

Toto dílo podléhá licenci Creative Commons 4.0 BY-SA



# Úvod do buněčných a tkáňových kultur

**Roman Matějka, Lucie Bačáková**



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



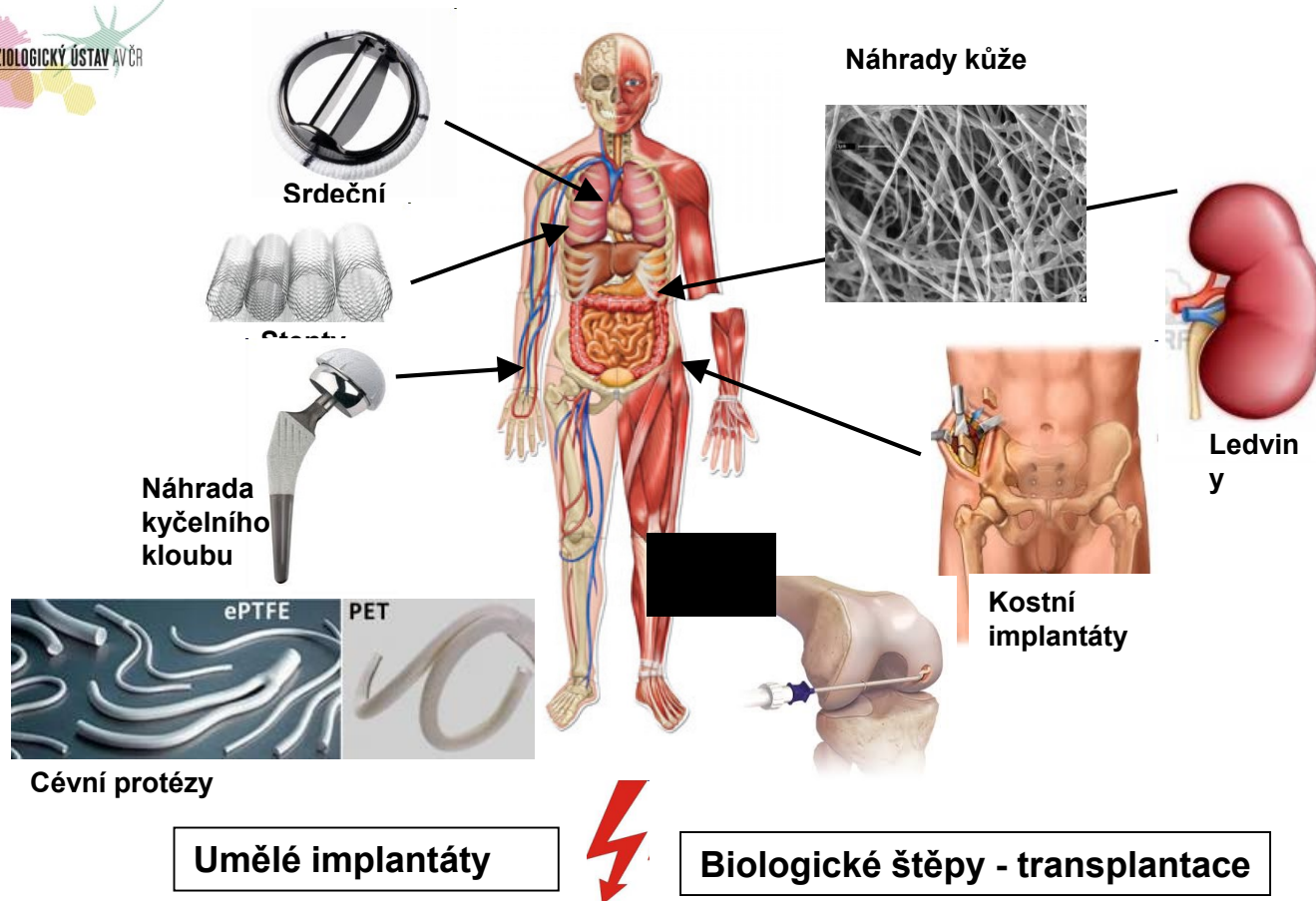
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Vzniklo za podpory projektu Biomedicínské inženýrství pro znalostní ekonomiku  
reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16\_018/0002242

