττάρων**

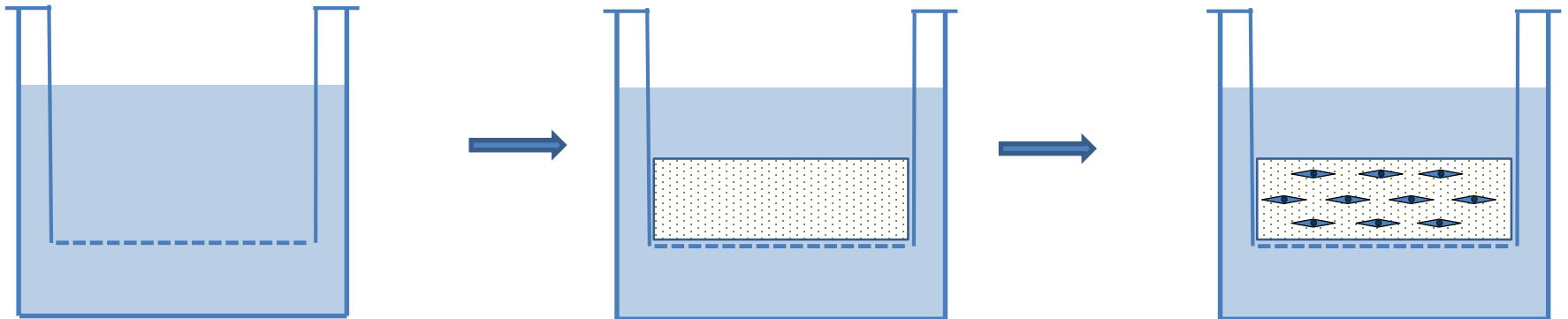


Πειραματική διαδικασία – 1η Μέρα

- Προετοιμασία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε καλλιεργητικό υλικό (όπως DMEM, το οποίο περιέχει τα βασικά θρεπτικά συστατικά συμπεριλαμβανομένου οργανικών και ανόργανων ενώσεων διαλυμένων σε ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει το κατάλληλο pH) μαζί με κολλαγόνο τύπου I

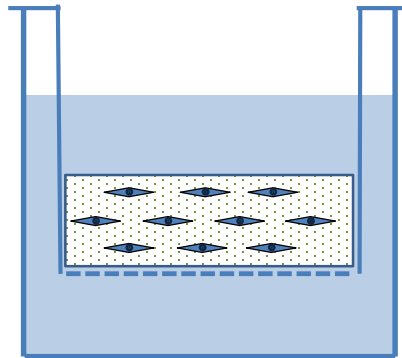
- Εμβάπτιση ανθρώπινων αθανατοποιημένων ινοβλαστών



Πειραματική διαδικασία – 2^η – 7^η Μέρα

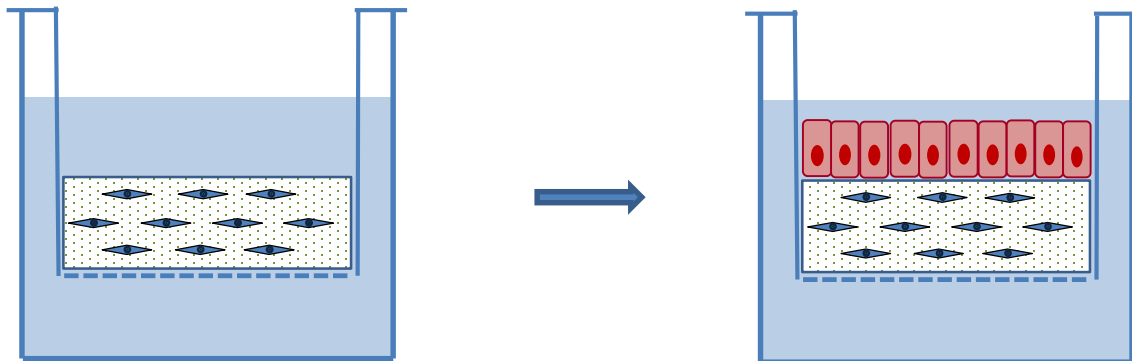
Σχηματισμός της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας

(συνδετικού ιστού)



Πειραματική διαδικασία – 7η Μέρα

Επίστρωση των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων της
επιλογής μας



Πειραματική διαδικασία

Εκτέλεση των χειρισμών της επιλογής μας (όπως αποσιώπηση ή υπερέκφραση γονιδίων – δοκιμασίες με χημικές ουσίες) και **μελέτη των μορφολογικών αλλοιώσεων** με την πάροδο του χρόνου – μετά το πέρας της διαδικασίας εκλεκτική απομόνωση και εφαρμογή μοριακών τεχνικών

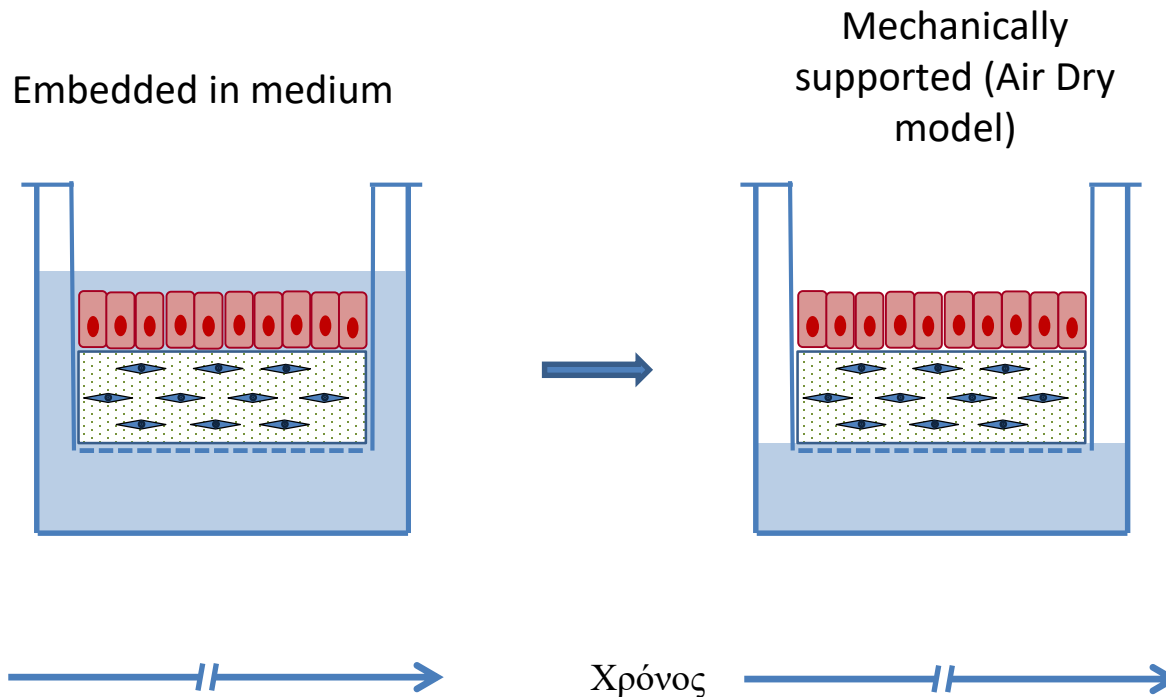
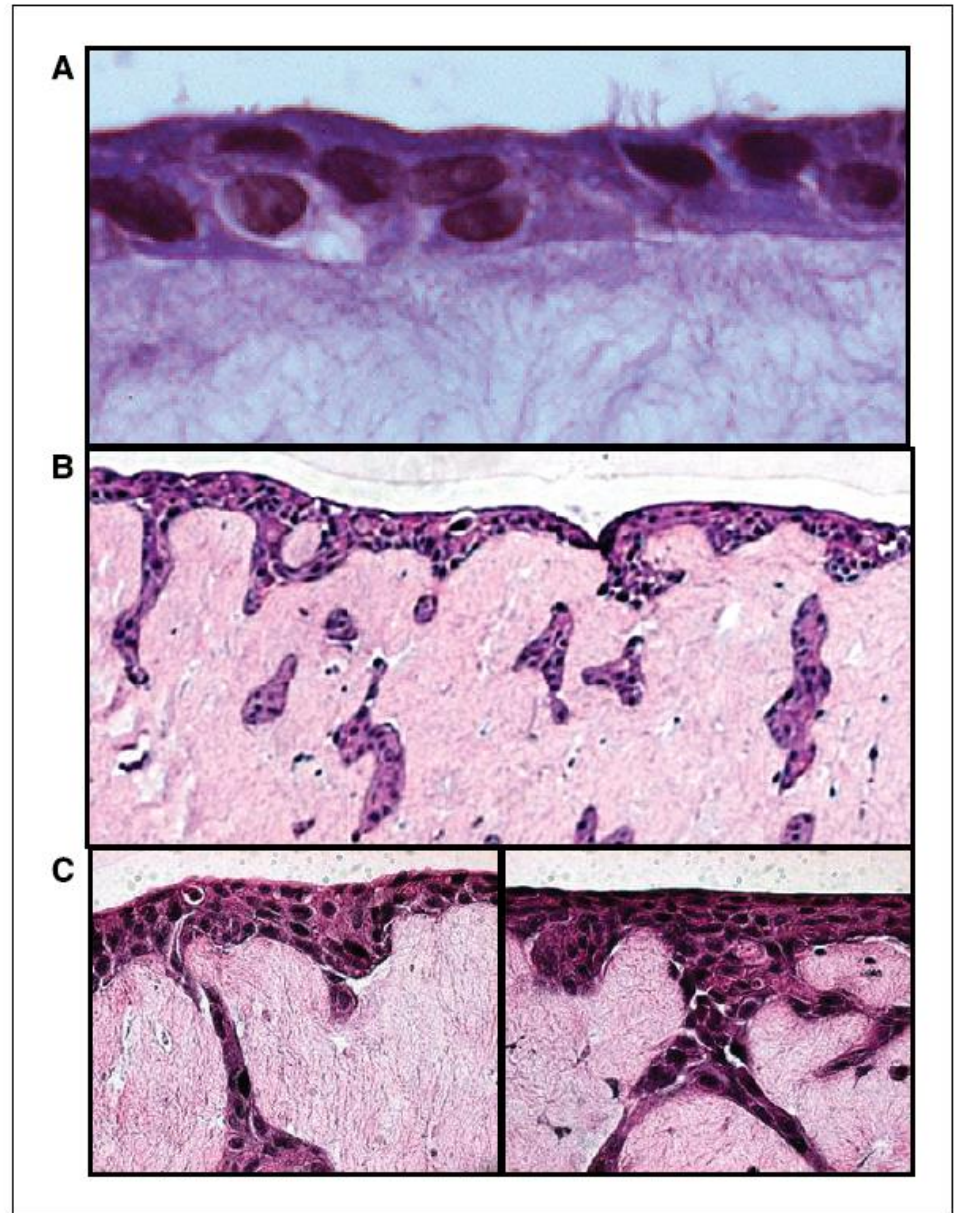


Figure 2. Effect of p53 knock down and mutant K-RAS^{V12} on three-dimensional organotypic culture of HBEC3 cells. *A*, stained paraffin cross-sections of organotypic cultures of HBEC3 cells showed that they formed a confluent layer of cells on the upper surface of the culture with the presence of cilia-like structures. Low-magnification (*B*) and high-magnification (*C*) p53RNAi and mutant K-RAS^{V12}-expressing HBEC3 cells showed a histologic change similar to metaplasia and dysplasia and they invaded into the fibroblast and collagen underlayer.



