

Srovnání tkáňových kultur dle Carrela a jejich modifikace dle Borrela. Význam pro mikrobiologický experiment.

Dr. F. Patočka, asistent bakteriologického ústavu
prof. dr. J. Honla.

(Předneseno na schůzi Mikrobiologické spol. 2. XI. 1930.)

Pokračující věda nese s sebou nové objevy, ale i nové problémy. Není divu, že na řešení nových problémů velmi často nestačí použití staré metodiky. Hledají se cesty nové, nebo se alespoň zkouší, je-li možno aplikovat metody věd více či méně příbuzných pro potřebu vlastních experimentů. Mikrobiologie jest vědou, které se množí problémy stejně rychle, jako se rozrůstá okruh její působnosti. Musí stále sháněti nové metody ve všech téměř oblastech lidského vědění. Jsouc dosti úzce spjata se svojí větší sestrou, biologií, obrací se přirozeně nejdříve na tuto v těch případech, kde její vlastní síla je slabá na zdolání nových překážek a kde stará a vžitá methodika, byť i nejlépe modifikovaná, nemůže dáti konečnou odpověď svými experimentálními možnostmi.

Právě v době, kdy klasická bakteriologie se svojí kultivací, experimentem na zvířeti, mikroskopickým nálezem a reakcemi serologickými a imunobiologickými zdála se obsáhnout téměř úplně oblast svého vědění — musela kapitulovat před problémem, jenž se zdál být nerozřešitelný. Byla to otázka kultivace tak zvaných filtrovaných virů. Jest jisto, že jejich experimentální průkaz pouze infekcí zvířete a uchovávání kmenů jen v nemocných zvířatech nemohl stačiti k dokonalému poznání jejich biologie. Současně počaly se znovu rozvířovati otázky o imunitě a její podstatě, při jejichž definitivním řešení rovněž dosavadní metody nebyly plně uspokojující.

Tehdy již biologie spěla k rozřešení jednoho ze svých nejdůležitějších fakt. Prokázala, že právě jako jest možno nekonečně udržovati na umělých půdách kulturu mikrobielní, tak stejně dlouho lze za zvláštních podmínek pěstovati in vitro jakoukoliv živou tkáň lidskou či zvířecí. Počátek těchto t. zv. tkáňových kultur byl ovšem značně primitivní. Teprve tehdy, když Carrelem a později jeho žákem Fisherem byl vypracován naprosto

přesný a neselhávající způsob kultivace, když do nejmenších podrobností byly prostudovány morfologické změny, výměna látková a zachycována přesným měřením křivka vzrůstová dceřinných tkáňových stejně velkých úlomků a když konečně izolovány byly různé tkáně ne ve směsi, nýbrž v čisté kultuře, stala se ze slibné biologické metody skutečná věda.

Tehdy již sami tvůrcové a zakladatelé tkáňových kultur počali zkoušeti, nedá-li se nového objevu použití pro pokus bakteriologický. Otázka byla nasnadě, neboť co mohlo být průkaznější než studovati přímo pod mikroskopem bezprostřední vliv mikroba na živou buňku, změny, jež z toho resultují a jež se mohou jeviti buď omezením či naopak vzbužením vzrůstu, změnou výměny látkové, nebo alespoň změnou intracelulární struktury. Ještě více pak upoutaly tkáňové kultury zájem bakteriologa, když se zamýšlel nad dvěma svrchu uvedenými problémy: kultivací filtrovatelných virů a některými otázkami immunity. Filtrovatelné viry, ač patří do domainy bakteriologa, nemohly dosud — snad s výjimkou peripneumonie hovězího dobytka — býti kultivovány za podmínek, jež jsou obvyklé pro bakterie, ať byly ony modifikovány a zlepšeny jakýmkoliv způsobem. Tolik bylo již jasno, že jejich životním prostředím jest pouze živé protoplasma a bez ní, že po delší či kratší konservaci zanikají. Tkáňové kultury ten material dodávají — proč ho nepoužít pro experiment tak zajímavý?

Tak se stalo, že tkáňové kultury byly zařazeny mezi důležitou a mnohoslibnou methodiku výzkumů bakteriologických. Ovšem podotknu hned, methodiku nad jiné pracnou a co do provozu luxusní. Dříve ještě než podám stručný výpočet toho, co na tomto poli bylo pro bakteriologický výzkum skutečně vykonáno, chci se zmíniti několika slovy o technice samotné a o způsobu práce.

Klasická metoda tkáňových kultur jest nesporně ona, jež byla zavedena Carrelem a Fisherem. Jednak pracuje s materiálem, jehož normální vzrůst a vývoj v kultuře jest nejlépe probádán, t. j. s embryonálním materiálem, nejčastěji kuřečím, za druhé pracuje za podmínek stále stejných a přesně definovatelných, tedy s tkáňovým kmenem, jenž ve svém vývoji jest naprosto stabilisován a nemění se, je-li chován za normálních podmínek. Jest tedy možno, pracujeme-li s tímto fixním materiálem, snadno registrovati případné úchytky od normy, ať jsou již jakéhokoliv rázu. Sterilně vyňatá živá částička embryonální tkáně dá se pěstovati dvojím způsobem. Jednak v kultuře kapkové na skličku či

