

# Buněčné kultury

**Martin Vejražka**

*Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze*

Kateřinská 32, 121 08 Praha 2, tel. 224 964 275, e-mail martin.vejrazka@lf1.cuni.cz

## **Buněčná kultura jako zdroj biologického materiálu.**

Buněčné kultury dnes patří mezi základní techniky používané v základním a aplikovaném výzkumu i ve výrobě. Mají celou řadu použití. Ve výzkumu slouží především jako zdroj materiálu (tj. buněk nebo buněčných součástí) pro pokusy. Zcela nezastupitelné postavení mají hybridomové kultury při výrobě monoklonálních protilátek. Kromě toho se buněčných kultur využívá i pro výrobu dalších bílkovinných molekul a peptidů.

Kultivované buňky jako pokusný model mají dnes již své pevné a nenahraditelné postavení. Využití buněčných kultur v experimentální práci má ve srovnání s jinými typy biologických modelů, např. v porovnání s použitím laboratorního zvířete nebo izolovaného orgánu či tkáně, zásadní výhody. Především, pokus probíhá na jediném, dobře charakterizovaném buněčném typu a jeho výsledky nejsou ovlivněny interakcí s jinými orgány, tkáněmi či buněčnými populacemi. Řadu buněčných linií lze snadno kultivovat a v krátké době je možné získat poměrně velké množství přesně definovaného a homogenního materiálu, což při práci s jinými biologickými modely bývá obtížné. Na kultivovaných buňkách lze také bez nesnází provádět experimenty, při nichž dojde k jejich zničení. Naproti tomu zničení nebo poškození pokusného modelu při práci se zvířaty přináší etické problémy a v případě pokusů na lidech je zcela nemyslitelné.

Na druhou stranu je potřeba počítat i s významnými omezeními, která použití buněčných kultur limitují. Kultivované buňky rostou za nefyziologických podmínek – pěstují se v umělém kultivačním médiu, jehož složení neodráží přesně složení vnitřního prostředí v organismu, a také v atmosféře s mnohonásobně vyšším tlakem kyslíku, než odpovídá situaci ve tkáních. Kultivované buňky postrádají obvyklý tkáňový kontext, tj. přítomnost jiných

buněčných typů, s nimiž by *in vivo* komunikovaly a vyměňovaly si nejrůznější látky, chybí ale i součásti extracelulární matrix, jejichž přítomnost či nepřítomnost může mít na vlastnosti buněk vliv. V důsledku toho se často mění fenotyp kultivovaných buněk, takže jejich vlastnosti nemusejí přesně odpovídat vlastnostem stejných buněk v organismu – kultivované buňky mění svou morfolonii, mění se exprese genů, citlivost na různé podněty atd. Stručně shrnuto: při experimentech s kultivovanými buňkami musíme mít na paměti, že pracujeme s modelem *in vitro*, který může a nemusí dobře odrážet poměry za podmínek *in vivo*. Práce s kultivovanými buňkami je pro výzkum velmi přínosná a rozšiřuje možnosti, které nám poskytují jiné pokusné modely, nemůže však beze zbytku nahradit pokusy prováděné na tkáních, orgánech a laboratorních zvířatech nebo lidských dobrovolnících.

Práce s buněčnými kulturami se v řadě aspektů liší od jiných laboratorních technik, což může jejich použití znesnadňovat. Laboratoř musí disponovat poměrně nákladným technickým vybavením, které navíc potřebuje pravidelný a rovněž relativně nákladný servis. Používá se zvláštní jednorázový spotřební materiál, který je o něco dražší než srovnatelné jednorázové pomůcky pro běžné použití. Rovněž voda chemikálie pro kultivaci buněk musí být prosté některých běžných kontaminantů (např. některých přechodných kovů, endotoxinu a dalších organických molekul apod.). Většinou se používají reagentie přímo určené a testované pro buněčné kultury. V neposlední řadě pracovníci, kteří buněčné kultury pěstují, musejí být náležitě vyškoleni a pravidelně doškolení, aby dokázali dodržet veškeré požadavky na čistotu a přesnost práce. Práce s buněčnými kulturami bývá často velmi zdlouhavá a přitom mimořádně náročná na soustředění a pozornost. Kultivace buněk proto patří mezi techniky, které jsou poměrně drahé a náročné na personální zajištění, organizaci a čas.

### **Primární kultura. Zdroje buněk pro kultivaci.**

Zdrojem buněk pro založení kultury musí pochopitelně být laboratorní zvíře nebo člověk (méně často se používají kultury buněk hmyzu a rostlinné buněčné kultury). První kulturu izolovaných buněk označujeme jako primární kulturu neboli primokulturu. Poté, co se buňky namnoží, se naředí a přenesou do nových kultivačních nádob – tento postup obvykle označujeme jako pasáž a vzniká jím tzv. sekundární kultura čili subkultura. Buňky v sekundární kultuře se pěstují tak dlouho, až získáme dostatečné množství materiálu pro pokus.

Pokud jde o zakládání primokultury, můžeme rozlišit buňky pocházející z normální a z nádorové tkáně. Nádorové buňky se svými vlastnostmi pochopitelně liší od normálních buněk – zpravidla se lépe množí a obecně se snáze kultivují. Kultury normálních buněk mají omezenou životnost, po několika pasážích dochází k tzv. zestárnutí kultury – buňky změňi svoje vlastnosti a přestanou se dělit. Nádorové buňky většinou stárnutí nepodléhají.

Odlišně se také chovají buňky izolované z dospělého jedince a z embrya. Embryonální buňky se opět snáze pěstují a kultury, které z nich vycházejí, mají zpravidla výrazně delší životnost. Na druhou stranu bývají náchylnější ke změnám fenotypu.

Vlastnosti kultivovaných buněk se mohou lišit podle živočišného druhu a případně i podle linie pokusného zvířete. Nejčastěji se kultivují buňky izolované z laboratorního potkana, myši, králíka, často se kultivují i lidské buňky.

Buněčnou kulturu lze založit různými postupy. V některých případech stačí nechat vyrůstat buňky přímo z kousku tkáně kultivované za vhodných podmínek (tzv. explantační kultura; tímto způsobem se získávají např. fibroblasty). Většinou je však třeba nejprve vhodnými postupy izolovat jednotlivé buňky. Obvykle se používají postupy založené na kombinaci mechanického rozvolnění tkáně a enzymatického natrávení mezibuněčné matrix kolagenasou, elastasou, trypsinem apod. Vzácněji se vychází například z kmenových buněk separovaných z periferní krve, z buněk přítomných v ascitické tekutině atd.

Některé buněčné typy, např. endotelie nebo buňky jaterního parenchymu, lze izolovat pomocí perfuze orgánu vhodným médiem (často roztokem, který obsahuje proteasy). Uvolněné buňky se pak zcentrifugují a kultivují.

