

# „EUKARIOTA SEJTEK TENYÉSZTÉSÉNEK ELMÉLETI ÉS GYAKORLATI JELENTŐSÉGE”

## KONFERENCIA

Tihany, 1975. szeptember 1—5.

## A SZÖVETTENYÉSZTÉS TÖRTÉNETE

R. GAZSÓ LENKE

Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet, Budapest

A szövettenyésztés történetének és különböző módszereinek ismertetése előtt szükséges a szövettenyésztés fogalmának meghatározása. *A szövettenyésztés a sejtpopulációk tanulmányozásának módszere a szervezeten kívül* [4]. A módszerrel a sejtek egymással és környezetükkel való kölcsönhatásai figyelhetők meg. A módszer előnyei: 1. Fixált szöveti metszetekkel, vagy kenetekkel szemben, a sejtek élő állapotban is vizsgálhatók. 2. Az *in situ* módszerekkel szemben, a sejtek a szervezeten kívül izoláltan, bonyolult szabályozási mechanizmusoktól függetlenül, kontrollálható körülmények között vizsgálhatók.

A sejtek élő állapotban való megfigyelése kiegészíti az elölt sejtek vizsgálatán alapuló morfológiai ismereteket és mivel a megfigyelés hosszabb időn keresztül történhet, a sejtekről dinamikus kép nyerhető. Ily módon a szövettenyésztés morfológiai és fiziológiai módszernek egyaránt tekinthető. Az élő állapotban történő vizsgálatnál fontos tényező az időbeliség. Így azon az alapon, hogy a sejteket mennyi ideig tudjuk a szervezeten kívül ép és szaporodásra képes állapotban tartani, a tenyészeteknek több típusát lehet megkülönböztetni (1. táblázat).

*Primér tenyészetekről* beszélünk akkor, amikor az explantáláshoz használt szövetdarabkát közvetlenül az élő szervezethől vesszük. A tenyésztés időtartama rövid, rendszerint néhány napra, vagy hétre korlátozott. Az explantálás módja különböző, melyekről később lesz szó.

*Szekunder tenyészet* esetében a kiindulási anyagot már meglévő szövettenyészet képezi. Minden olyan primér tenyészet, amely az explantálás után egy alkalommal szubkultiválásra, ill. passzálásra került, szekunder tenyészetnek nevezendő. Az *in vitro* növekedés időtartama rövidebb-hosszabb időre korlátozott.

Ha a szekunder tenyészet sejtjeinek intenzív burjánzása miatt rendszeres időközönként további szubkultivációkat kell végezni, *primér sejtvonallal*, vagy *primér sejtörzsről* beszélünk. A sejtek közvetlenül már meglévő tenyészetből származnak, *in vitro* élettartamuk hosszú, esetleg több hónap, de korlátozott. A sejtek kariotípusa a fajra jellemző diploid.

I. táblázat

## Szövet- és sejttenyészetek

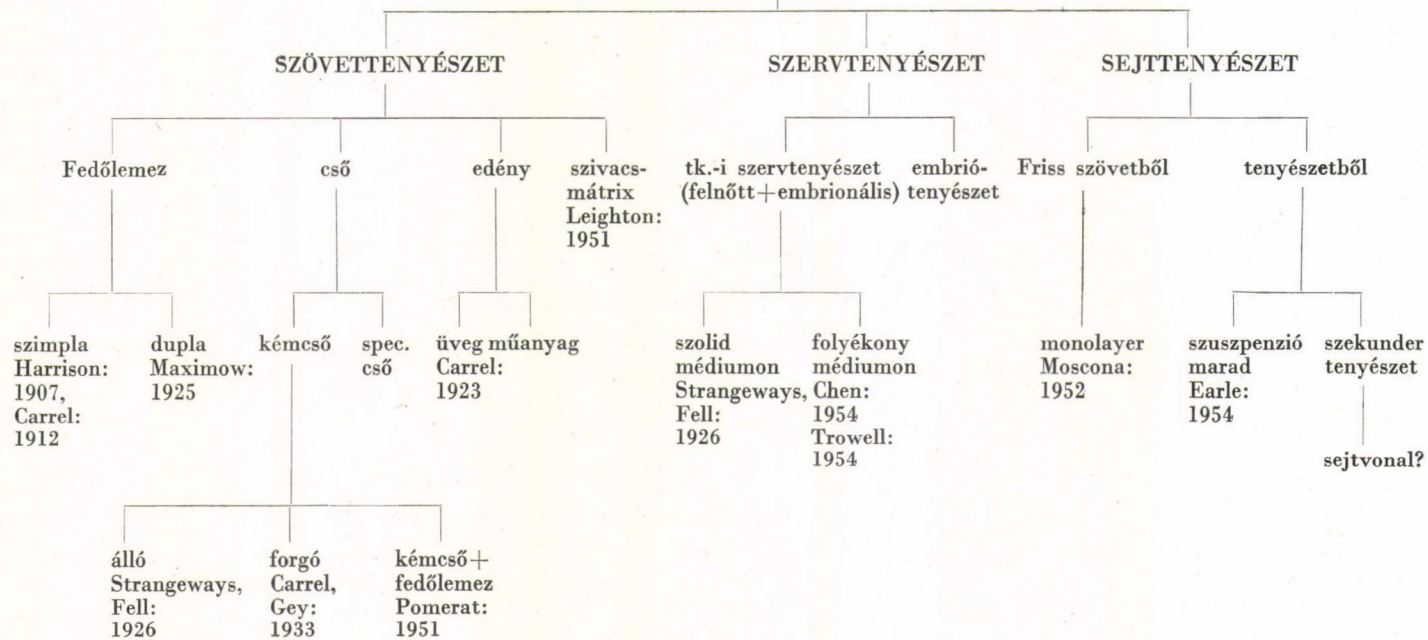
PRIMÉR TENYÉSZET	SZEKUNDER TENYÉSZET	PRIMÉR SEJTVONAL (Törzs)	PERMANENS SEJTVONAL (Törzs)
Közvetlen eredet: in vivo	Közvetlen eredet: primér tenyészet	Közvetlen eredet: in vitro	Közvetlen eredet: in vitro
In vitro növekedés: rövid időtartamú, korlátozott	In vitro növekedés: változó időtartamú, korlátozott	In vitro növekedés: hosszú időtartamú, korlátozott	In vitro növekedés: korlátlan
		Kariotípus: diploid	Kariotípus: diploidtól eltérő

