

578.085.23

PRAKTICKÉ MODIFIKACE MÉDIÍ PRO TKÁŇOVÉ KULTURY

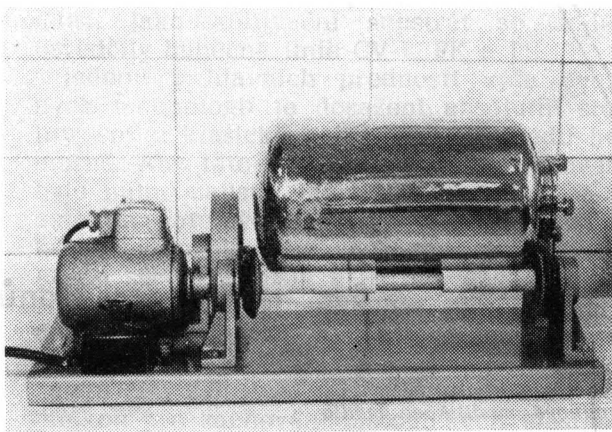
V. PLAISNER, R. BENDA, J. ČINÁTL, V. HRONOVSKÝ

Rychle se rozvíjející technika tkáňových kultur nesporně ovlivnila většinu biologických oborů. Cílem tohoto sdělení je upozornit na nové možnosti, které přináší technologie práškovaných autoklávovatelných médií v modifikaci růstové, udržovací a v modifikaci

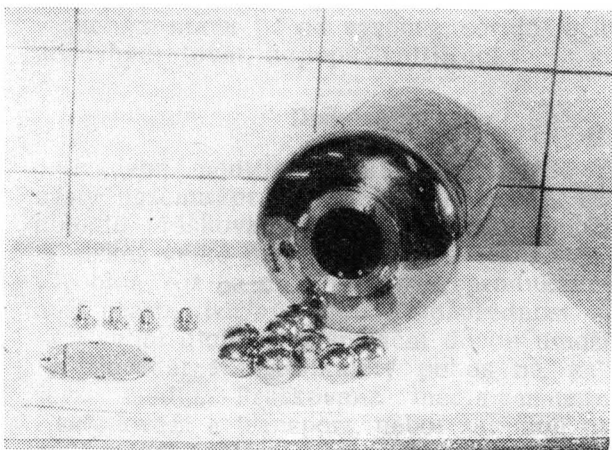
s pufrací schopností v neupravené atmosféře, spolu s technologií radiační sterilizace séra a dalších neautoklávovatelných ingrediencí. Vzhledem k zaměření pracoviště zdůrazňujeme virologické aspekty, věříme však, že využitelnost uvedených postupů bude širší.

Metodika a výsledky

Příprava médií pro tkáňové kultury ve formě zásobních práškových homogenizátů (1) byla ověřena na širokém souboru nejpoužívanějších médií (3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 20). Jednoduchá technologie spočívá v homogenizaci všech složek média v hermeticky uzavřeném kulovém mlýnu z netoxické nerezavějící ocele (obr. 1). Jelikož některé složky tkáňových médií, např. většina anorganických solí a cholin chlorid jsou silně hygroskopické, je nutno tyto ingredience předem pečlivě vysušit, což provádíme při teplotě 105 °C. Hotový produkt, který si podržuje standardní kvalitu po dobu nejméně 3–4 let, vyžaduje pouze jedinou péči, a to ochranu před zvlhnutím. Není třeba jej uchovávat v chladu.



Obr. 1. Kulový mlýn pro přípravu práškových médií
1a: Celkový pohled



1b: Otevřená mlecí nádoba s částečně vysypanými mlecími koulemi, víko, těsnění, uzavírací matky