Uvedenými postupy zpravidla získáme směs, která kromě požadovaných buněk obsahuje i příměs dalších buněčných typů. Musí proto následovat krok, který zajistí čistotu vytvořené kultury. Nejjednodušší, i když ne zcela spolehlivou metodou, bývá použití kultivačních podmínek, které umožní růst pouze požadovaného buněčného typu. Často se využívá skutečnosti, že různé buňky různě rychle adherují na kultivační povrchy. Například endotelie „přisedají“ na laminin snáze než kontaminující fibroblasty a hladké svalové buňky. Jindy se používá selekčních médií, která zabrání růstu kontaminujících buněk – např. optický D-izomer aminokyseliny valinu je toxický pro fibroblasty.

Máme-li suspenzi, která obsahuje několik buněčných typů, můžeme je často oddělit pomocí izopyknické sedimentace, tj. centrifugací na gradientu hustoty. Využívá se toho, že různé buněčné typy mívají různou specifickou hmotnost. Při práci s buněčnými kulturami se používají nespojitě i spojitě gradienty. Nejčastěji používaným nespojitým gradientem je Ficoll®, roztok vhodného polysacharidu. Pro separaci buněk se na sebe opatrně navrství dva roztoky Ficollu tak, že spodní vrstva je o něco hustší, než izolované buňky, a horní vrstva je naopak o něco řidší. Pak se gradient převrství buněčnou suspenzí. Centrifugací se suspenze rozdělí: buňky hustší než požadované propadnou pod hustší část gradientu (tj. na dno zkumavky), žádané buňky se budou vznášet mezi oběma vrstvami gradientu a méně husté buňky zůstanou nad řidším gradientovým roztokem.

Jako základ kontinuálních gradientů se nejčastěji používá Percoll® – koloidní roztok silikátových částic obalených prakticky inertní organickou látkou. Centrifugací Percollu při vysokém zrychlení se částice rozdělí podle hustoty, takže vznikne kontinuální gradient hustoty – roztok u dna zkumavky má větší hustotu než u hladiny. Převrství-li se takto připravený gradient buněčnou suspenzí, buňky sedimentují, přičemž se zastaví ve výšce, která odpovídá jejich hustotě. Sedimentaci lze urychlit opatrnou centrifugací při malé rychlosti.

Nákladnou, ale velmi užitečnou metodou pro izolaci určitého typu buněk, je fluorescencí aktivované buněčné třídění (fluorescence-activated cell sorting, FACS). Buňky se označí fluorescenčně značenými protilátkami proti vybraným povrchovým antigenům. Pak procházejí tenkou kapilárou, jíž proplouvají jednotlivě, a jsou ozařovány laserem. Měří se jednak, jaká část světla se pohltí a rozptýlí, což umožní určit velikost buňky, a jednak fluorescence. Na základě vhodně zvolených kritérií se pak buňky v proudu tekutiny elektrostaticky odchylují a rozdělují mezi různé sběrné nádobky.

Buňky lze rozdělovat i dalšími postupy, např. „prosíváním“ přes jemná síťka, pomocí protilátek s feromagnetickými částicemi atd.

### **Určení typu kultivovaných buněk**

Když se nasazené buňky začnou množit a založená kultura se rozrůstá, je třeba ověřit její čistotu a popřípadě určit podíl kontaminujících buněk. Prvním, i když samostatně zcela nepostačujícím krokem, je mikroskopické zhodnocení morfologie a růstových vlastností

kultury. Bohužel pouhým mikroskopickým pozorováním nelze většinu buněčných typů od sebe vůbec odlišit.

Velkým přínosem jsou imunochemické metody – pomocí protilátek značených fluorescenčně nebo enzymaticky se testuje přítomnost povrchových antigenů charakteristických pro kultivované buňky i pro očekávané kontaminující buněčné populace. Podobně je možné stanovit aktivitu vhodných enzymů, popřípadě zastoupení některých izoenzymů v buňce, neboť enzymatická výbava buněk se mezi jednotlivými populacemi rovněž významně liší.

V některých případech lze s výhodou použít i funkčních testů, např. sledování kontraktibility svalových buněk apod.

Otázka identifikace typu kultivovaných buněk je v praxi značně spleťtá, neboť buňky kultivované *in vitro* často mění své vlastnosti, mění se výbava povrchovými antigeny, ztrácí se typické morfologické i funkční vlastnosti atd.

### **Kultivační podmínky**

Aby pěstované buňky za podmínek *in vitro* přežily, nebo dokonce proliferovaly, je třeba jim zajistit vhodné podmínky. Mezi nejdůležitější patří povrch kultivační nádoby, složení kultivačního média a další vlastnosti prostředí, jako je teplota či složení atmosféry.

Většina buněčných kultur je adherentní, tj. buňky rostou na vhodném kultivačním povrchu. Nejčastěji se pro pěstování buněk používají polystyrénové nádoby, jejichž povrch je upraven tak, aby byl hydrofilní.

Náročnějším kulturám hydrofilní polystyren k růstu nestačí a je nutné povrch potáhnout vhodnou látkou, která adhezi buněk zlepší. Mohou to být polypeptidy složené z aminokyselin s polárním postranním řetězcem (nejčastěji polylysin). Adhezi řady buněk usnadní kolagen (nejčastěji se používá kolagen I), popřípadě jeho hydrolyzát – želatina. Používají se i další adhezní faktory, např. fibronektin či laminin.

Vzácněji se buňky nenechávají růst jen po kultivačním povrchu, ale vrůstají do vhodného trojrozměrného prostředí. Bylo navrženo několik takových uspořádání, nejrozšířenější z nich jsou trojrozměrné struktury tvořené kolagenem.

Některé buňky, zejména krevního původu, je naopak nutné pěstovat v suspenzi (a jejich adheze k povrchu by vedla k transformaci do jiného buněčného typu). V suspenzi se buňky udrží díky neustálému promíchávání kultury – kultivační nádoby jsou umístěny na kývací míchačce, nebo se používají válcovité nádoby, které se otáčejí kolem vodorovné osy, popřípadě se buňky pěstují ve speciálních kultivačních tancích s míchadélkem. Jinou možností je potažení povrchu kultivační nádoby látkou, která adhezi buněk zabrání, např. agarosou. V některých aplikacích, nejčastěji při produkci protilátek a jiných bílkovin, pomůže buňky udržet v suspenzi tzv. mikroenkapsulace – speciálním postupem se jednotlivé buňky obalí tenkou vrstvičkou polymeru (např. alginátu), která umožňuje difúzi látek mezi buňkou a kultivačním médiem, zabraňuje však přilnutí buňky k povrchu nádoby.

Buňky se zpravidla kultivují při teplotě blízké tělesné teplotě zdrojového organismu, většinou tedy při 37 °C.

Atmosféra v inkubátoru se většinou obohacuje o oxid uhličitý, obvykle obsahuje 5 % CO<sub>2</sub>. Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého se podílí na udržení pH médií s bikarbonátovým pufrem. Kromě toho vyšší koncentrace rozpuštěného CO<sub>2</sub> v médiu lépe odpovídá poměrům v extracelulární tekutině.