A *permanens sejtvonal* vagy *permanens sejtörzs* közvetlen eredetét már meglévő tenyészetből veszi; ez lehet primér, vagy szekunder tenyészet, primér sejtvonal. Kialakulása rendszerint transzformáció és kolónia képződés útján történik. A permanens sejtvonal sejtjei szabályos időközökben, rendszeresen szubkultiválhatók, a növekedés időtartama korlátlan. A sejtek kariotípusa a normál diploidtól eltérő.

A primér tenyészeteket, mint már az előzőekben említettük, az *explantálás módja* szerint tudjuk egymástól megkülönböztetni. A különbségek abból erednek, hogy a szövettenyészet két egyformán fontos alkotórésze: 1. az explantált anyag, és 2. a médium (táplódat + légtér), milyen kapcsolatban van egymással, illetve az explantátum készítése és a médium megválasztása hogyan történik? A szövettenyésztés története lényegében a különböző explantálási módok és médiumok fejlesztésének története. Fejlesztés abban az értelemben, hogy az élőből kivett szövet sejtjeit hogyan lehet a vizsgálat céljának megfelelően, minél optimálisabb körülmények között életben tartani, szaporítani és megfigyelni?

Az első sikeres *explantálást* 1885-ben WILHELM ROUX végezte. Csirke embrió velőlemezét meleg sóoldatban tartotta, és ezen néhány napig végzett megfigyeléseket. Roux-val egyidőben más kutatók is sikerrel próbálkoztak különböző szöveti sejtek szervezeten kívül való életbentartásával, de ezeket a kísérleteket a pontosan nem definiált körülmények miatt később nem lehetett megismételni. A *szövettenyésztés* valódi kezdetét HARRISON 1907-ben végzett kísérletétől számítjuk (2. táblázat), mellyel egyértelműen bebizonyosodott, hogy az élő sejt normál funkciói a szervezeten kívül, *in vitro* körülmények között is folytatódhatnak. Harrison klasszikus kísérlete már reprodukálható volt. Béka velőcsőből 1–2 mm-es darabokat ún. *anyadarabokat* készített és azokat béka limfa alvadékkal fedőlemezhez rögzítette. Az így elkészített explantátumokat vájulatatos tárgylemez ürege fölé helyezte. Aszep-

2. táblázat  
Primér tenyészetek



tikus körülmények között a darabok több hétig túléltek és a sejtekből axonok nőttek ki. A *szimpla fedőlemezsre* való explantálást alvadék segítségével BURROWS fejlesztette tovább 1910-ben, aki a béka limfát tyúk plazmával helyettesítette. CARREL fedezte fel 1912-ben, hogy a különböző szövetkivonatok, elsősorban embriókivonat, elősegíti a sejtek in vitro növekedését. Az alvadék-technikát embriókivonat használatával kombinálva kialakította azt a szövettenyésztési rendszert, amely még ma is a szövettenyésztői munka alapját képezi, illetve mint kiegészítő módszer használatos. Elemei: 1. fedőlemez, 2. alvadékcepp (plazma + embriókivonat), 3. anyadarab (vagy explantátum) 4. vájt tárgylemez; eredménye a *hisztiotipikus* módon nöövő szövettenyészet, melyben az anyadarabból aktív sejtmigrációval növekedési zóna alakul ki.

A szövettenyésztés sikerét nem kis mértékben befolyásolja, hogy az aszeptikus körülmények mennyire biztosítottak. Carrel mint Nobel-díjas sebész ezen a téren is sokat hozott a szövettenyésztés számára, amennyiben az explantálást a sebészi gyakorlatban szükséges sterilitás betartásával végezte. Ennek eredményességét semmi sem bizonyítja jobban, mint az a sejtörzs, amelyet 40 éven keresztül tudott életben tartani, antibiotikumok teljes hiányában. Így Carrel nevéhez fűződik az első permanens sejtörzs kialakítása is.

A primér szövettenyészet szimpla fedőlemezes formája akkor megfelelő, ha kis anyagból, több kultúra készítésére van szükség, és az in vitro vizsgálat csak rövid ideig — kb. 7–10 nap — tart. A tenyészetek friss tápanyagokkal való ellátása nehézkes, ezért gyorsan nöövő tenyészetek vizsgálatára, amelyeknél a médium gyakori megújítása szükséges, nem alkalmas. A MAXIMOW által 1925-ben bevezetett *dupla fedőlemezes módszer* a szimpla fedőlemezes tenyésztési forma hátrányait küszöbölte ki. A tárgylemez vájzata a Harrison és Carrel által használt lemezének kb. 2–3-szorosa, nagyobb légteret biztosít. Explantálásra két fedőlemezt használnak: egy nagyobb, amelyik elfedi a tárgylemez üregét, és egy kisebbet, amelyen a plazmaalvadékkal rögzített explantátum ül. A kis fedőlemez valamilyen fiziológiás oldat cseppjével kapillaritás révén a nagy lemezen rögzül. A plazmacseppbe foglalt elhasználandó tápanyagok gyakran megújíthatók a kis fedőlemeznek a nagyobbról való leválasztásával és a tenyészetnek egy időre folyékony médiumba való helyezésével.

A dupla fedőlemezes módszert követően az igények az anyadarabos tenyésztés további fejlődését tették szükségessé. Az igény mind az explantátummal, mind a médiummal szemben felmerült. A Maximow-féle módszerrel ugyan egyszerre több explantátum készíthető, de azok csak egyenként vizsgálhatók. A médium egyes alkotórészeinek hatása csak úgy értékelhető, ha a folyékony tápoldat állandóan érintkezik a sejtekkel. Ezek a követelmények sem szimpla, sem dupla fedőlemezes rendszerben nem teljesíthetők.