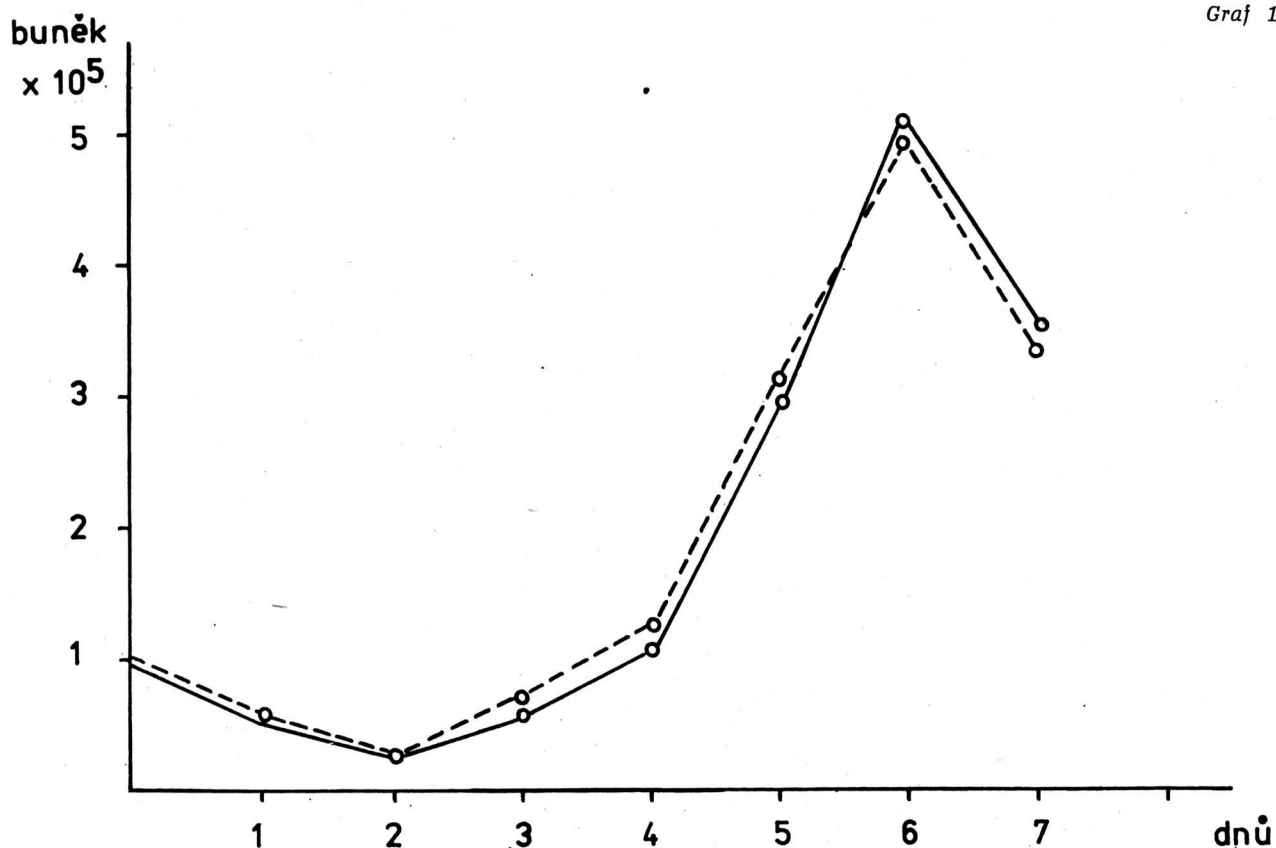
Autoklávatelná média (17) jsou logickým pokračováním při zjednodušování aplikace práškových médií pro kultivaci buněk. Z řady tkáňových médií (3, 4, 5, 7, 12, 13, 14), na kterých byla tato technologie u nás vyzkoušena, dosáhla největšího využití média MEM a RPMI 1640 (4, 13), která pokrývají nutriční potřeby všech testovaných linií (AM-57, CV-1,

BHK 21-K13, Dede, GMK, HeLa, Hep-2, KB, L, LLC-MK 2, PK, PS, PtK-1, SOC, Vero) i primokultur (králíčí a opičí ledvina, kuřecí a myší embryo, lidské embryonální plíce, krysí kostní dřev). Hlavní podmínkou úspěchu tepelné sterilizace uvedených médií je přítomnost ochranného jantaranového pufru ve složení: jantaran sodný 100 mg a kyselina jantarová 75 mg na 1 litr média. Pufr, jehož navážku připravujeme jako nedílnou součást práškového homogenizátu, udržuje pH média v rozmezí 4–4,5 a zabraňuje tepelné inaktivaci ostatních složek média. Jedinou složkou tkáňových médií, kterou nelze sterilizovat autoklávkem, je glutamin (15). Tato aminokyselina má i další negativní vlastnosti, zejména nepatrnou stabilitu v roztoku a značnou toxicitu rozkladných produktů (6, 19). Jelikož sestavení speciálního bezglutaminového média bylo úspěšné (16), bylo i naší snahou nahradit glutamin v citovaných tkáňových médiích, což se podařilo následující směsí: l — alanin 300 mg, l — asparagin 100 mg, l — glutamová kyselina 50 mg a pyrohroznán sodný 200 mg na 1 litr média (viz graf 1). Tato směs je autoklávatelná a připravujeme ji tedy rovněž jako součást práškového homogenizátu. Sterilizaci autoklávkem provádíme 30 minut při 120 °C a přetlaku 1 atm. Rovněž 7,5% kyselý uhličitán sodný, potřebný k úpravě kultivačního pH médií, lze bez potíží sterilizovat autoklávkem, pokud plníme lahve tak, aby nad hladinou zbývalo co nejméně vzduchu.