Aby se neodpařovala voda z kultivačního média a nedocházelo tak ke změně koncentrace jeho složek, udržuje se relativní vlhkost atmosféry kolem 90 %.

Buňky se pěstují ve speciálních inkubátorech, které mohou zajistit všechny uvedené parametry. Kromě regulace teploty musejí tedy být vybavené i zařízením pro řízení koncentrace CO<sub>2</sub>. Zároveň je nutné zajistit, aby nedošlo ke kontaminaci kultur bakteriemi či plísněmi – musíme si uvědomit, že uvedené podmínky jsou optimální i pro jejich růst. Inkubátor tedy musí umožňovat snadné čištění, dezinfekci a případně i sterilizaci povrchů, popřípadě jeho součásti bývají vyrobeny z materiálů, které růstu bakterií a plísní brání. Některé inkubátory používané pro práci s buněčnými kulturami jsou vybavené dalšími součástmi, které riziko kontaminací snižují – např. sterilizují vnitřní atmosféru ultrafialovým zářením.

## **Kultivační média**

Kultivované buňky rostou v médiu, které do značné míry napodobuje extracelulární tekutinu. Kultivační médium zpravidla tvoří tenkou vrstvu kapaliny nad adherovanými buňkami, takže umožňuje dostatečně rychlou difúzi kyslíku a oxidu uhličitého. Obsahuje dostatečné množství živin, které umožňuje růst buněk po několik dní. Médium se mění zpravidla dvakrát až třikrát týdně.

Kultivační médium mít vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti a musí obsahovat ve vhodné koncentraci látky, které buňky potřebují pro život a proliferaci. Jde o vodné roztoky obsahující mnoho, někdy i několik desítek složek. Mezi nejvýznamnější látky obsažené v kultivačních médiích patří anorganické soli, pufrý, glukosa a případně i jiné zdroje energie, vitamíny, bílkoviny, růstové faktory, některé peptidy, mastné kyseliny a lipidy a stopové prvky.

Velké množství látek, jako jsou růstové faktory, stopové prvky, vitamíny apod., se může do média dodat přidávkem krevního séra. Rozdělení médií podle toho, zda jejich součástí je či není sérum, je asi nejvýznamnějším klasifikačním kritériem. Určitým přechodem mezi médii se sérem a bez něj jsou média s nízkým obsahem séra (kolem dvou procent ve srovnání s obvyklými deseti procenty u médií se sérem).

## **Sérum**

Přídavek séra v kultivačním médiu má celou řadu funkcí. Především do média doplní velkou řadu biologicky významných organických látek, jako jsou růstové faktory, inhibitory proteáz či některé látky významné pro adhezi buněk. Samotná koncentrace bílkovin je důležitá, neboť pomáhá buňkám odolávat mechanickému poškození. Sérum je také významným zdrojem součástí média, jejichž koncentrace je velmi nízká, přesto jsou pro růst kultury nezbytné – příkladem mohou být stopové prvky jako je zinek, selen, měď, mangan a další, vitamíny a podobně. Obecně můžeme říci, že přidávkem séra do média dodáme několik stovek biologicky významných sloučenin, z nichž velká část má zásadní vliv na růst buněčné kultury.

Pro suplementaci kultivačních médií se nejčastěji používá bovinní sérum, zvláště pak sérum získané z telecích fétů. Důvodem pro použití fetálního séra je vyšší obsah růstových faktorů, což umožňuje lepší proliferaci kultivovaných buněk. Kromě fetálního telecího séra je dostupná i řada dalších sér pro speciálnější aplikace. Jsou to séra vyrobená z krve různých

živočichů, např. koně, králíka apod. Séra nemusejí být izolovaná jen z krve fétů, ale i z krve novorozených zvířat (prekolostrální séra) či dospělých jedinců. V závislosti na stáří jedince se mění složení a koncentrace růstových faktorů v séru a tím i vliv na proliferaci, ale také diferenciaci kultivovaných buněk. Vedle běžných sér, která jsou pouze sterilizována filtrací, se prodávají i séra tepelně inaktivovaná, při jejichž použití je menší riziko přenosu virové infekce.

Obohacení kultivačního média sérem je na jednu stranu jednoduchou a zcela běžně používanou metodou, jak médium doplnit o velké množství potřebných součástí, má však i svá úskalí. Mezi hlavní problémy patří různé složení sér získaných z různých jedinců a nedefinovanost složení séra. Kvůli tomu se mění i růst a vlastnosti kultur, pokud se pěstují v médiích suplementovaných séry z různých výrobních šarží. Výrobci se snaží tento problém zmenšit tím, že se používají směsná séra získaná z krve většího počtu jedinců. Kromě toho bývá v případě potřeby možné požádat dodavatele o vzorky sér z různých šarží. Po jejich vyzkoušení umožňují někteří dodavatelé zarezervovat si určitou šarži, takže několik následujících dodávek bude mít stejné složení.

Dalším problémem je riziko přenosu infekce. Séra se běžně sterilizují filtrací, čímž se spolehlivě zabrání přenosu většiny bakterií a plísní, významně se sníží riziko přenosu mykoplasmat. Nebezpečí přenosu virů také klesá, nelze je však vyloučit; totéž platí o riziku přenosu prionů. Renomovaní výrobci testují séra na přítomnost nejdůležitějších patogenů. V řadě zemí jsou některé testy předepsané zákonnými předpisy, legislativa se však v různých státech liší. Obecně je třeba od dodavatele požadovat informaci o původu séra a o tom, jakým testům bylo podrobeno.

### **Bezsérová média**

Snaha o lepší definovanost kultivačního média a o eliminaci problémů, s nimiž je používání médií se sérem spojeno, vedla k vyvinutí bezsérových médií. Složení kultivačního média je v tomto případě mnohem komplexnější. Všechny potřebné mikronutrienty, růstové faktory a další látky se dodávají jednotlivě nebo v jednoduchých, dobře definovaných směsích. Příprava bezsérových médií je proto o něco náročnější, často bývá i dražší. Tato média jsou velmi dobře definovaná a odpadají obavy ze zavlečení infekce přenášené sérem, na druhou stranu



většina kultur roste v bezsérových médiích hůře než v médiích se sérem. Často je také nutné buněčnou kulturu na pěstování v médiu bez séra „zvykat“ – buňky se nejprve kultivují v některém z klasických médií se sérem a pak se toto médium postupně nahrazuje médiem s nízkým obsahem séra a bezsérovým médiem.

### **Anorganické soli a pufrující složky**

Vraťme se zpět ke složení „základního“ média. Nezbytnou součástí je vždy směs vhodných anorganických solí. Zajišťuje hlavní ionty nezbytné pro fyziologické funkce kultivovaných buněk. Anorganické soli se také největší měrou podílejí na udržení osmotického tlaku média. Kromě toho mají některé z nich, zejména uhličitany a fosfáty, zásadní význam při udržování stálého pH.

