

Základní techniky práce s tkáňovými kulturami

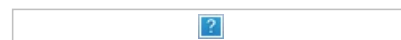
Výzkum v lékařské biochemii ani v dalších biomedicínských oborech se v současnosti – a změnu nelze v dohledné době vůbec očekávat – neobejde bez experimentů na živých organismech. Pokusy na laboratorních zvířatech jsou však nákladné a z mnoha důvodů náročné (časově, personálně, požadavky na vybavení, komplikují je interindividuální rozdíly mezi zvířaty, ale i intraindividuální proměnlivost celého organismu – např. cirkadiánní a roční biologické rytmy). Pominout nelze ani diskutovanou etickou stránku pokusů se živými zvířaty. V některých případech také není výhodné dělat pokus na celém organismu, orgánu či tkáni, ale je třeba zkoumat vlastnosti pouze určitého typu buněk. V posledních desetiletích si proto nelze základní medicínský výzkum představit bez dalšího experimentálního nástroje: tkáňových kultur.

Historie

Historie tkáňových kultur začíná už na konci devatenáctého století: kolem roku **1885 Roux** dokázal po určitou dobu udržet živé explantované kuřecí embryonální buňky v uměle připraveném médiu a několik dalších autorů dosáhlo v té době podobných výsledků. Nedařilo se však, aby se buňky dělily jako za podmínek *in vivo*. Ještě na konci 19. století se také podařilo zmrazit živé buňky a opět je rozmrazit, čehož se začalo využívat při inseminaci dobytka. Na přelomu 19. a 20. století dokázal **Ross Harrison**, že z nervové tkáně vyňaté z žabích embryí a uzavřené do komůrky s lymfou žáby vyrůstají nově vytvořené axony. Konečně ve čtyřicátých letech 20. století se objevily první úspěšné pokusy o založení buněčné kultury, v níž by se buňky množily a která by přežívala po delší, byť omezenou dobu. Techniky tkáňových kultur se postupně zdokonalovaly a výsledky začínaly být stále spolehlivější. Od osmdesátých let se tak tkáňové kultury staly běžným nástrojem nejen pro výzkum, ale začaly se používat i průmyslově k výrobě protilátek, některých léků a chemikálií. Zcela nepostradatelné jsou tyto metody pro molekulární biologii, vývoj nových léčiv apod.

Práce s tkáňovými kulturami

Práce s tkáňovými kulturami se v některých ohledech liší od ostatních technik používaných v biochemii. V první řadě je nutné, aby veškeré používané pomůcky a chemikálie byly sterilní a aby neobsahovaly některé toxické látky, které je jinak ve stopových množstvích běžně kontaminují. Kromě obvyklého vybavení jsou navíc nutné některé speciální přístroje a pomůcky. Proto jsou tyto techniky poměrně nákladné a vyžadují zvlášť vybudované laboratoře a vyškolený personál.



Principiálně má práce s každou buněčnou linií **několik fází**:

1. izolace buněčného kmene
2. udržování buněčné linie a její expanze
3. využití namnožených buněk v pokusu.

Většina buněčných linií má **omezenou životnost**, tj. podléhá stárnutí a po určité době se buňky přestanou dělit. Pouze některé tkáňové kultury jsou nesmrtelné – zpravidla jde o buňky získané z nádorů nebo uměle immortalizované vnesením vhodných genů. V tom případě se hovoří o **kontinuálních buněčných liniích**. I v nich si buňky obvykle zachovávají schopnost regulace buněčného dělení. Pokud ji ztratí a dělí se nekontrolovaně, mluvíme o **transformované** buněčné linii.

Velká většina buněčných linií vyžaduje k růstu **vhodný povrch** (dnes nejčastěji polystyren) – **adherentní** kultury, jen některé typy buněk dokáží přežívat a dělit se v **suspenzi**. Buňky se pěstují v **kultivačních nádobách** (lahvích, Petriho miskách apod.) ve speciálních **kultivačních médiích**. Ta obsahují potřebné ionty, pufrý, zdroje energie, aminokyseliny, vitaminy, růstové faktory a další pomocné látky. Směs potřebných růstových faktorů, stopových prvků a dalších látek potřebných v nízkých koncentracích se obvykle dodává přidávkem **fetálního telecího séra**. Pro optimální růst je třeba tkáňové kultury pěstovat ve sterilním prostředí se stálou teplotou kolem 37 °C a zvlhčenou atmosférou se zvýšeným obsahem oxidu uhličitého.

Nasazením buněk izolovaných z pokusného zvířete (nebo vzácněji např. z bioptického vzorku) vzniká tzv. **primokultura**. Buňky se postupně dělí, až v ideálním případě vytvoří na povrchu kultivační nádoby souvislou (konfluentní) jednoduchou vrstvu (monolayer). Pokud nejde o buňky transformované, přestane se konfluentní kultura dále rozrůstat.

Je-li potřeba s buněčnou linií dále pracovat, uvolní se zpravidla krátce před dosažením konfluence buňky od povrchu kultivační nádoby (mechanicky, pomocí některých enzymů – trypsinu, kolagenázy, dispázy, nebo pomocí chelátorů dvojmocných iontů – EDTA, citrát), vzniklá suspenze se naředí a nasadí do nových kultivačních nádob. Celý postup se označuje jako **pasáž**, nové kultury se říká **subkultura**.

Odkazy

Související články

- Buněčné kultury

- Kultivace buněk a tkání in vitro, význam v medicíně

Zdroj

Vejražka, M.: *Základní techniky práce s tkáňovými kulturami*. Praha, 2004

Reference

1. Corning Inc.. *Ultra-low attachment culture flasks* [online]. [cit. 2010-02-21]. <catalog2.corning.com/Lifesciences/images/costar_small/25cm2_Ultra_Low_Flask_sm.jpg>.