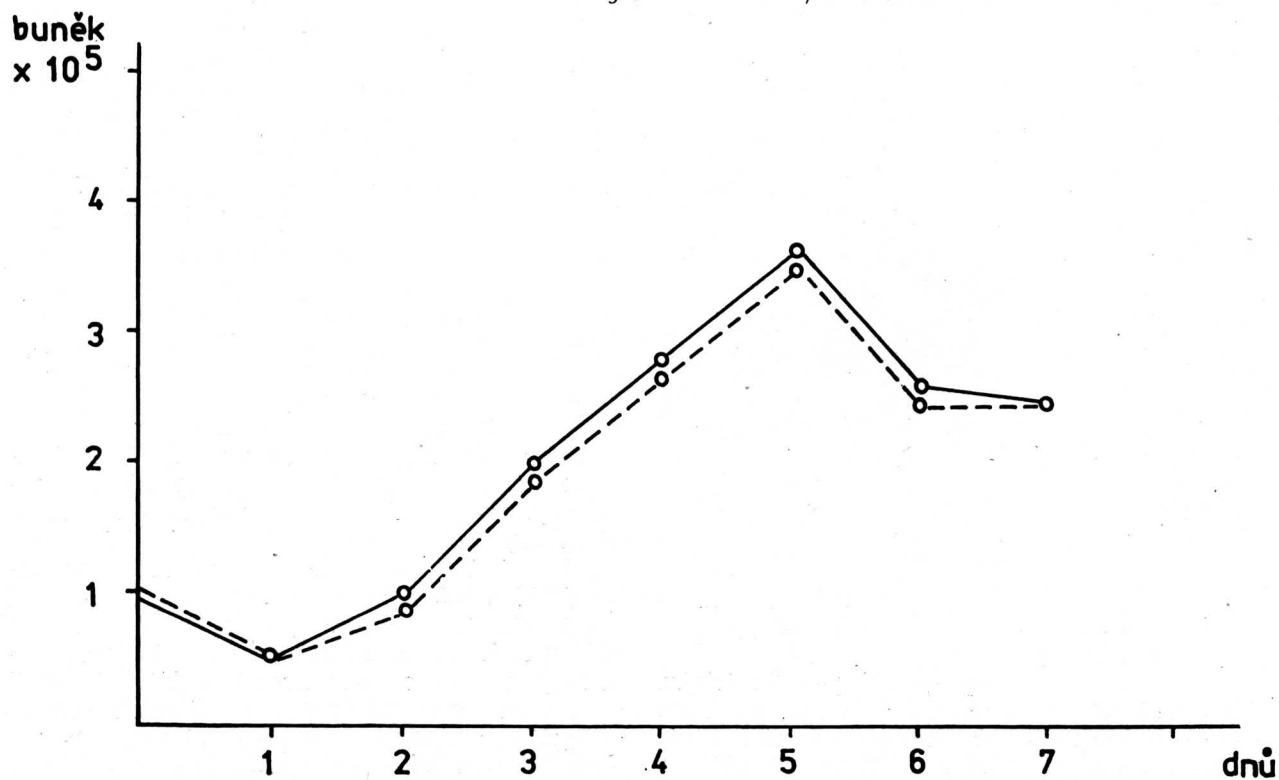
Značnou důležitost, zejména při virologické aplikaci, mají udržovací tkáňová média. Dobrých výsledků jsme dosáhli s modifikací, kde glukóza byla nahrazena stejným váhovým množstvím galaktózy a pyrohroznanu sodného v poměru 4 : 1. Omezení přívodu rychle zužitkovatelného zdroje energie snižuje počáteční růstovou aktivitu buněk a prodlužuje jejich životnost v monolayeru. Tento efekt, který podle našich zkušeností dovoluje nejméně 14denní přežívání buněk bez vzniku nespecifických degenerativních změn, má nesporný význam např. při pomnožování a titracích virů charakterizovaných pomalou reprodukcí v tkáňové kultuře (8, 18).