A fedőlemezen való tenyésztés alapelveinek meghagyásával a fenti igények különböző csövekben és edényekben való tenyésztéssel kielégíthetők. A tápoldat megújítása egyszerű pipettás leszívással, vagy leöntéssel könnyen és gyakran keresztülvihető.

A csövekben való tenyésztést legegyszerűbb formában először STRANGEWAYS és FELL alkalmazta 1926-ban. Közönséges kémcső alsó harmadának falára plazma-embriókivonat alvadékot szélesztettek és az explantátumokat erre ültették. Rögzülés után annyi folyékony médiumot tettek a csőbe, hogy az explantátumokat elfedje. A dugóval bezárt csőben a tenyészetek felett légtér helyezkedett el. Ugyanilyen módon készített tenyészeteket CARREL és GEY 1933-ban azzal a különbséggel, hogy a kémcsöveket forgódobba tették, és lassú fordulattal forgatták. Előnyét az állócsöves tenyésztéssel szemben abban látták, hogy ily módon a sejtek friss tápanyagokkal való ellátása és az elhasználódott anyagcseretermékek kimosódása kedvezőbb. A közvetlenül a kémcső falára történő explantálás mindkét formája lehetetlenné teszi a folyamatos optikai (mikroszkópos) vizsgálatot. Ennek lehetőségét kívánta megadni az először POMERAT által 1951-ben alkalmazott módszer. Ennél az explantátumot plazma alvadékkal fedőlemeztre ültetik és a fedőlemezt kémcsőbe helyezik. A csőbe néhány ml folyékony médiumot tesznek. A csöveket vagy álló helyzetben, vagy forgatva 37 °C-os termosztátban tartják. Ily módon egyszerre sok tenyészet készíthető, a médium megújítása egyszerű, a fedőlemezek bármikor üvegből készült kamrára tehetők és az explantátumok élő állapotban, fázisoptikával vizsgálhatók, fotózhatók és filmezhetők, vagy fixálás és festés után tartósíthatók. A csövekben való tenyésztés több előnye miatt igen elterjedt módszer, és ezért idővel a tenyésztőcsövek különböző formáit alakították ki. Egyik legismertebb forma a *Leighton-féle* cső, amely sejtszupenziók tenyésztésére is alkalmas és lehetséges a sejtek csőben való direkt mikroszkópos vizsgálata anélkül, hogy a fedőlemezt a csőből kivéve kamrára kellene áttenni. Több hazai laboratóriumban az ún. H-típusú tenyészcövek hasonló célt szolgálnak.

A tenyészcövekkel kapcsolatban támasztott igényt még fokozottabban elégítik ki a különböző *tenyésztőedények*. Üvegből készült tenyésztő edényt első alkalommal Carrel használt 1923-ban különböző szövetkivonatok hatásának tanulmányozására. A médium megújítása ilyen edényben rendkívül egyszerű és a nagyobb mennyiségű médium használata miatt lehetséges a tápoldat alkotórészeinek kémiai vizsgálata. Ezt a tenyésztési formát ma is akkor választjuk, ha biokémiai és anyagcserevizsgálatokat akarunk végezni. Fedőlemez használata ebben az esetben is lehetséges, sőt kívánatos, ha az anyagcserevizsgálatokkal párhuzamosan morfológiai vizsgálatokat is akarunk végezni. Az explantátumok plazma alvadékkal, vagy anélkül is rögzíthetők a tenyésztő felszínén. A tenyésztőedények nagyobb úrtartalma, illetve légtere miatt viszont szükséges megfelelő gázkeverék adagolása, amely rendszerint

95% légköri levegőből és 5% CO<sub>2</sub>-ből áll. A legismertebb tenyésztőedény-típusok: Carrel-edény, Roux-palack, Colle-palack, üveghől készülnek. A ma használatos edények nagy része műanyag, optikai vizsgálatra alkalmas polystyren. Ezeknek sterilizálása természetesen az üvegétől eltérő, legtöbbször használat után eldobják, de szükség esetén sugársterilizálás után újra használhatók.

Az anyadarabos tenyésztés eddig ismertetett módjai *kétdimenziós* növekedést biztosítottak. A tenyészetek megegyeztek abban, hogy az explantátumokból migráló sejtek egyrétegű, monolayer növekedési zónákat alkottak. A sejtek morfológiai jellegzetességei és egymáshoz való viszonyuk így többé-kevésbé megmarad, de a populációk növekedése a rendelkezésre álló felszín miatt korlátozott. A későbbiekben szó lesz róla, hogy a sejtek szuszpenzióban való növesztésével ez az akadály leküzdhető, de ez az állapot messze eltér az élőben uralkodó körülményektől. A tenyésztőtér növelése az explantátumok térben való növesztésével, *háromdimenziós* rendszerben is lehetséges és ez a rendszer az in vivo helyzetet jobban megközelíti. Ilyen megfontolások alapján alkalmazta Leighton 1951-ben az ún. *szivacs-mátrix* módszert [1]. Ezt a technikát elsősorban a daganatos növekedés modellezésére vezette be azon elv alapján, hogy emlős daganatokban a daganatsejtek egymással, normál stróma elemekkel és parenchymális maradványokkal társulnak, tehát a daganat magasan organizált egység, amelyben a sejtek kölcsönhatásai együttesen tanulmányozandók. A szivacs-mátrix módszer technikailag nem egyéb, mint a hisztiotipikus és organotipikus tenyésztés (utóbbiról később lesz szó) egyesítése. Gyakorlatilag úgy valósítható meg, hogy finom pórusú cellulózeszivacs-darabkákat plazma alvadékkal fedőlemezhez, vagy bármilyen tenyésztő alzathoz rögzítenek, majd folyékony médiummal látják el. A tenyésztés csövekben vagy edényekben végezhető, a médium gyakran megújítható, így anyagcsere vizsgálatok számára is analizálható. A tenyészetek feldolgozása a biopsziás anyagoknál használatos szövettani technikával történik.