# Význam tkáňových/buněčných kultur

- Snaha je minimalizace pokusech na zvířatech
- Buněčná kultura vytváří modelový – izolovaný – systém
  - Planární podmínky růstu
  - Dediferenciace kultury – změna chování buněk
  - Není možné zajistit komplexní podmínky in-vivo systému
- Regenerativní medicína a tkáňové inženýrství
  - Funkcionalizované náhrady tkání a orgánů
  - Funkcionalizované léčiva

# Tkáňové inženýrství



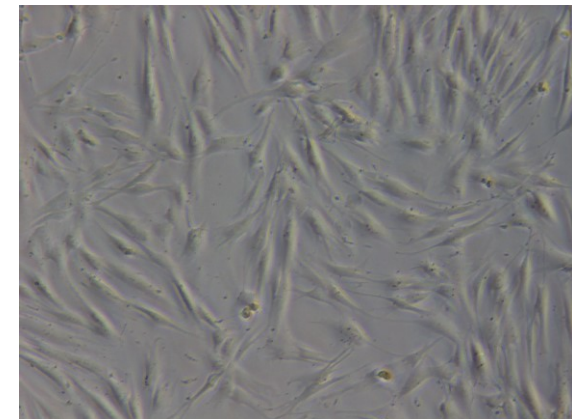
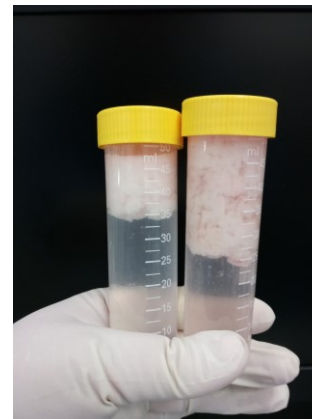
vlastní obrázky autorů

# Historie

- 1885 Wilhelm Roux – tkáň kuřecího embrya
  - Teplý solný roztok
  - Udržel tkáň při životě několik dní
- Ross Granville Harrison – nervové buňky z žabího rárodu
  - Problém s kontaminací → aseptická práce, autoklávování
  - Udržel buňky při životě více než 5 týdnů
- 1910 Montrose Burrows a Alexis Carrel – zavedení kultivace in-vitro
  - Kultivační médium
  - Kultivační substráty

# Získání buněčné kultury

- Izolace buněčného typu z rostliny nebo živočicha
  - Mechanické rozvolnění tkáně
  - Enzymatické natrávení tkáně - kolagenáza, elastáza nebo trypsin
  - Gradientní centrifugace – separace složek
- Primokultura – fenotypizované buňky
- Kmenové buňky – „univerzální“ buňky
- Buněčná proliferace
  - → konfluentní stav
  - → pasážování



vlastní obrázky autorů

# Buněčné linie

- Postupným dělením dochází ke zkracování telomer
- Hayflickův limit – ca. 50 dělení – senescentní buňky, buněčná smrt
- **Nádorové, imortalizované buňky**
  - Kontinuální buněčná linie
  - Neomezený počet dělení
  - 1951 – Henrieta Lacks – HeLa karcinom děložního čípku