Autoklávkovaných médií lze využít i pro kultivaci buněk v neupravené atmosféře. Jantaranový pufr, nezbytný pro tepelnou sterilizaci médií, může v 10–15krát zvýšené koncentraci zajistit i relativně dlouhodobou stabilizaci pH v neupravené atmosféře. Kultivační pH v takovém případě upravujeme 6% hydroxidem sodným, který rovněž sterilizujeme autoklávkem. Takto připravená média úspěšně používáme pro pěstování buněčných kultur v Petriho miskách, pro adsorpci viru k buňkám na sklíčkách, pro pěstování orgánových kultur, pro suspenzní kultivaci buněk a všude tam, kde jsme se dosud neobešli bez nákladného a nepřilíš spolehlivého upravování kultivační atmosféry se zvýšeným obsahem kys-

Graf 1



Růstová křivka buněčné linie Dede na médiu RPMI 1640 z 5% telecího séra
 Plnou čarou: kontrola — médium s glutaminem
 Přerušovanou čarou: bezglutaminová modifikace média



Růstová křivka buněčné linie CV-1 na médiu MEM z 5% telecího séra
 Plnou čarou: kontrola — sérum sterilizované filtrací
 Přerušovanou čarou: radiálně sterilizované sérum (tamtéž šarže)

ličníku uhličitého. Největšího efektu jsme dosáhli při zavedení modifikované mikrometody plakování virů na plexisklových panelech (2, 8), kde jsme byli zejména zbaveni potřeby příliš pracného a nákladného Leibowitzova média L-15. S využitím médií MEM a RPMI 1640, modifikovaných výše popsaným způsobem a obohacených 0,5 % methylcelulózou (Methocel 15 CPS, Tylose 40 CPS) se podařilo plakovat virus klíšťové encefalitidy, Omské hemorragické horečky a dengue typ 2 a 4 z rodu Flavivirus, virus Chikungunya z rodu Alphavirus a virus Krymské hemorragické horečky, přesto že některé ze studovaných agens nevyvolávají cytopatické změny v běžné kultuře. Samozřejmě, že dobře plakují i všechny viry jiných rodů, vyvolávající zřetelný cytopatický efekt na buňkách in vitro, např. virus herpes simplex, virus vakcinie a další. Jako kultivační substrát se nejlépe osvědčily buněčné linie CV-1, PK a PS.

Jednou z hlavních předností výše uvedených technologií je dosažení absolutní sterility, což u klasických filtrovaných médií není možné. Aby tato přednost zůstala zachována, bylo nutno zajistit naprostou sterilitu i u neautoklávatelných ingrediencí nezbytných pro kultivaci buněk in vitro. K těm počítáme zejména sérum, trypsin a již uvedený glutamin, i když není nezbytný. Rovněž zde se podařilo dosáhnout naprosté sterility, a to ozářením paprsky gama. Plně spolehlivá sterilizační dávka činí 2,5 Mrad, přičemž nezbytnou podmínkou pro zachování biologických vlastností ozařované látky (viz graf 2) je minimální obsah vody, rozhodně nepřevyšující 1 %. Tento nízký obsah vody nečiní potíže u trypsinu a glutaminu, neboť tyto substance dostáváme v suchém stavu již od výrobce, sérum je nutno dehydratovat, nejlépe lyofilizací.

Diskuse

Uvedené modifikace tkáňových médií přinesly našemu pracovišti četné výhody. Technologie práškových homogenizátů umožňuje získat velké množství vysoce standardního výrobku, což je důležité pro reprodukovatelnost pracovních výsledků. Tato přednost, spolu s velmi dlouhou expirační dobou umožňuje provádět i několikaletý pokus na jediné šarži média. Prášková média usnadňují i skladování a transport, neboť zaujmou tisíckrát menší prostor ve srovnání s izotonickým roztokem, a není třeba je uchovávat v chladničkách. Příprava práškových médií je proti klasickým roztokům nepoměrně jednodušší a levnější.

Základní výhodou technologie tepelné sterilizace tkáňových médií je záruka naprosté sterility, týkající se i dosud nepostižitelných filtrabilních agens. Je třeba si uvědomit, že dosud používaná sterilizace filtrací nám může zajistit pouze bakteriologickou sterilitu, avšak je málo účinná na viry a mykoplasma-

ta, tedy právě na nejnebezpečnější kontaminující agens tkáňových kultur. Významné je i vyloučení průtoku médií při sterilizaci přes jakékoli vrstvy, čímž se zabrání jednak ochuzení médií absorpcí na filtru, jednak vyluhování často toxických substancí z filtru do média. Zanedbatelná není ani značná ekonomická úspora, způsobená odpadnutím nákladů na filtrační zařízení a filtrační vrstvy, což dosud znamenalo velmi vysoké částky, navíc většinou ve valutách.

Podobné přednosti má i radiační sterilizace séra a ostatních neautoklávatelných ingrediencí pro tkáňové kultury.

O možnostech virologického využití modifikovaných udržovacích médií s pufrací schopností v neupravené atmosféře byly již podány podrobnější informace (8, 18).