Primér tenyészetek készítésének azt a formáját, amelynél a cél nem a szövetet felépítő egyes sejtek vizsgálata, hanem a szerveget alkotó szöveti egység megőrzése, *szervtenyésztésnek* nevezzük. A tenyészet ilyenkor *organotipikus* módon növekszik. A feladat technikailag úgy merül fel, hogy az explantátumból történő sejt migrációt, illetve növekedési zóna kialakulását meg kell akadályozni. Az explantáláshoz használt anyag szerint két formáját lehet megkülönböztetni: 1. *szoros értelemben vett szervtenyésztést*, 2. *embriótenyésztést*. A szoros értelemben vett szervtenyésztés anyagát felnőtt szervrészletek és embrionális szervek vagy szervrészletek képezhetik. Mind a felnőtt, mind az embrionális szervek közül nem mindegyik alkalmas a tenyésztésnek erre a módjára. Általában azok a szervek és szervrészletek növesztethetők organotipikus módon, melyeknek sejt felépítése homogén, túlnyomórészt epiteliális sejtek alkotják, kötőszövetes strómát kis mennyiségben tartal-

maznak. Ha ilyen szerveket feldarabolunk, az egyes darabok vágási felszíne a környezet felé elhatárolódik, sebfelszínhez hasonlóan zárul, „organoid”-ot képez. Felnőtt szervek közül legtöbb endokrin mirigy ilyen sajátságokkal rendelkezik és ez a helyzet a differenciálatlan embrionális szerveknél is. A tenyészetben növekvő „organoid”-nak bizonyos vastagsága van, ezért a belsejében lévő sejtek táplálkozási és anyagcsere viszonyai rosszabbak, mint hisztiotipikus tenyészetben. Így szervtenyésztésnél a sejtmigráció meggátolása mellett fokozott mértékben előtérbe kerül a sejtek tápanyagokkal és oxigénnel való ellátottsága.

A szervtenyésztés módszerét először STRANGEWAYS és FELL alkalmazta 1926-ban. Az embrionális szervet (csirke embrió szem) óraüvegben plazma-alvadék felszínére helyezték. Az óraüveget Petri-csészében nedves vattával vették körül. Az esetleges sejtmigrációt úgy gátolták meg, hogy a darabokat naponta új alvadéokra vitték át. WOLFF és mtsai 1952-ben a módszert úgy fejlesztették tovább, hogy a gyorsan elfolyósodó plazma-alvadék helyett szolid médiumként agart használtak. Különösen csirke embrió mezonefrosz fejlődésének vizsgálatánál volt megfelelő a módszer. A szövettenyésztéshez hasonlóan, a kizárólag szolid médiumon való tenyésztés nem tette lehetővé a médium hatásának analizálását. CHEN volt az első, aki 1954-ben folyékony médiumot használt szervtenyésztésnél. Az explantátumot szilárd alatként lencsepapírra ültette, amely alacsony fajsúlyánál fogva a folyékony médium felszínén lebegett. Chen fáradságos „úsztatási” technikáját TROWELL fémhálós módszere váltotta fel 1954-ben. Trowell az embrionális szerveknél oxigén-igényesebb felnőtt szerv részek tenyésztésére speciális kamrát szerkesztett. A kamrát perforált lemez két részre osztja. A felső részben van a folyékony médiumot tartalmazó, bármilyen alakú tenyésztő edény, melyben a 2 mm-es szerv-darabkák fémrostélyra helyezett lencsepapíron ülnek. A kamra alsó része gáztartály, mely kívánság szerint összeállítható gázkeveréket tartalmaz. A tenyésztés 6–9 napig végezhető, a darabkák centrális nekrozisa nélkül. A feldolgozás a szokásos hisztotechnikai módszerekkel, metszetkészítéssel történik.

A szervtenyésztés másik formája egész embriók tenyésztése. Célja az embrionális fejlődés in vitro megfigyelése. Mint a bevezetésben említettük, Roux volt az első, aki ilyen vizsgálatokat végzett. Roux-t követően sokáig nem alakult ki megfelelő eljárás az embriótenyésztésben, míg SPRATT 1946-ban a szervtenyésztés klasszikus módszerét csirke embriók tenyésztésénél kezdte alkalmazni. 40 órás csirke embriókon különböző anyagcseregátlók embrionális fejlődésre gyakorolt hatását vizsgálta. A tenyésztés csak a médium minőségében tért el a szervtenyésztésnél alkalmazott körülményektől. Emlős embriókat ritkábban vizsgáltak tenyészetben, mivel fiatal, életképes embriók nyérése technikailag nehezebb. Az ismertetett kevés vizsgálat többnyire nyúl és egér embriókon történt korai, 2–8 sejtés stádiumban. Így sikerült egér

megtermékenyített petesejt fejlődését a 8-sejtes stádiumtól a blasztociszta stádiumig követni. Eredményesek voltak azok a kísérletek is, melyek során a megtermékenyített petesejt fejlődését egy ideig *in vitro* biztosították, majd visszaültetés után a fejlődés *in vivo* tovább folyt, a kifejlődött szervezetig.

Primér tenyészetek készítésének harmadik módja a *szuszpenziós tenyésztés*. Ilyenkor nem szövet-, vagy szervdarabkákat ültetnek ki, hanem szoros értelemben vett sejttenyésztés történik. A szövettenyésztői gyakorlatban különbséget kell tenni *sejtszuszpenzió tenyésztése*, és *szuszpenzióban való tenyésztés* között. Mindkét esetben friss szövetből indulunk ki, melyből különböző módszerekkel egyes sejtekből álló szuszpenziót készítünk. A különbség abban van, hogy a sejtszuszpenziót egyik esetben valamilyen szilárd alzatra ültetjük, a másik esetben a sejtek szuszpenzióban maradnak a tenyésztési idő végéig. Végül szuszpenziós tenyésztést végzünk akkor is, amikor már meglévő tenyészet sejtjeit visszük szuszpenzióba és ültetjük tovább.