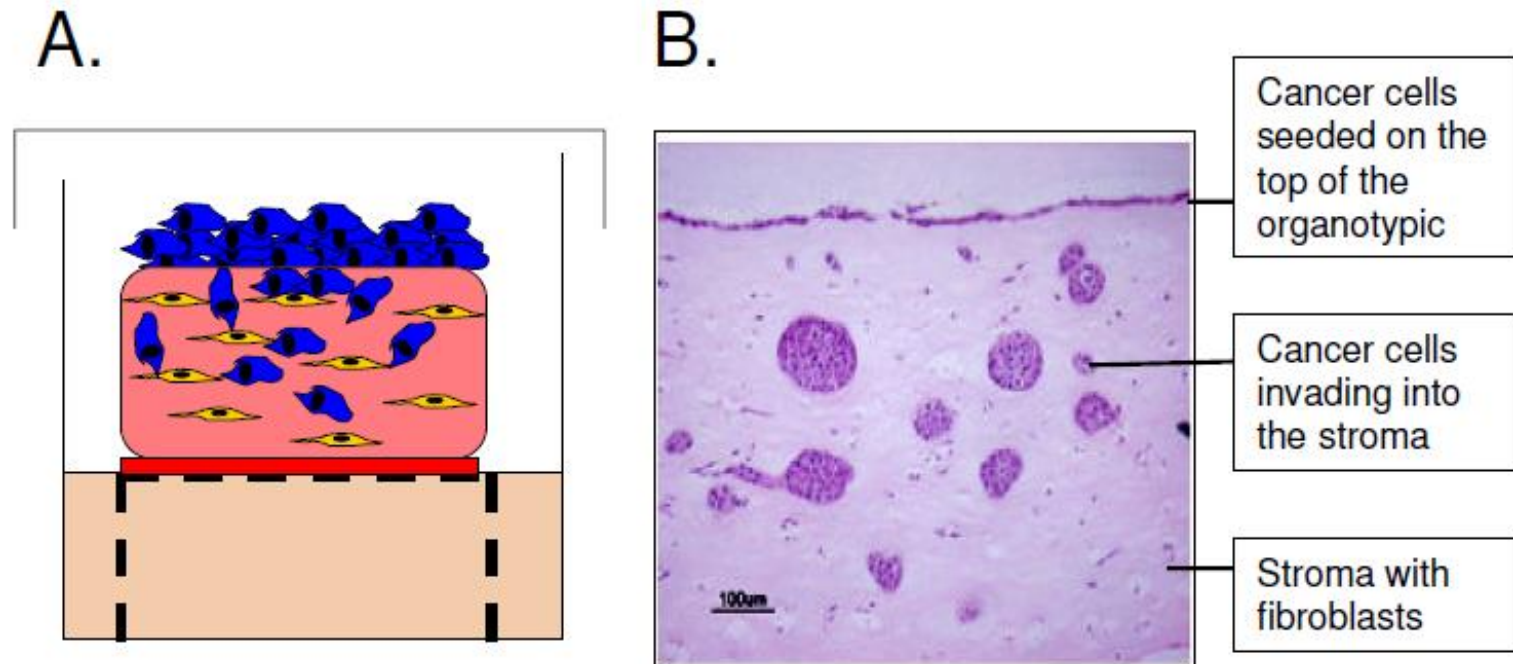


Figure 2

Breast cancer invasion in an organotypic gel. **A.** Schematic representation of an organotypic cell culture. The stroma consists of collagen:matrigel (70:30) and 5×10^5 human fibroblasts (yellow). 1×10^6 breast cancer cells (blue) are plated on the top of the matrix. The organotypic is then cultured on a grid at the air-liquid interface. **B.** H & E staining of a section through an organotypic culture 9 days after seeding breast cancer cells (MDA-MB-231) on the top. The image shows breast cancer cells remaining on top of the organotypic culture as well as cells invaded into the stroma.

Σας ευχαριστώ