Závěrem pokládáme za potřebné upozornit, že tato práce představuje pouze část širší problematiky nutričního zajištění tkáňových kultur. Řada otázek, zejména rozšíření spektra použitelných médií, problematika proteinových složek (radiační sterilizace), problematika náhrady glutaminu, ochranné a stimulační faktory v médiích atd., vyžadují ještě důkladný vědecký rozbor a systematické rozpracování těchto technologických postupů, které prokázaly svou perspektivnost.

Souhrn

Práce popisuje technologii přípravy práškových autoklávatelných médií pro tkáňové kultury v modifikaci růstové, udržovací a v modifikaci s pufrací schopností v neupravené atmosféře. Dále je popsána technologie radiační sterilizace séra a ostatních neautoklávatelných ingrediencí nezbytných pro kultivaci buněk in vitro. Tyto technologické postupy umožňují získat média s mimořádně dlouhou expirační dobou a zaručují u všech složek tkáňových médií dosažení absolutní sterility. Významný metodický přínos byl zaznamenán především při virologickém využití uvedených modifikací médií pro tkáňové kultury.

Klíčová slova: tkáňové kultury
média
virologie

Literatura

- Činát, J. - Plaisner, V.: Zkušenosti s přípravou práškových médií. In *Vitro v ČSSR*, 2/3, 1973, s. 30–39.
- De Madrid, A. T. - Porterfield, J. S.: Simple microculture method for the study of group B arboviruses.
- Eagle, H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122, 1955, s. 501–504.
- Eagle, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell culture. *Science*, 130, 1959, s. 432–437.
- Earle, W. R.: Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. nat. Cancer Inst.*, 4, 1943, s. 165–212.

- b. Griffiths, J. B. - Pirt, S. J.: The uptake of amino acids by mouse cells (strain LS) during growth in batch culture and chemostat culture: the influence of cell growth rate. *Proc. Roy. Soc. Ser. B. Biol. Sci.*, 168, 1967, s. 421—438.
7. Hanks, J. H. - Wallace, R. E.: Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71, 1949, s. 196—200.
8. Hronovský, V. - Benda, R. - Plaisner, V.: A modified plaque method for arboviruses on plastic panels. *Acta virol.*, 19, 1975, s. 150—154.
9. Leibowitz, A.: The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Amer. J. Hyg.*, 78, 1963, s. 173—180.
10. McCoy, T. A. - Maxwell, M. - Kruse, P. F.: Amino acid requirements of the Novikoff hepatoma in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 100, 1959, s. 115 až 118.
11. McQuilkin, W. T. - Evans, V. J. - Earle, W. R.: The adaptation of additional lines of NCTC clone 929 (strain L) cells to chemically defined protein free medium NCTC 109. *J. Nat. Cancer Inst.*, 19, 1957, s. 885—907.
12. Michl, J.: Metabolism of cells in tissue culture in vitro. II. Long-term cultivation of cell strains and cells isolated directly from animals in a stationary culture. *Exp. Cell Res.*, 26, 1962, s. 129—135.
13. Moore, G. E. - Gerner, R. E. - Franklin, H. A.: Culture of normal human leukocytes. *J. Amer. Med. Assoc.*, 199, 1967, s. 519—524.
14. Morgan, J. F. - Morton, H. J. - Parker, R. C.: Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73, 1950, s. 1—8.
15. Nagle, S. C.: Heat-stable chemically defined medium for growth of animal cell in suspension. *Appl. Microbiol.*, 16, 1968, s. 53—55.
16. Nagle, S. C. - Brown, B. L.: An improved heat-stable glutamine-free chemically defined medium for growth of mammalian cells. *J. Cell. Physiol.*, 77, 1971, s. 259—264.
17. Plaisner, V. - Činátl, J.: Autoklávovatelná média pro tkáňové kultury. *In Vitro v ČSSR*. 2/3, 1973, s. 40—45.
18. Plaisner, V. - Hronovský, V. - Benda, R. - Činátl, J.: Tissue culture media with a buffering capacity in a non-conditioned gas phase. *Acta virol.*, 18, 1974, s. 445.
19. Radlett, P. J. - Telling, R. C. - Stone, C. J. - Whiteside, J. P.: Improvements in the growth of BHK-21 cells in submerged culture. *Appl. Microbiol.*, 22, 1971, s. 534—537.
20. Takaoka, T. - Katsuta, H.: Long-term cultivation of mammalian cells strains in protein and lipid-free chemically defined synthetic media. *Exp. Cell Res.*, 67, 1971, s. 295—304.