Sejtszuszpenzió készítésének három módja van: 1. fizikai szétszedés, 2. enzimés emésztés, 3. keláló anyagokkal való kezelés. A *fizikai szétszedés* egyszerűen pipettával vagy fecskendővel történik és rendszerint más módszerrel kiegészítve alkalmazzák, jóllehet, egyesek szerint a sejteket legkevésbé károsító eljárás. Az *enzimés emésztés* leggyakrabban tripszinnel történik, melyet először ROUS és JONES használt 1916-ban, plazmán növekvő tenyészet sejtjeinek leválasztására. Abban az időben a módszer nem terjedt el, míg 1952-ben MOSCONA újra felelevenítette és friss szövet sejtjeinek szétszedésénél alkalmazta. Klasszikus anyaga csirke embrió végtagbimbó volt, melynek sejtjeit a tripszines emésztés után monolayerekben tenyésztette és a sejtek reorganizációját vizsgálta. A technikát ma számos embrionális és felnőtt szövet sejtjeinek szétválasztására használják, jóllehet legmegfelelőbb embrionális szövet, vagy teljes embrió szétszedésére. A nehézség ugyanis abban van, hogy a különböző szövetek sejtközötti állománya eltérő és így elsősorban azoknak a felnőtt szöveteknek a szétszedésére alkalmas, amelyek kevés mátrixot tartalmaznak. A tripszinen kívül erre a célra más enzimeket is használnak: kollagenáz, elasztáz, mukáz, pronáz, hialuronidáz, DN-az, pankreatin, papain. Megválasztásuk — esetleg kombinációjuk — és használatuk módja a tenyésztendő szövet sajátosságaitól függ. A *keláló anyagok* olyan szerek, amelyek a sejteket összetartó Ca- és Mg-ionok kötéseit bontják meg és ezáltal a sejtek egymástól való szétválását segítik elő. Használatuk pl. szorosan záró epiteliális szövet sejtjeinek szétválasztásánál előnyös. Ilyen anyagok: a citrát, és a verzén (sequestren), kémiai nevén etilén-diamin-tetra-ecetsav: EDTA.

A tripszin és a többi enzim nemcsak friss szövet sejtjeinek, hanem már tenyésztetben lévő sejtek, monolayerek egyes sejtjeinek szétválasztására, ill. monolayereknek a tenyésztő alzatról való leválasztására is alkalmas. Ily módon sejtörzsek tenyésztésénél, szubkultiválás alkalmával rutinszerűen használatosak.



A szuszpenzióban való tenyésztés biokémiai és sejtkinetikai vizsgálataira ideális rendszer, a sejtek nagymennyiségben való termelésére alkalmas. Mivel a sejtek állandóan folyadékban lebegnek, a szuszpenziós tenyésztés egyenletes körülményeket biztosít a sejtek számára. A tenyésztésnek erre a formájára nem minden sejt felel meg. Vannak sejtek, amelyek szuszpenzióban egyáltalán nem tenyészthetők, míg más sejtek bizonyos adaptációs idő eltelte után válhatnak alkalmassá az *in vitro* növekedésnek erre a módjára. A sejtek alkalmazkodási képességétől függ, hogy sikerül-e szuszpenzióban növekvő variánsokat kialakítani, vagy sem?

Szuszpenziós tenyésztéssel először OWENS és GEY próbálkozott 1953-ban. A forgódobba helyezett tenyésztőcsövekben a sejtek az alzatról leváltak és spontán folytatták növekedésüket szuszpenzióban. A technikát 1954-ben EARLE és mtsai fejlesztették ki L-törzs sejtekkel, amelyek korábban alzathoz tapadva nőttek. A sejteket Owens-hez hasonlóan először forgócsövekben tenyésztették, majd fokozatosan szoktatták a szuszpenzióban való növekedéshez. Az adaptálódó sejtek később spontán, álló lombikban is szuszpenzióban nőttek.

Élőből frissen explantált sejtek monolayer módon növesztve, bizonyos idő elteltével *sejtkolóniák* képzésére hajlamosak. Ez azt jelenti, hogy a kezdetben heterogén sejttájományban azonos morfológiai sajátosságokkal rendelkező, uniform sejtesoportok izolálódnak. A kolóniák megjelenése általában permanens sejttörzs kialakulásának kísérő jelensége, és *in vitro* létrejött „transzformáció” eredménye. A kolóniák formájában növekvő permanens sejttörzs sejteinek ugyanakkor nem feltétlen sajátossága, hogy a kiindulási, eredeti sejtektől különbözők legyenek. Sejtkolóniák spontán megjelenése a tenyésztésben alkalmat nyújt folyamatosan passzálható, tiszta sejttörzsek előállítására. Aktívan proliferáló sejtkolóniák egyetlen sejtjéből általában egész sejtkolónia jön létre.

A sejtklónok előállításának technikáját először SANFORD írta le 1948-ban. Kiindulásul híg sejtszuszpenziót készített, azt finom kapillárisba szívta fel, a csövet leforrasztotta, és mikroszkóp alatt vizsgálta. Ha sikerült egy sejtet a másiktól kellő távolságban találni, eltörte a kapillárist, az üvegcsövet külsőleg sterilizálta, majd az egyetlen sejtet tartalmazó kapillárisdarabot plazmaalvadéokra ültette. A csőből kivándorolt sejt szaporodva egész sejtkolóniát képezett. Ez a technika nem minden sejtnél válik be, rendkívül aprólékos, de bizonyítja, hogy egyetlen emlős sejtéből is kialakítható teljes sejtkolónia. Gyakoribb a Rous és Jones által először 1916-ban alkalmazott módszer, amely mint említettük primér tenyésztés sejtjeinek megfelelő növekedés után tripszinnel való leválasztása, híg szuszpenzió készítése és új tenyésztőedényekbe való átoltása. Az ilyen módon való klónozásra különösen cervix karcinoma (HeLa), és más epitéliális sejtek alkalmasak. Lényeges a médium megválasztása, amely savóban gazdagabb kell, hogy

legyen, valamint az üvegedények nagyfokú tisztasága és a pH szigorú ellenőrzése. Mindezek a tényezők a szuszpenzióban inokulált sejtek alzatra való letapadását segítik elő.