V zásadě se používá několik osvědčených směsí anorganických solí, které můžeme považovat za základ většiny běžných kultivačních médií. V závislosti na použitém pufrovacím systému je můžeme rozdělit do dvou skupin podle toho, jestli se hodí pro práci v normální atmosféře (taková média se používají např. pro oplachování buněk při různých manipulacích s kulturou, při pokusech atd.) nebo pro kultivaci v inkubátoru s vyšší koncentrací CO<sub>2</sub>.

Směs solí, která tvoří základ médií pro kultivaci v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>, obsahuje například tzv. Earlvův vyvážený roztok solí nebo Dulbecův roztok solí pufrovaný fosfáty. Naproti tomu pro práci v normální atmosféře se nejčastěji používají média založená na Hankově vyváženém roztoku solí.

Kromě anorganických pufrů se pro udržování stálého pH do kultivačních médií přidávají i vybrané organické pufrů. Nejčastěji se používají látky krátce označované HEPES a TES, k dispozici je ale ještě několik dalších tzv. biologických pufrů. Hodnota pak těchto látek je velmi blízká fyziologickému pH 7,4. Kromě toho jsou tyto pufrů v obvyklých koncentracích netoxické a prakticky neovlivňují fyziologické funkce kultivovaných buněk.

Do kultivačních médií se rutinně přidává acidobazický indikátor – fenolová červeň. Při pH 7,4 má jasně červenou barvu, která se směrem ke kyselé oblasti mění na žlutou, v alkaličtějším prostředí na fialovou. Přídavek indikátoru usnadňuje běžnou práci s buněčnými kulturami –

rostoucí buňky do média vylučují kyselé katabolity, zežloutnutí média je tedy známkou, že je nutné jej vyměnit.

### **Zdroje energie**

Další složkou kultivačního média je zdroj energie. Nejvýznamnější postavení má bezpochyby glukosa. Nezanedbatelnou měrou využívají buňky jako energetický substrát i L-glutamin, který rovněž bývá častou součástí médií. Vzácněji se namísto glukosy používají jiné sacharidy, například galaktosa nebo fruktosa. při jejich metabolizování tvoří buňky méně laktátu, takže médium tolik neokyselují.

### **Další složky médií**

Kultivační média dále obsahují různé směsi aminokyselin. Většina běžně používaných kultivačních médií obsahuje přinejmenším esenciální aminokyseliny, ostatní aminokyseliny mohou být dodány přídavkem séra.

Podobně jsou součástí médií vitaminy, především skupiny B. I v tomto případě se část vitaminů dodává se sérem.

Podle typu kultivovaných buněk se i do sérových médií někdy přidávají vhodné růstové faktory. Běžným doplňkem řady směsí je insulin (který má významnou mitogenní aktivitu), často přidávaný společně se selenem a transferrinem ve standardně používané směsi. Jiným častým doplňkem podporujícím růst buněk je hydrokortizon, případně se přidávají specifické látky většinou peptidického charakteru.

Zejména do bezsérových médií se doplňují i mastné kyseliny a lipidy a stopové prvky.

### **Antibiotika**

Zvláštní kapitolou, mluvíme-li o složení kultivačních médií, je použití antibiotik. Obecně se antibiotika často do médií přidávají, aby se zabránilo kontaminaci kultury bakteriemi. Tato

praxe je značně rozšířená, není však správná – antibiotika by se měla používat jen ve vybraných, dobře zdůvodněných případech, a nikoliv paušálně, jak se často děje.

Používání antibiotik může vést k tomu, že se pracuje s kulturou kontaminovanou skrytou infekcí. Při běžné práci se nedaří kontaminaci rozpoznat, přitom se zásadně mění vlastnosti buněk. Experimentální data získaná s takovými kulturami proto mohou být výrazně zkreslená.

Obecně platí, že přidáváním antibiotik do kultivačního média se zvyšuje riziko nesprávné manipulace s kulturou – pokud se pracuje bez antibiotik, nesprávná pracovní technika se zpravidla velmi brzy projeví kontaminací bakteriemi. V tom případě se zpravidla kontaminovaná kultura zlikviduje; opakované bakteriální kontaminace kultur pracovníky záhy donutí, aby přísně dodržovali správné pracovní postupy. Naproti tomu při práci s antibiotiky sice nedojde k rozmnožení bakterií, to však neznamená, že nemůže dojít ke kontaminaci kultury jinými buňkami, případně velmi obávanými mykoplazmaty, plísněmi, viry apod.

Musíme podotknout, že některá antibiotika mohou mít i v nízkých koncentracích nevelký, přesto však významný vliv na proliferaci buněk a jejich chování.

Antibiotika by se proto měla používat se zvláštní opatrností a jen je-li to opravdu nutné. Za rozumné lze považovat jejich použití při přípravě primární kultury, po získání buněk z externího zdroje nebo po některých operacích, při nichž je vysoké riziko kontaminace kultury bakteriemi z vnějšího prostředí – např. při rozmrazování uskladněných buněk. V každém případě by se antibiotika měla co nejdříve vysadit. S kulturou, která byla ošetřena antibiotiky, je třeba pracovat v karanténě, a to i nějakou dobu po jejich vysazení.

Nejčastěji se z antibiotik do médií přidává penicilin a streptomycin. Penicilin je velmi málo toxický, poměrně rychle se však v kultivačním médiu rozkládá. Streptomycin patří mezi výrazně alergenní látky, práce s ním je tedy potenciálně riskantní pro personál. Je rovněž toxický pro některé buňky.

Streptomycin se někdy nahrazuje gentamycinem, který má širší spektrum, nevýhodou je o něco vyšší cena. Jinou běžně používanou kombinací je penicilin a kanamycin.

V případě potřeby se k antibiotikům přidávají i antimykotika, nejčastěji amfotericin B nebo nystatin. Obecně platí, že antimykotika mívají na některé buněčné linie toxické účinky.

## **Výběr kultivačního média**

V současné době se běžně používá kolem deseti základních kultivačních médií. Ke každému z nich existuje celá řada nejrůznějších modifikací. Pokud jde o výběr média pro konkrétní linii kultivovaných buněk, neexistuje žádné spolehlivé obecně platné pravidlo. Volba kultivačního média je vždy empirická, byť se vychází ze zkušeností s podobnými buněčnými liniemi nebo z údajů, které byly publikovány jinými laboratořemi. Pokud se buněčná kultura kupuje z některé sbírky, je dodána i s doporučeným protokolem pro kultivaci včetně doporučení týkajícího se složení kultivačního média.

Při výběru média je třeba dát pozor, aby jeho složení nějakým způsobem neinterferovalo s plánovaným experimentem. Vzhledem k počtu složek, z nichž se kultivační média skládají, k tomu dochází poměrně často. Pokud se takový problém nepodaří vyřešit pomocí standardně dodávaných modifikací média, lze u některých výrobců objednat kultivační médium připravené dle vlastního předpisu.

## **Příprava kultivačního média**

Kultivační média je možné koupit hotová – stačí přidat sérum a další doplňky. Vzhledem k velké spotřebě je však nákup hotových médií náročný na skladovací prostor. Kromě toho má řada médií poměrně krátkou dobu použitelnosti (typicky kolem jednoho měsíce).