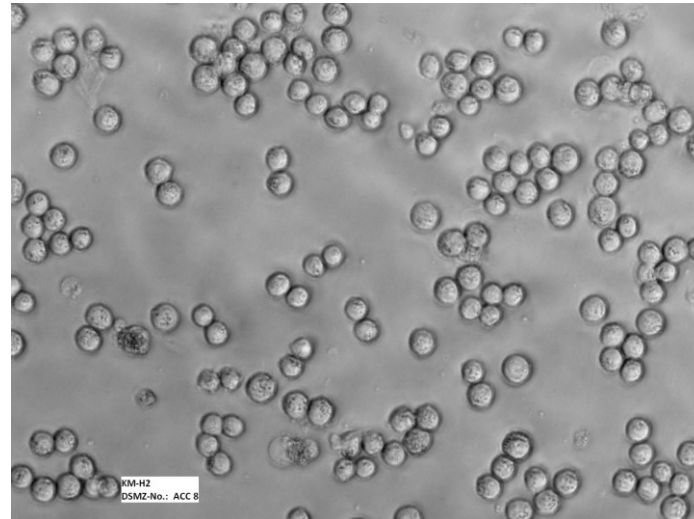


# Morfologie buněčných kultur

- Buňky suspenzní
  - Buňky „kulovitého“ tvaru – homogenně v kultivačním médiu - suspenze
  - Rotační bioreaktory, třepačky apod.
  - Hematopoetické buňky



<https://www.fishersci.com>



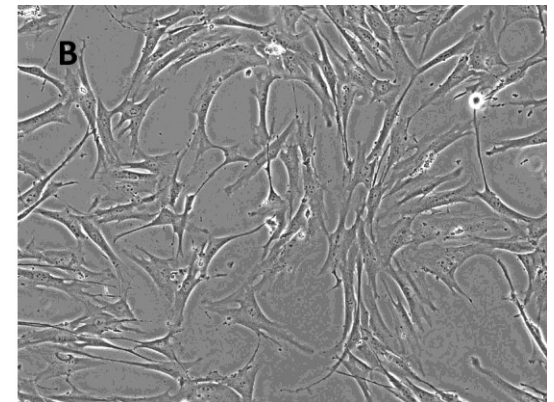
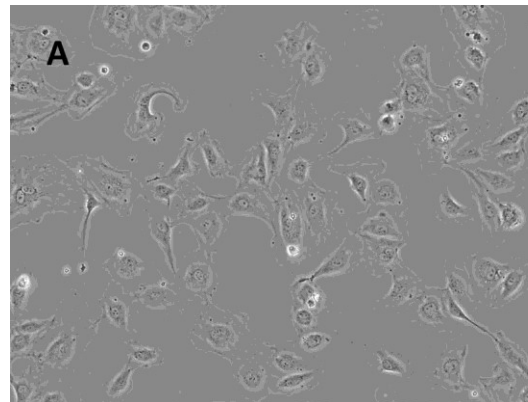
<https://www.microscopyu.com/>

# Morfologie buněčných kultur

- Buňky adherentní (přisedlé)
  - Růst na povrchu – adheze na povrch
  - Vyžadují kontakt s mezibuněčnou hmotou – dno kultivační nádoby
  - V případě že nemůžou adherovat dochází k apoptóze (anoikis – bezdomova)
  - Rozdílný tvar pro různé buněčné typy



<https://www.fishersci.com>



vlastní obrázky autorů



# Podmínky pro růst buněk in-vitro

- Snaha je vytvořit fyziologické podmínky
- Teplota 37 °C
- Atmosféra obohacená o 5 % CO<sub>2</sub> – odpovídá poměrům extracelulární tekutiny, udržení pH, uhličitanový pufr
- Relativní vlhkost >90 % - omezení odparu kultivačního média a změny osmotických poměrů
- Buněčné inkubátory