Szövettenyészetek lényeges alkotórészei a *tápadatok*, vagy *médiümök*. A médiümök biztosítják a sejtek életéhez szükséges fizikai és kémiai körülményeket: pH viszonyokat, ozmotikus nyomást, tápanyagokat, melyeket a sejtek nem tudnak szintetizálni. A médiümöknek két csoportja ismeretes: I. Természetes médiümök, II. Kémiailag definiált (szintetikus) médiümök. Az állati sejtek általában csak természetes, vagy legfeljebb olyan definiált médiümökben tudnak nőni, melyek kisebb-nagyobb mennyiségben természetes médiümot is tartalmaznak.

I. A *természetes médiümök* három csoportba sorolhatók: 1. Koagulumok, 2. Biológiai eredetű folyadékok, 3. Szövetkivonatok.

A *koagulumok* szövetdarabkák rögzítésére szolgálnak azért, hogy finom hálózatot alkotva, mintegy mechanikai támaszt képeznek a sejtek növekedéséhez és mint tápanyagok sem közömbösek a sejtek számára. Harrison klasszikus kísérletében még béka limfát használt koagulumként. A ma használatos *plazma* koagulumokkal való munkát Carrel vezette be. Erre a célra általában szárnyasplazma szolgál, mivel az emlősplazmákkal szemben lassabban képez jó alvadékat. A vérvétel könnyebbsége és a vér állandóbb Ca-szintje miatt többnyire hímállat vérért használják. A szövettenyésztői gyakorlat számára újabban liofilizált plazmákat állítanak elő, amelyek megfelelő hígítás után használhatók.

Szövetdarabok rögzítésére használt másik anyag a *kollagén*. Különösen olyan szövetek tenyésztésénél tartják megfelelőnek, amelyek növekedésük kapcsán erősen folyósítanak, pl. az idegszövet. Többen vannak azon a véleményen, hogy folyósítási képességben a plazma és a kollagén között sok különbség nincs. A kollagént patkányfarokból, meglehetősen hosszadalmas eljárással állítják elő.

A *biológiai eredetű folyadékok* közül legjelentősebbek a különböző állólényekből vett *savók*, vagy *szérumok*. A savók képezik a médiümök kész fehérjét tartalmazó alkotó részeit és tömény fehérjeoldatoknak tekinthetők. Leggyakrabban használt savók: felnőtt emberi savó, köldökzsinór-, vagy placentasavó, ló-, marha- és borjúsavók. Általában az a tapasztalat, hogy a növekedésre gyakorolt hatásban autológ és homológ savók között nincs különbség, habár vannak esetek, amikor kizárólag egyik vagy másik savó használata ajánlatos. Az emberi köldökzsinór szérum és a borjúszérum pl. a legtöbb szövet tenyésztésére alkalmas. A teljes vérből nyert szérumot toxikus hatások elkerülése végett 65 °C-on inaktiválják, majd szűréssel sterilizálják. Ha a szérumot *köldökzsinórból* veszik, arra kell vigyázni, hogy a vérvétel ne közvetlenül a szülés után, ill. a szülés idején történjen, mert akkor a vér könnyen hemolizál. A kapott szérumot nem kell szűréssel sterilizálni, mert

szobahőn 2–3 hét után önsterilizálódás következik be. Toxicitási probléma sohasem merül fel és egyébként nehezen növő szövetek is jól tenyészthetők benne. Az *amnion-folyadékot* kanül segítségével, steril punkcióval marhából nyerik. *Aszcitesz és pleura folyadék* nyérése rendszerint peritoneális karcinomatózisban szenvedő betegekből történik. Ilyen anyag használatba vétele előtt ajánlatos toxicitási tesztet végezni, mivel ezek a betegek gyakran részesülnek olyan gyógyszeres kezelésben, amely a sejtek növekedését leronthatja. Cornea-hám tenyésztésére szokásos *csarnokvizet* használni, melyet ökör szeméből vesznek, de a kis mennyiségben való nyérés miatt csak kisméretű munkára alkalmas. A savó nagy molekulású anyagait a *szérum ultrafiltrátumokat* nagyon igényes körülmények között tenyészthető szövetek médiumaként használják. Egyes szerzők azért alkalmazzák, hogy a sejtekben a lipidek in vitro felhalmozódását elkerüljék. A savó alacsony molekulású anyagait a *szérum dializátumok* tartalmazzák. Jól definiálhatók, ezért olyan sejtörzsek kiegészítő médiumaiként használhatók, amelyek csak definiált médiumokban nőnek. A *rovar hemolímfát* főleg rovarok szöveteinek tenyésztésénél használják, míg a *kókusztej* növényi szövettenyészetek médiumaként szolgál.

A *szövetkivonatok* közül elsősorban a különböző embriókivonatok jönnek számításba. Leggyakrabban csirke embrió kivonatot használnak, amelyet 7–10 napos csirke embrióból homogenizálva, fiziológiás sóoldattal állítanak elő. Ma már a plazmához hasonlóan ez is liofilizált állapotban vásárolható, és hígítás után használható. Ugyanez vonatkozik a borjú embrió kivonatra is. Az *embrió ultrafiltrátumok* is ugyanolyan hatásosak a növekedésre, mint maguk az embrió kivonatok. Egyéb szövetkivonatok használata a speciális követelményektől függ. A baktérium tenyésztésnél használt *laktalbumin hidrolizátumot*, *peptont*, és *élesztőkivonatot* próbálták magasabbrendű szövetek tenyésztésénél is használni, de hatásuk semmivel sem bizonyult jobbnak, mint az egyéb biológiai eredetű anyagoké.