Proto se častěji kultivační média nakupují jako polotovary. Může jít o koncentrované roztoky (zpravidla 10×). Většinou koncentrovaný roztok nemůže obsahovat všechny složky – některé látky by se vysrážely, jiné nejsou dostatečně stabilní. Často bývají kyselější, než hotové médium, díky čemuž se zabrání precipitaci vápenatých a hořečnatých solí. Příprava média z koncentrátu pak kromě odpovídajícího naředění sterilní vodou zahrnuje i doplnění chybějících složek (typicky hydrogenuhličitanu sodného a L-glutaminu) a případně úpravu pH.

Z hlediska skladování jsou nejvýhodnější prášková média. Příprava kultivačního média z prášku je však o něco náročnější – vždy je nutné nastavit pH roztoku a médium následně sterilizovat.

Při přípravě kultivačních médií je nutné dodržet některé zásady. Je nutné používat čistou vodu, která je prostá i některých běžných kontaminantů – např. stopových množství kovových iontů, či endotoxinu. Rovněž pomůcky by měly být buď jednorázové, nebo odpovídajícím způsobem myté, aby byly zbavené nečistot, které by při práci s buněčnými kulturami vadily. Již jsme zmínili, že z téhož důvodu se používají chemikálie, které jsou určené a testované pro tkáňové kultury.

Pracovní postup při přípravě kultivačních médií musí být takový, aby nedošlo ke změně složení média, degradaci některých jeho složek nebo k vysrážení některých součástí. Zásobní roztoky, koncentrovaná média a prášková média se zpravidla uchovávají při 4 °C. Ředí a rozpouštějí se při pokojové teplotě v dostatečném objemu vody (alespoň 80 % výsledného objemu, jinak hrozí vysrážení hůře rozpustných součástí), obvykle se při rozpouštění nesmí zahřívat. Často se nejprve připravuje roztok média bez hydrogenuhličitanů – kyselé pH zabrání precipitaci solí vápníku a hořčíku – a pH se upravuje až po dokonalém rozpuštění všech součástí roztoku. Další složkou většiny médií, která se doplňuje dodatečně, je glutamin. Ve vodném roztoku se totiž pomalu rozkládá. Vznikající amoniak pak kultivační médium alkalizuje.

Sterilitu kultivačního média lze zajistit několika způsoby. Jednou možností je příprava média z koncentrovaného roztoku, který se již dodává sterilní. K ředění se používá čištěná voda sterilizovaná např. autoklávováním. Rovněž všechny doplňky do média musejí být k dispozici ve formě sterilních vodných roztoků. Samozřejmostí je použití sterilních pomůcek, buď jednorázových, nebo sterilizovaných autoklávováním či horkovzdušně. Problémem může být nastavení pH kultivačního média, neboť zajistit sterilitu pH-metrické elektrody je obtížné.

Jinou možností je připravit kultivační médium běžnými laboratorními postupy jako nesterilní roztok, nastavit všechny jeho parametry a teprve poté je sterilizovat. Nejčastěji se média sterilizují filtrací přes membránu s porozitou 0,22  $\mu\text{m}$ . Vzácněji se média sterilizují autoklávováním, k tomu však musí být přizpůsobeno jejich složení.

## **Skladování kultivačních médií**

Hotová kultivační média se skladují při 4 °C v temnu. Některá média je možné skladovat i zmražená, čímž se výrazně prodlouží doba jejich použitelnosti.

Obvykle se uvádí, že při skladování v chladničce lze médium použít do 1 měsíce od přípravy. Životnost kultivačního média je omezená především rozkladem glutaminu, ovšem v průběhu delšího skladování postupně ztrácí účinnost i růstové faktory, antiproteasy, vitaminy atd. Řada médií začne již po 14 dnech výrazněji měnit své vlastnosti včetně pH, lze proto doporučit přípravu médií do zásoby jen na 1 až 2 týdny. Výrazně kratší dobu použitelnosti mají média s antibiotiky – např. obvyklá směs penicilinu a streptomycinu ztrácí účinnost během pěti dnů.

## **Růst buněčné kultury**

Z praktického hlediska můžeme říci, že buňky v kultuře se množí přibližně exponenciálně (tzv. log-fáze) až do okamžiku, kdy se v důsledku kontaktní inhibice začne růst buněk zpomalovat (dosažení plató). V ideálním případě se buňky pěstují právě ve fázi exponenciálního růstu – krátce před dosažením plató se kultura nařadí a nasadí do nových kultivačních nádob v takové hustotě, aby opět rostla exponenciálně.

Pokud je buněk v kultuře velmi málo, je jejich množení výrazně pomalejší, nebo dokonce mohou buňky zaniknout apoptózou (tzv. lag-fáze růstu kultury). To je způsobeno tím, že normálně se buňky v kultuře vzájemně ovlivňují a produkují růstové faktory. Je-li počet buněk v kultuře příliš nízký, není koncentrace růstových faktorů uvolňovaných do média dostatečná a množení buněk se zpomalí nebo i zastaví. Pokud je potřeba pěstovat buňky v nízkých koncentracích, může být řešením použití tzv. kondicionovaného média – v kultivačním médiu se před použitím nechají po krátkou dobu (několik hodin až dní) růst vhodné, rychle se množící buňky (např. fibroblasty). Pak se médium sterilizuje filtrací a použije pro řídkou kulturu.

Různé buněčné linie se při nízkých hustotách chovají různě. Stejně tak se různé linie liší i svým chováním před dosažením plató. Většina buněčných kultur časem dosáhne konfluence – na kultivačním povrchu se vytvoří hustá, prakticky souvislá vrstva buněk, které se vzájemně

dotýkají. Konfluentní kultura je přitom uspořádána do jediné vrstvy (monolayer), pak se další množení buněk zastaví. Některé buněčné linie ovšem konfluence nikdy nedosáhnou (např. endotelie), dělení buněk se zastaví dříve – například jakmile se jednotlivé buňky začnou dotýkat třeba jen svými výběžky. Naproti tomu například některé nádorové buňky kontaktní inhibici postrádají, takže rostou i po vytvoření jednoduché konfluentní vrstvy. Začnou se vytvářet shluky buněk; pokud se taková kultura včas nenařadí, začnou buňky v centrech shluků odumírat, neboť nejsou dostatečně dobře zásobovány živinami.

Nechá-li se konfluentní kultura příliš dlouho v původní nádobě, začnou se buňky oddělovat od kultivačního povrchu a odumírat. Přitom se již omezeně dělí, takže celková hustota buněk zase začne klesat.

## **Subkultura**

Zpravidla krátce před koncem exponenciální fáze růstu se buněčné kultury tzv. pasážují, vytvářejí se subkultury. Adherentní buňky se uvolní od kultivačního povrchu i od sebe navzájem, nařadí se a přenesou se do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem.

