

Synopse přednášky

BUNĚČNÉ KULTURY

MUDr. Martin Vejražka

1. Význam buněčných kultur pro výzkum a výrobu

Buněčné kultury dnes patří mezi nejpoužívanějších biologické modely používané ve výzkumu. Kromě toho slouží jako zdroj materiálu v biotechnologických aplikacích včetně např. produkce monoklonálních protilátek. Ve srovnání s jinými pokusnými objekty mají nesporné výhody (bývají např. lépe definovány, umožňují pracovat jen s jediným typem buněk), ale i řadu omezení (buňky se kultivují za nefyziologických podmínek, chybí jim okolí obvyklé v tkáních, někdy během kultivace dediferencují či mění svůj fenotyp). Práce s buněčnými kulturami vyžaduje vhodně vybavenou laboratoř, vyškolené pracovníky, zvláštní spotřební materiál a chemikálie prosté některých běžných kontaminantů. To s sebou přináší i organizační a ekonomické nároky na provoz laboratoře.

2. Základní principy buněčných kultur

Buněčná kultura se zakládá izolací určitého typu buněk ze zvířete, člověka či rostliny – zakládá se primokultura. K izolaci se používají nejrůznější techniky založené na mechanické disociaci tkáně, natrávení pomocí enzymů, sběru odloupaných buněk z tělesných tekutin apod. Buňky se kultivují nejčastěji adherované na vhodném povrchu, méně často v suspenzi či zakotvené v matrix. K identifikaci izolovaných buněk se zpravidla používají imunocytochemické techniky nebo molekulárně biologické metody. Kultivační podmínky se snaží napodobit fyziologické podmínky in vivo: buňky se pěstují při tělesné teplotě ve speciálních nádobách. Rostou v kultivačním médiu. Zpravidla se udržují v atmosféře se zvýšeným parciálním tlakem oxidu uhličitého. Pokud se pěstují jako adherentní kultura, jsou důležité vlastnosti povrchu kultivační nádoby. Většina buněčných typů vyžaduje hydrofobní povrch, nejčastěji se dnes používá speciálně ošetřený polystyren. Po namnožení se adherentní buňky uvolní od kultivačního povrchu (odstaněním dvojmocných iontů, pomocí proteáz, mechanicky, snížením teploty) a naředěná buněčná suspenze se nasadí do nové kultivační nádoby (pasáž, subkultura). Počet buněk u většiny linií roste přibližně exponenciálně až do okamžiku, kdy se buňky začnou těsně dotýkat. V důsledku kontaktní inhibice pak dochází ke zpomalení až zastavení růstu. Většina adherentních kultur nakonec vytvoří na povrchu kultivační nádoby splývající vrstvu o síle jedné buňky (monolayer). Kultivované buňky mohou mít omezenou životnost (po několika pasážích stárnou a jejich další dělení se postupně zastaví), nebo lze pracovat s tzv. kontinuálními liniemi tvořenými spontánně, chemicky či virově transformovanými buňkami. Kromě přípravy vlastních buněčných linií z primokultur výzkumné laboratoře často buněčné kultury nakupují ze sbírek.

3. Vybavení potřebné pro kultivaci buněk in vitro

Práce s tkáňovými kulturami vyžaduje zvláštní vybavení. Jedním z hlavních požadavků je udržení sterility a zabránění kontaminacím. Je vhodné pracovat ve vyhrazené čisté laboratoři podléhající speciálnímu režimu. Mezi základní pomůcky patří laminární box, inkubátor s řízenou atmosférou (zvýšený parciální tlak oxidu uhličitého, vysoká relativní vlhkost) a inverzní mikroskop vybavený fázovým kontrastem. Je třeba disponovat řadou dalších přístrojů a pomůcek. Používá se sterilní jednorázový plast, kultivační nádoby s upraveným povrchem a chemikálie určené pro práci s buněčnými kulturami.

4. Kultivační média

Jako kultivační média se dnes používají směsi několika desítek látek. Zpravidla obsahují hlavní anorganické ionty, zdroj energie, aminokyseliny, pufrující složku. Dále v nich bývají vitaminy a růstové faktory. Pro usnadnění práce s buněčnou kulturou se často přidává acidobazický indikátor. Jako zdroj růstových faktorů, stopových prvků a dalších látek nutných pro růst kultury se používá krevní sérum, nejčastěji fetální bovinní. Nevýhodou médií se sérem je, že není přesně definována koncentrace všech látek, takže růstové charakteristiky se mohou lišit podle šarže použitého séra. Pěstování buněk v definovaném médiu bez séra bývá obtížnější, kultivační médium je nutné suplementovat celou řadou růstových faktorů a dalších látek. Podle pufrující složky lze kultivační média rozdělit do dvou hlavních skupin: média určená pro kultivaci v atmosféře se zvýšeným parciálním tlakem oxidu uhličitého a média pro práci v běžné atmosféře. Příprava kultivačních médií musí kromě požadavků na čistotu a sterilitu brát ohled i na stabilitu jednotlivých složek a jejich směsí. V odůvodněných případech se do kultivačních médií přidávají antibiotika; jejich použití by nemělo být paušální, neboť zvyšuje riziko skryté kontaminace buněčných kultur.

5. Další vybraná témata

Základním předpokladem pro práci s buněčnými kulturami je dokonalé zvládnutí sterilní pracovní techniky a kontroly kontaminace. Některé běžně používané sterilizační metody nejsou vždy vhodné (zejména sterilizace formaldehydem či ethylenoxidem).

Častým úkolem bývá stanovení počtu buněk. Používají se techniky založené na přímém počítání pod mikroskopem, průtokové počítáče buněk, kvantifikace buněk podle koncentrace vybraných látek (bílkovina, nukleové kyseliny) či podle aktivity některých enzymů.

Živé buňky lze dlouhodobě skladovat zmrazené kapalným dusíkem nebo v hlubokomrazícím boxu. Před poškozením mrazem chrání buňky vhodné kryokonzervační látky (nejčastěji dimetylsulfoxid). Kritickým momentem je zmrazování a rozmrazování suspenze buněk, které musí probíhat vhodnou rychlostí.