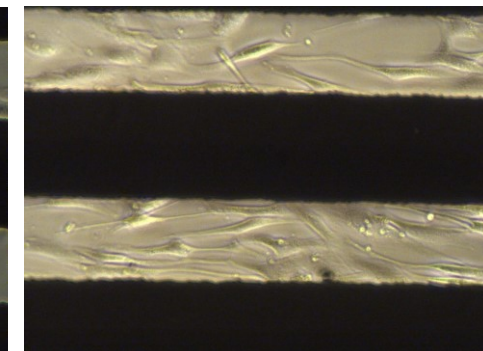
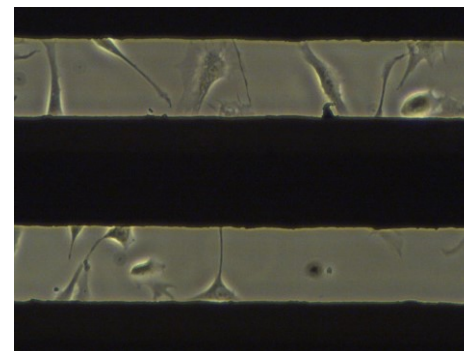
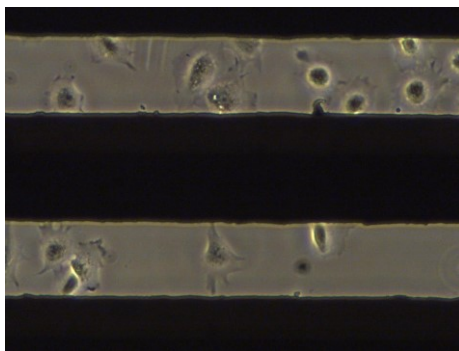
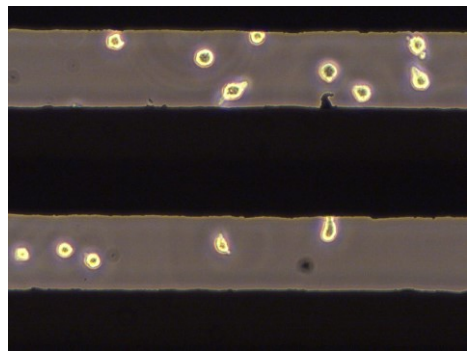
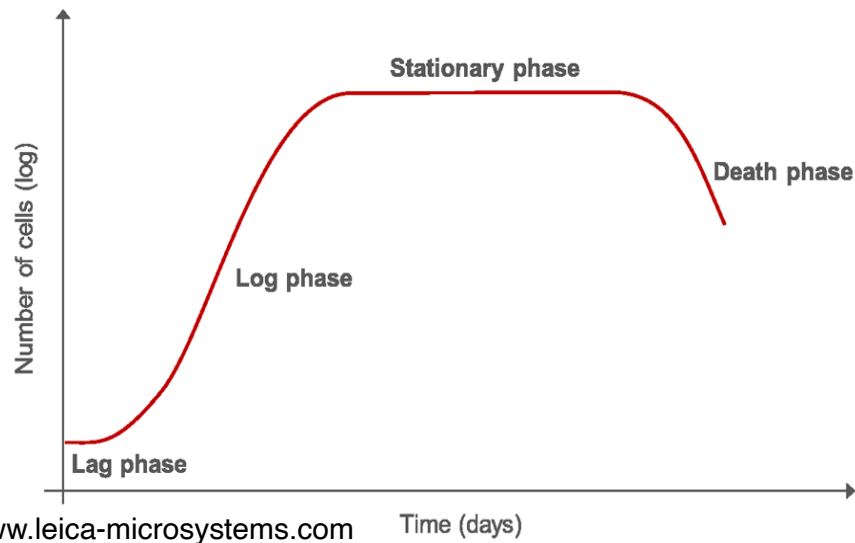
# Kultivační médium

- Izotonický roztok, pH 7,4 optimálně, 280-320 mOsm
- Anorganické ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ),
- Glukózu nebo vyšší cukry jako zdroj energie
- Aminokyseliny a vitamíny, antibiotika, antimikotika
- Fetální hovězí sérum – zdroj růstových faktorů, hormonů, proteiny umožňující adhezy
  - Rozdílné šarže
  - Bezsérová média
- Indikace pH – fenolová červeň
- alfa-MEM, DMEM, EBM2 (EGM2).....



# Růst buněk - proliferace

- Růstová křivka buněk 3 (resp. 4 fáze)



vlastní obrázky autorů

# Růst buněk - proliferace

- **LAG-FÁZE:** ahdeze buněk na povrch, rozprostření
  - U linií ca do 30 minut
  - U primokultur může doba výrazně delší – hodiny až dny
- **LOG-FÁZE:** buňky se množí geometrickou řadou. Růst probíhá tou nejvyšší rychlostí, časem dochází k vyčerpání živin z prostředí, rychlost růstu se zpomaluje.
- **STACIONÁRNÍ FÁZE:** živiny jsou vyčerpány, dochází k hromadění metabolitů; je pozastaven růst – bakterie se nemnoží, ale ani nehynou, udržují bazální metabolismus.