K disociaci buněk se nejčastěji používá kombinace odstranění dvojmocných iontů (vápníku a hořčíku) z média a působení proteáz (nejčastěji trypsinu). Vápenaté a hořečnaté ionty jsou součástí mnoha adhezních faktorů. Z kultury se odstraní jednak jejím opláchnutím médiem, které vápník a hořčík neobsahuje, jednak pomocí chelátorů – nejčastěji EDTA, vzácněji např. citrátu. Bílkovinné adhezní molekuly se pak krátce natráví trypsinem. Po uvolnění se buněčná suspenze ošetří čerstvým kultivačním médiem se sérem (sérum obsahuje řadu antiproteáz, např.  $\alpha$ 1-antitrypsin) nebo s inhibítorem trypsinu.

Mnohem méně se při pasážování používají jiné postupy k uvolnění buněk, např. prudké snížení teploty nebo mechanická disociace.

## **Stárnutí kultury. Kontinuální linie.**

Buňky není možné kultivovat neomezeně. Po určitém počtu pasáží dochází k jejímu zestárnutí, buňky mění své vlastnosti a přestávají se dělit. Životnost buněčné kultury záleží na

typu kultivovaných buněk, jejich původu (např. embryonální buňky lze kultivovat déle než buňky z dospělého jedince) apod.

V některých případech k zestárnutí kultury nedojde, buněčnou linii je možné pěstovat neomezeně – mluvíme o kontinuálních nebo imortalizovaných kulturách. Někdy vznikne kontinuální linie spontánní transformací buněčné kultury, popřípadě jde o kultury nádorových buněk. Cíleně se dá imortalizace dosáhnout chemickou nebo virovou transformací buněk.

### **Sbírký buněčných kultur**

Buněčné kultury mohou vycházet z vlastních primokultur nebo z kultur získaných z jiných laboratoří. Kromě toho je možné získat buněčné linie ze sbírek. Mezi nejznámější patří The European Collection of Cell Cultures a American Type Cell Collection (ATCC). Z větších evropských sbírek zmiňme německou Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen a italskou sbírku Interlab. Dalšími často využívanými sbírkami je americká sbírka Národního ústavu všeobecných lékařských věd a japonská Riken Gene Bank.

### **Ověření (autentizace) buněčné kultury**

Buněčné kultury by se měly kontrolovat, aby se ověřilo, že nedošlo k jejich kontaminaci a přerostení jinou buněčnou linií. V případě sbírek buněčných kultur patří takové ověřování mezi základní postupy. Pokud jde o ověřování kultur pěstovaných v malých laboratořích, je možné je nechat provést u organizací, které veřejné sbírky kultur provozují, popřípadě se dá použít některého komerčně dostupného kitu.

Ověřování buněčných kultur bývá nejčastěji založeno na analýze zastoupení izoform vybraných enzymů. Nejčastěji se využívají izoenzymy glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, nukleosidfosforylasy, malátdehydrogenasy a laktátdehydrogenasy. Komerčně dostupný Authentikit (Innovative Chemistry) testuje izoformy celkem sedmi enzymů. Izoenzymovou analýzou lze ověřit především živočišný druh, z něhož buněčná linie pochází. Ke změně skladby izoenzymů ovšem dochází i při změně fenotypu kultivovaných buněk, tento přístup lze proto použít i ke sledování změn buněk v kultuře.



Mezi další metody patří například cytogenetická analýza založená na stanovení karyotypu a „proužkování“ chromozomů. Nověji se využívají techniky DNA analýzy, zejména tzv. „DNA otisky“. Využívá se kompletní štěpení genomové DNA endonukleasou *HinfI* následované Southernovým blottingem a značením multilokusovými próbami 33.6 nebo 33.15.

Rovněž je možné využít analýzu krátkých tandemových repetit pomocí multiplexové PCR s komerčními sadami primerů.

### **Kryoprezervace kultivovaných buněk**

Živé kultivované buňky je možné v případě potřeby zmrazit a po dlouhou dobu uschovat. Dá se k tomu využít i běžný hlubokomrazicí box s teplotou kolem  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v němž je možné přechovávat zmražené živé buňky po několik měsíců i let. Jde o levné řešení nenáročné na speciální vybavení, po delší době však takto přechovávané zmražené buňky ztrácejí životaschopnost. Větším laboratořím se proto vyplatí uschovávat buněčné kultury zmražené v parách kapalného dusíku. Tato možnost je sice závislá na pravidelných dodávkách kapalného dusíku a je z toho důvodu i dražší, živé buňky však lze uschovat po velmi dlouhou dobu.

Živé buňky je třeba zmrazit tak, aby nedošlo k jejich poškození krystaly vody. Do kultivačního média se proto přidává vhodné kryoprotektivum, nejčastěji dimethylsulfoxid (DMSO). Mnohem méně často se jako kryoprotektivum používá glycerol nebo jiné látky. Aby se zlepšilo přežívání buněk při zmrazení a rozmrazení, přidává se často do kultivačního média více séra.

Nejlepších výsledků se dosáhne, pokud se buňky zmrazují pomalu (obvykle se doporučuje ochlazování o  $1\text{ až }3\text{ }^{\circ}\text{C}$  za minutu). K tomu se dá použít speciálního programovatelného zařízení, které je ovšem poměrně nákladné. Levnější a běžně používanou variantou jsou speciální pomůcky na zmrazování buněk – zpravidla jde o vhodně izolované nádoby, často naplněné určitým nemrznoucím roztokem, který zabezpečí správnou rychlost chladnutí buněčné suspenze.

Zatímco mrznutí uchovávaných buněk musí probíhat pomalu, rozmrazení by mělo být naopak co nejrychlejší (v zásadě do 3 minut).

Kryoprezervace patří v buněčné laboratoři mezi základní postupy. Umožňuje vytvořit zálohu pro případ, že by došlo ke kontaminaci nebo zničení pěstované kultury. Nezastupitelné postavení má u kultur s omezenou životností, neboť po zestárnutí kultury se lze vrátit ke zmrazené nižší pasáži. Zmrazení buněčné kultury také umožňuje snížit provozní náklady a lépe načasovat pokusy – není nutné kulturu udržovat, pokud zrovna není potřeba pro experiment. Zmrazené buňky lze také poměrně snadno transportovat na suchém ledu.

Na druhou stranu má uschovávání zmrazených kultur i své nevýhody. Některé buňky se působením DMSO transformují. Kromě toho je zmrazení a rozmrazení buněk spojené s manipulacemi, při kterých může dojít ke kontaminaci kultury; rozmražená kultura by z toho důvodu měla být považována za potenciálně rizikovou a měla by projít karanténou.

### **Vybavení laboratoře buněčných kultur**

Pro práci s buněčnými kulturami je třeba disponovat poměrně rozsáhlým a nákladným vybavením. Hlavním důvodem je skutečnost, že práce s buněčnými kulturami musí být přísně sterilní. Jednak je třeba zabránit kontaminaci kultur zvenčí, jednak nesmí dojít ke kontaminaci kultur mezi sebou (tzv. zkříženým kontaminacím). Problémem přitom může být i kontaminace neviditelnými aerosoly, které vznikají při pipetování roztoků.