II. *Definiált médiumok.* Jóllehet a természetes médiumok használata még ma sem kerülhető el, egyre több próbálkozás van arra nézve, hogy azokat legalább részben, ún. definiált médiumokkal helyettesítsék, vagy egészítsék ki. A természetes médiumok hátránya, hogy komplex voltuknál fogva alkotórészeik ismeretlenek és változóak. Ez a körülmény megnehezíti a kísérletek pontos megismétlését és összehasonlítását. A kémiailag definiált, vagy szintetikus médiumok esetében a médium alkotórészei ismertek. Ugyanakkor ismerni kell a különböző állati sejtek igényeit is, mivel jelenleg nem áll rendelkezésre olyan univerzális médium, amely kivétel nélkül minden állati sejt tenyésztésére alkalmas lenne. Sok anyag minden sejt általános szükséglete, de vannak olyan anyagok, melyekre speciálisan ennek, vagy annak a sejtnek van szüksége. Ez magától értetődő, ha arra gondolunk, hogy élőben ugyanazon szervezeten belül is különböző az egyes szövetek sejtjeinek igénye.

Mégis, a jelenleg használt szintetikus médiumok nagy része csak a sejtek általános igényeinek kielégítésére szolgál, ezért a tenyésztés kevés kivételtől eltekintve, nem kizárólag definiált médiumokban, hanem valamilyen természetes médiummal kiegészítve, ún. *szemiszintetikus médiumokban* történik.

A definiált médiumok egy részét képezik a különböző *fiziológiás oldatok*, az ún. „Balanced Salt Solutions” (BSS). Ezek önmagukban nem elégségesek a sejtek túlélésének biztosítására, bennük a sejtek legfeljebb egy napig tartathatók életben károsodás nélkül. Ugyanakkor alapját képezik minden szintetikus médiumnak. Elsősorban a sejtek fizikai igényeit biztosítják: ozmotikus nyomás, pH viszonyok. Különböző szervesen sókat és glukózt tartalmaznak, valamint indikátort a pH jelzésére. Mindegyik több-kevesebb kiegészítéssel a Ringer-oldat származéka. Legismertebbek: Tyrode-, Gey-, Earle-, Hanks-oldatok. Részletes összetételük és készítési módjuk a szövettenyésztési kézikönyvekben megtalálható [2., 3., 5.]. Általános szempontként megjegyzendő — és ez minden szövettenyésztésnél használt oldatra érvényes —, hogy készítésükhöz kétszer desztillált, dezionizált vizet kell használni, valamint igen lényeges az anyagok kémiai tisztasága.

Mint említettük, a sejtek hosszabb ideig való túlélésére a fiziológiás oldatok önmagukban nem elégségesek, ehhez további anyagok: aminosavak, vitaminok, hormonok és fehérjék szükségesek. A szintetikus médiumokat ezért a fiziológiás oldat alkotórészen kívül, ezeknek az anyagoknak a hozzáadásával készítik. Az első szintetikus médiumot, amely mindezeket az anyagokat tartalmazta, FISCHER állította össze 1941-ben. Ő, a szervesen só, szénhidrát, aminosav, vitamin alkotórészekon kívül plazma- és embriólé dializátumot is kevert az oldathoz. A jelenleg igen sok szövettenyésztő által használt szintetikus médiumot MORGAN, MORTON, és PARKER 1950-ben alakította ki és TC-199 néven ismeretes. Komplex voltánál fogva az összes anyagokat tartalmazza, amelyekre a sejteknek szüksége van. Önmagában mégsem elégséges, benne a sejtek csak 1–2 napig maradnak életben, savó hozzáadásával viszont teljes értékű médiumként használható, amelyben a sejtek korlátlan ideig élnek és szaporodnak. 1955-ben Parker módosításában jelent meg egy olyan szintetikus médium, amelyben bizonyos sejttörzsek savó hozzáadása nélkül is korlátlanul növeszthetők. Ugyanezt a szerepet tölti be a fehérmentes NCTC-109-es médium is. A Parker TC-199-es médium mellett gyakran használt még az Eagle 1959-es médium, amely szintén savóval dúsítandó.

Az előbbieken ismertetett médiumok sajnos nemcsak a tenyésztendő sejtek növekedését serkentik, hanem baktériumok és gombák növekedésére is kedvezőek. Sőt, a baktériumok és gombák kedvező körülmények között hamarabb túlnövik a magasabbrendű sejteket, toxinokat termelnek és rövid idő alatt a sejttenyésztet teljes pusztulását okozzák. A fertőzés kizárása, ill. elkerülése két dolog együttes alkalmazásával lehetséges: 1. sterilizálással, és

2. aszeptikus technika alkalmazásával, azaz a már steril anyagok fertőződésének megelőzésével. A fertőzés forrásai lehetnek: a) eszközök, b) médium, c) explantálandó anyag, d) levegő, amiben a munka folyik, e) dolgozó személy.

A tenyésztési munka első lépése: steril eszközök és médium biztosítása a munka megkezdése előtt, a sterilizálási technika előírásai szerint történik. A mikroorganizmusok sterilizálással való eltávolítása háromféleképpen történhet: 1. fizikailag, 2. kémiailag, és 3. mechanikai úton.

*Fizikai úton:* száraz, vagy nedves hővel és sugárzással lehet sterilizálni. Éles eszközök, műszerek, üvegneműk sterilizálása száraz hővel történik, míg ruhát, gumit, egyes oldatokat nedves hővel, ill. magasnyomású gőzzel sterilizálnak. A nedves hővel való sterilizálás legegyszerűbb módja a főzés, amely kisebb mennyiségű anyagok, fecskendők, tűk, gyors sterilizálására alkalmas. Műanyag eszközök sterilizálására, amelyek sem száraz, sem nedves hővel nem csírátlathatók, a gamma-sugárzás megfelelő.