Je vhodné, aby se s buněčnými kulturami pracovalo ve vyhrazené laboratoři. V ideálním případě by mělo jít o čistou laboratoř, tj. o prostor který je tak technicky vybavený a podléhá takovým režimovým opatřením, aby se minimalizovalo množství kontaminujících částic ve vzduchu, byla zajištěna co největší čistota povrchů apod.

Za základní a nezbytné vybavení lze považovat laminární box. Toto zařízení umožňuje sterilní práci v prostředí s filtrovaným vzduchem. Většinou se používají boxy II. třídy bezpečnosti, které kromě ochrany zpracovávaného materiálu zajišťují i ochranu prostředí laboratoře a pracovníka před kontaminací materiálem.

Dalším nutným zařízením laboratoře buněčných kultur je inkubátor s řízeným obohacováním atmosféry oxidem uhličitým a inverzní mikroskop vybavený fázovým kontrastem. Kromě toho je potřeba mít k dispozici obvyklé laboratorní přístroje a pomůcky, jako je centrifuga, vodní lázeň, chladnička a mraznička, hlubokomrazící box atd.

Již jsme zmínili, že pro práci s buněčnými kulturami musí být zajištěn i speciální plastik a chemikálie testované pro kultivaci buněk.

## **Dezinfekce a sterilizace**

Dezinfekce a sterilizace je v laboratoři buněčných kultur potřebná jednak při přípravě pomůcek a materiálu, jednak pro dekontaminaci použitého materiálu a odpadu.

Z hlediska účinnosti můžeme rozlišit dezinfekci, rozšířenou dezinfekci a sterilizaci. Jako dezinfekci označujeme postupy, které snižují riziko kontaminace tím, že ničí velkou část mikroorganismů. Některé organismy nebo jejich formy (zejména spóry bakterií) však mohou být vůči dezinfekčním postupům odolné. V praxi se k dezinfekci používá celá řada přípravků, většinou založených na směsích oxidačních činidel (např. látek obsahujících chlór), alkoholů, aldehydů, kvartérních amoniových solí, tenzidů apod. Kromě toho se používají i některé jednoduché dezinfekční roztoky, např. lihobenzín či chloramin.

Jako sterilizaci označujeme postupy, které spolehlivě zničí všechny mikroorganismy, včetně cyst a spor.

Dezinfekční postupy, které se svou účinností již blíží sterilizaci, někdy označujeme jako tzv. rozšířenou dezinfekci. Přestože z formálního hlediska nejde o sterilizaci, je riziko, že by ošetřený materiál zůstal kontaminován mikroorganismy, malé. Nejčastěji se k rozšířené dezinfekci používá roztok kyseliny peroxyoctové (Persteril®), který při správné aplikaci spolehlivě likviduje všechny běžné mikroorganismy, nezničil by však např. některé cysty.

Ke sterilizaci materiálu se v laboratorních podmínkách používá nejčastěji autoklávování a horkovzdušná sterilizace. Při autoklávování se mikroorganismy ničí nasycenou vodní parou při vysoké teplotě (nejčastěji 121 °C) a zvýšeném tlaku. Jde o velmi spolehlivou sterilizační metodu, jejíž použití v praxi limituje jen objem laboratorních autoklávů. Nevýhodou také může být nutnost vhodného balení materiálu (například do speciálního papíru, který propouští horkou páru, v suchu se však jeho póry uzavřou) a potřeba materiál po sterilizaci dosušet. Autoklávovat lze i citlivější materiály včetně některých plastických hmot (např. polyethylen, polykarbonát, silikon; nevhodný k autoklávování je polystyren, částečně se může poškodit polypropylen).

Horkovzdušná sterilizace je jiná snadno dostupná sterilizační metoda. Materiál se ohřeje na vysokou teplotu (např. 180 °C po dobu 60 minut). Lze ji použít jen pro materiál, který takovou teplotu vydrží, tedy především pro sklo. Podle potřeby se materiál balí např. do hliníkové fólie. Horkovzdušnou sterilizaci nelze použít pro plasty s výjimkou teflonu a některých silikonů, ani pro gázu, buničitou vatu, pomůcky s plastovými či gumovými těsněními apod. Není vhodná ani pro sterilizaci ostrých nástrojů, neboť ostří se při opakovaném vystavení sterilizační teplotě rychle tupí.

Plastik pro buněčné kultury a další materiál a pomůcky se průmyslově sterilizuje  $\gamma$ -zářením. Jiné běžně používané průmyslové metody, jako je sterilizace ethylenoxidem nebo formaldehydem, nejsou vhodné, neboť i nepatrná rezidua těchto látek mohou být pro buňky toxická.

### **Sterilizace roztoků**

Roztoky a chemikálie lze také sterilizovat autoklávováním, pokud jsou dostatečně stabilní při zvýšených teplotách. K autoklávování roztoků je potřeba použít laboratorní autokláv, který pro to má zvláštní program – na konci sterilizačního cyklu se z komory nevypustí pára, dokud se prostor neochladí. Jinak by se totiž po snížení tlaku v komoře začal roztok přehřátý na 121 °C vařit a odpařením vody by se změnila jeho koncentrace.

Jinou možností je sterilizace roztoků filtrací. Filtrací přes membránu s póry o velikosti 0,22  $\mu\text{m}$  a menšími se odstraní většina bakterií a jejich spór. Mykoplasmata lze odstranit filtrací přes membránu o porozitě 0,1  $\mu\text{m}$ . Viry jsou ještě menší a teoreticky je nelze z roztoku běžně používanými postupy odfiltrovat. Ve skutečnosti však často adherují na větší částice, navíc je může vychytat vhodně zvolená membrána, přestože má větší porozitu. S výhodou lze totiž využít skutečnosti, že některé filtrační materiály efektivně vyváží z roztoku bílkoviny (např. nylonové membrány). Naproti tomu pro filtraci roztoků, které obsahují bílkovinné nebo peptidické složky (kultivační média po přidání séra, růstové faktory, roztoky pro potahování kultivačních nádob, trypsin atd.) je nutné použít membrány s nízkou vazebnou kapacitou pro bílkoviny. Míru vychytávání bílkovin na filtračních membránách uvádějí jejich výrobci. Je třeba dát pozor na to, že stejný typ polymeru (např. PES nebo nitrocelulosa) může podle způsobu výroby vychytávat bílkoviny různě intenzivně.

## **Prostorová dezinfekce a sterilizace**

Kromě dezinfekce a sterilizace materiálu a chemikálií se při práci s buněčnými kulturami používá i prostorová dezinfekce a sterilizace celé laboratoře, laminárního boxu apod.

Nejjednodušší je ozáření prostoru zářením UV-C pomocí germicidních lamp. Tím dochází jednak ke zničení mikroorganismů přímo zářením, jednak k ionizaci vzduchu, přičemž vznikají mikrobicidní koncentrace ozonu a dalších látek. Bohužel tato metoda není zcela spolehlivá, neboť místa, která jsou zastíněná, nemusejí být dostatečně účinně dezinfikována.

Prostorová sterilizace se nejčastěji provádí zaplynováním celé místnosti nebo laminárního boxu formaldehydem. Po expozici je možné formaldehyd odstranit reakcí se čpavkem a odvětrat. Jde o velmi účinnou metodu, pracuje se při ní však s vysokými koncentracemi jedovatých látek.

## **Kontaminace buněčné kultury**

Příčinou kontaminace buněčných kultur bývají nejčastěji běžné druhy bakterií, které jsou všudypřítomné v okolním prostředí – například Gram pozitivní koky, Gram negativní koliformní bakterie apod. Pracovníci s mnohaletými zkušenostmi s kultivováním buněk tvrdí, že k bakteriálním kontaminacím kultur dochází častěji v některých částech roku (typicky začátkem podzimu), kdy se pravidelně zvyšuje množství bakterií či jejich spór ve vzduchu.

Velmi obávaným kontaminantem jsou mykoplasmata a příbuzné druhy bakterií. Jde o intracelulární parazity, které na rozdíl od ostatních bakterií nelze snadno rozpoznat při mikroskopické kontrole kultury. Přítomnost mykoplasmat vede ke zpomalení proliferace buněk a má dalekosáhlý vliv na vlastnosti kultury. Buněčné kultury by měly být pravidelně testovány na přítomnost mykoplasmat. Používají se jednak metody založené na detekci mykoplasmatické DNA pomocí PCR, jednak fluorescenční barvení buněk na DNA – pro kontaminaci mykoplasmaty je typická přítomnost extranukleární DNA. Mykoplasmata jsou velmi drobné organismy; objeví-li se v kultuře mykoplasmatická infekce, je velké nebezpečí, že se zanesou i do dalších kultur, se kterými se v laboratoři pracuje.

Vzácněji dochází ke kontaminaci kultur plísněmi a kvasinkami – nejčastěji se tak stává u buněk dlouhodobě pěstovaných s antibiotiky. Houby rostou mnohem pomaleji než bakterie a mají typickou, nezaměnitelnou morfologii.

Virové infekce kultur jsou poměrně vzácné, jsou však obtížně detegovatelné. Nejspíše na ně upozorní makroskopická kontrola kultury – objevují se plaky, ložiska, v nichž došlo k buněčné lýze.

Na tomto místě znovu upozorňuji na skutečnost, že paušální používání antibiotik sice zabrání kontaminaci kultury některými bakteriálními kmeny, zároveň však zvyšuje riziko skryté infekce, infekce mykoplasmaty, houbami a viry, ale i zkřížené kontaminace jinými buněčnými liniemi.

Dojde-li ke kontaminaci kultury, je zpravidla nejlepším řešením ji zlikvidovat, alespoň částečně asanovat laboratoř a inkubátor, připravit nová kultivační média a pak kulturu obnovit ze zmražené zálohy. Pokud dojde k infekci více kultur najednou nebo ke kontaminaci mykoplasmaty, je vhodné laboratoř kompletně asanovat, provést její prostorovou sterilizaci, připravit nové roztoky a kultury obnovit ze zmražených záloh.

V případě, že není možné infikovanou kulturu vyhodit, lze se pokusit o její léčbu kombinací antibiotik a případně i antimykotik. Je ovšem nutné mít na paměti, že úspěch je nejistý a nadto jde o postup značně riskantní. Bakteriální infekce se mezi kulturami snadno šíří aerosoly, které vznikají při základních postupech včetně pipetování a které bývají poměrně stabilní (přetrvávají ve vzduchu řadu minut), snadno proto dojde k dalším kontaminacím. Zásadně lze léčbu doporučit jen u vzácných kultur, za něž není k dispozici náhrada.

## **Počítání buněk**

Určení počtu buněk patří mezi základní postupy jak při jejich samotném pěstování (například pro stanovení hustoty buněk nasazovaných po pasáži), tak v pokusech s kultivovanými buňkami. Používá se řada postupů.

V řadě případů stačí počet buněk stanovit odhadem nebo semikvantitativně – odhaduje se například počet buněk v zorném poli mikroskopu při daném zvětšení, u adherentních buněk procento kultivačního povrchu pokryté buňkami apod.

Pro přesné stanovení počtu buněk je stále zlatým standardem počítání v cytometrické komůrce (např. v Bürkerově nebo v Türkově). Přesnost této metody je ovšem vyvážena její pracností a časovou náročností. Suspenze buněk se před počítáním většinou mísí s roztokem trypanové modři – barvivem, které difunduje přes plasmatickou membránu do intracelulárního prostoru, ze živých buněk je však následně rychle transportováno opět ven. Podle toho jaká část buněk se trypanovou modří obarví, lze pak snadno určit procento živých a mrtvých buněk ve vzorku.

Rychlejší metodou je průtoková cytometrie. Nevýhodou, kromě potřeby poměrně drahého přístroje, je ovšem nutnost kalibrovat přístroj na každý buněčný typ.

Stanovuje-li se počet buněk opakovaně za přesně definovaných podmínek, lze s výhodou využít rozptylu světla na buněčné suspenzi a měřit hustotu suspenze turbidimetricky. Další možností je stanovení koncentrace některých buněčných součástí – nejčastěji se měří množství celkové bílkoviny ve vzorku (je ovšem nutné zabránit zkreslení bílkoviny séra, které se přidává do kultivačního média) nebo koncentrace DNA. Někdy se také využívá stanovení aktivity vhodných enzymů. V úvahu připadá také stanovení celkové metabolické aktivity buněk pomocí MTT testu – využívá se redukce derivátu tetrazoliové modři (MTT) enzymy dýchacího řetězce.

## **Doporučená literatura**

Jako základní publikaci pro všechny zájemce o buněčné kultury lze doporučit knihu Basic Cell Culture sestavenou J. M. Davisem (1).

Velmi užitečnou příručkou, která stručně, ale výstižně popisuje nejdůležitější techniky a uvádí i vybrané protokoly, je publikace Fundamental Techniques in Cell Culture ... a Laboratory Handbook (2). Jako svou firemní publikaci ji v r. 2001 vydala společnost Sigma-Aldrich. Bohužel v současné době již není tato příručka k mání, lze ji však najít v příručních knihovnách mnoha laboratoří.

Jinou užitečnou knihou, která popisuje mnoho potřebných protokolů, je publikace sestavená R. I. Freshneyem *Animal Cell Culture*.

## **Literatura**

1. *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. J.M.Davis (ed.) 2<sup>nd</sup> Ed., Oxford University Press, Oxford. 2002. ISBN 0 19 963853 5
2. *Fundamental Techniques in Cell Culture ... a Laboratory Handbook*. Sigma-Aldrich Co., 2001
3. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. R.I.Freshney (ed.), 2<sup>nd</sup> Ed., Oxford University Press. Oxford, 1992. ISBN 0 19 963213 8