*Kémiai úton* való sterilizálásra legegyszerűbb esetben a 70%-os alkoholt használják, pl. műanyag fedőlemezek, vagy egyéb száraz és nedves hőt nem bíró eszközök esetén. Az antibiotikumokat tápoldatok alkotórészeként, nem a sterilizálási folyamat helyett, hanem megelőzés céljából alkalmazzák. Penicillint és sztreptomicint együttesen alkalmazzák. Penicillint 100 NE/ml, sztreptomicint 50  $\mu\text{g/ml}$  konc.-ban. Gombás fertőzés ellen a Mycostatin (Nystatin) 20  $\mu\text{g/ml}$  konc.-ban hatásos.

A *mechanikai úton* való sterilizálás szűréssel történik. A tenyésztésnél használt oldatok közül a plazma és embrió kivonat készítése már eleve sterilen történik. Néhány oldat nedves hővel sterilizálható, az oldatok többségét viszont csak szűréssel lehet csírámentessé tenni. A szűrésnek többféle módja ismeretes, megválasztása a szűrendő oldattal szemben támasztott követelményektől és a rendelkezésre álló lehetőségektől függ.

A kiültetendő szövetből, levegőből és a dolgozó személyből eredő szennyezéseket aszeptikus technika alkalmazásával lehet elkerülni. A szövet befertőződése úgy kerülhető el, hogy az anyagkivételt steril körülmények között kell végezni. Ha ennek ellenére a sterilitás teljes mértékben nem biztosítható, kiültetés előtt az anyagot tömény antibiotikum oldatban kell átmosni, mely 1000 NE/ml penicillint, 0,5 mg/ml sztreptomicint, és 0,5 mg/ml neomicint tartalmaz.

A *levegő sterilítése* legjobban úgy biztosítható, ha a munkahelyen szűrőrendszeren átbocsátott levegő cirkulál. Ha erre nincs lehetőség, különböző UV-, ill. germicid lámpák használandók.

A *dolgozó öltözéke*, keze steril legyen, a felesleges mozgásokat és beszédet kerülni kell, a kilégzett levegőt maszkon keresztül szűrni. Lehetőleg semmit sem szabad kézzel megfogni, de emellett a kéz tisztasága és fertőtlenítő folyadékban való áztatása a munka megkezdése előtt szükséges. A dolgozó részéről a sterilitás legfőbb biztosítója a jó munkaszervezés, a gyors, begya-

korlott, automatikus mozdulatok, mindennek megvan a helye, a helyiségben csak a munkával kapcsolatos anyagok vannak, a szennyezett, használt anyagok eltávolítása azonnal megtörténik. Fedetlenül még rövid ideig sem szabad semmit hagyni, nyitott üvegeket minden manipulációnál ferde szögben kell tartani. A helyiségben gázlágnak kell égni, mert munka közben a levegővel érintkezett eszközök, nyílások égetése állandóan szükséges.

Az *explantálandó anyagok* három forrásból származhatnak: 1. Embriónális szövetek, 2. felnőtt (normál) szövetek, 3. daganatszövetek. *Embriónális szövet* minden fajta embrióból nyerhető, de leggyakrabban csirke embriót használnak. Fiatal csirke embriót gyakran teljes egészében ültetnek ki, míg 10 napnál idősebbekből egyes szerveket (szív, máj, bél, bőr, vázizom, spinalis ganglionok) explantálnak. Gyakran használják szervtenyésztés céljára a végtagbimbókat. Emlős embriók közül leggyakrabban egér és patkány embriókat, ill. azok egyes szerveit ültetik ki, nagyobb emlősök közül kutya, macska, disznó és marha embriók szolgálhatnak a vizsgálat tárgyául. A spontán vetélésekből származó emberi embriókat a magzati életnek kb. 5. hónapjában (30–35 cm-es állapot) szokták explantálni, mivel a sterilen való preparálás korábbi állapotban nem lehetséges. Az embriónális szövetek gyorsan nőnek, és általában fibroblasztokban gazdag növekedést mutatnak. A fibroblasztok minden egyéb sejttípust gyorsan túlburjánzanak.

A *felnőtt szövetek* több-kevesebb latencia idő után indulnak növekedésnek. A tenyészetek sejtes összetétele az embriónális szövetekével szemben változatosabb, amennyiben a mindig jelenlévő fibroblasztok mellett, más sejttípusokat is tartalmaznak. A felnőtt szövetek többsége alkalmas szövettenyésztésre, a vizsgálat célja szabja meg, hogy az explantálás milyen szövetből történjen.

*Daganatszöveteket* morfológiai és élettani vizsgálatok céljára, mind emberi, mind állati daganatokból gyakran explantálnak. A tenyésztés körülményeinek megválasztása, a normál szövetekét meghaladó körülményt igényel, mert a tumorsejtek élőben való gyors burjánzása legtöbbször nincs párhuzamban *in vitro* növekedési képességükkel. Ezekkel a kérdésekkel viszont további előadások még részletesebben fognak foglalkozni.

#### IRODALOM

1. BUSCH, H. (ed.): *Methods in Cancer Research* Vol. 4., Acad. Press, New York—London (1968).
2. PAUL, JOHN: *Cell and Tissue Culture* third ed., E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh—London (1965).
3. KOVÁCH ARISZTID (szerk.): *A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei* IV. kötet, Törő Imre: Szövettenyésztés 197–419. old. Akad. Kiadó, Budapest (1958).
4. WAYMOUTH, C.: *Growth in Tissue Culture*. In: W. W. Nowinski (ed): *Fundamental aspects of normal and malignant growth* 546–587. pp. Elsevier Publ. Comp. Amsterdam (1960).
5. WILLMER, E. N. (ed): *Cells and Tissues in Culture. Methods, Biology and Physiology*. Vol. 1. 788 + XII pp. Acad. Press, London—New York (1965).