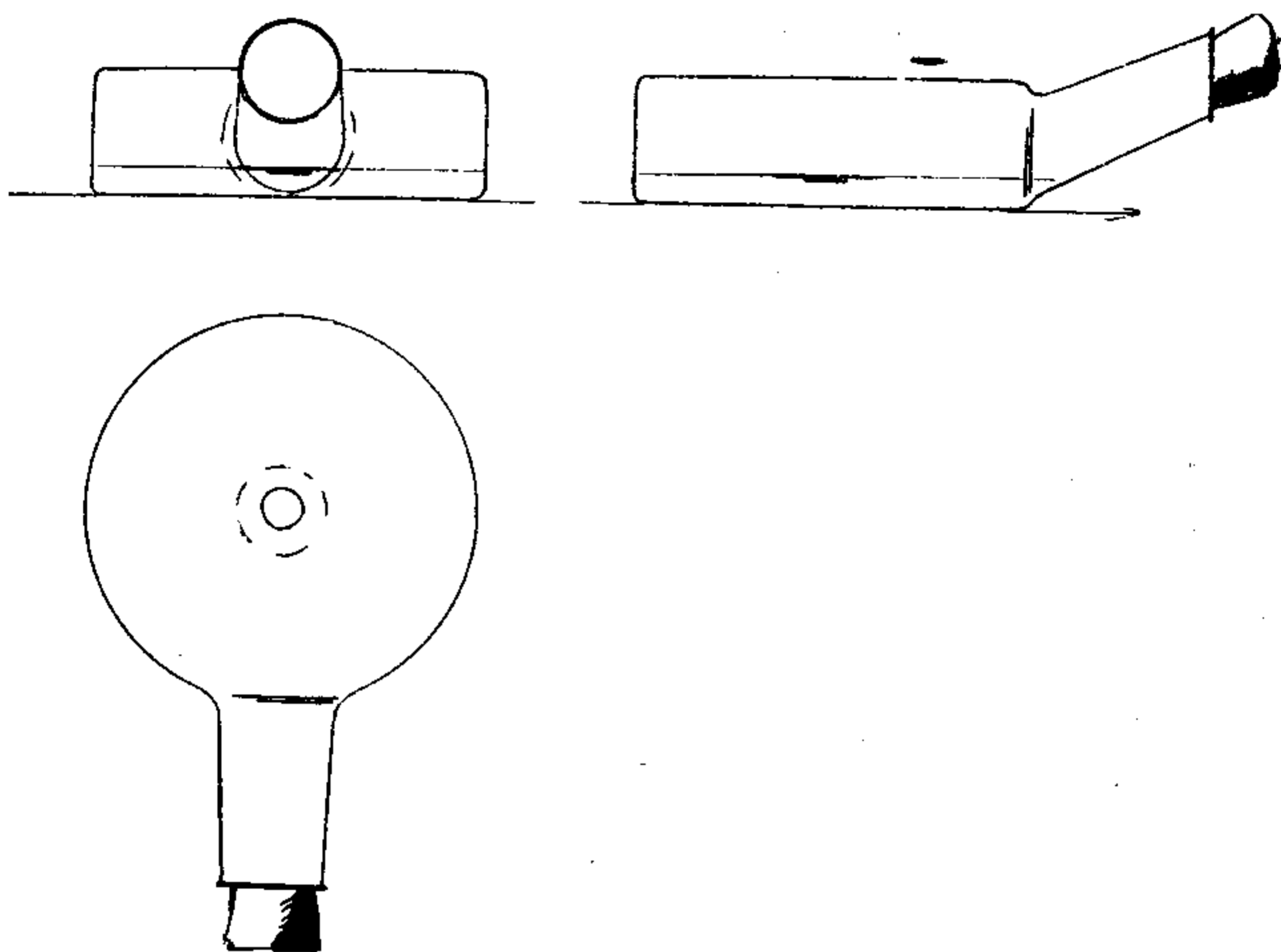
slídové deštičce, jednak ve zvláštních nádobkách Carrelových, částečně či úplně uzavřených a přístupných úzkým hrdélkem. Substrát, na němž se tkáň vyvíjí, může být různý. Nejvýhodnější jest slepičí krevní plasma, kterážto sterilně odňata vydrží dlouho nersažena a dá se konservovati po delší čas. Do té plasmy se uloží sterilní částekka tkáně a přidá výživná tekutina, kterou jest jediné šťáva z embrya zvířete pokud možno stejného druhu jako tkáň, již chceme pěstovati, tedy homologní. Tato šťáva z embrya, obsahující zároveň trombokinasu, podmiňuje srážení dosud tekuté plasmy, čímž explantát jest fixován a je mu získán potřebný pevný substrát, t. j. síť fibrinových vláken, podél nichž bují a rozrůstají se celulární elementy naočkované živé tkáně. Tkáň uvězněná uvnitř či na povrchu ztuhlé kapky v kultuře slouží hlavně k uchování tkáňového kmene. Tkáň, vyvinující se v Carrelově lahvičce, hodí se lépe k provádění experimentů, neboť ztuhlou vrstvičku plasmy, obklopující kultivovanou tkáň, možno lehce převrstviti tekutinou, chovající buď suspensi mikroba, emulsi orgánu, infikovaného filtrovatelným virem (na př. emulsi varlete infikovaného vakcinou, či mozku zvířete pošlého na lyssu, poliomyelitidu atd.), mikrobielní toxin, antitoxické serum, serum chovající lysiny bakterielní, celulární a různé jiné. Výhodou kultury ve visuté kapce jest snadná přeočkovatelnost, ale naproti tomu nesusnadné uchování po delší dobu (musí být přeočkována každý 3.—4. den). Kultury v lahvičce mohou být chovány řadu týdnů bez přeočkování, jen je-li pečováno o to, aby se škodlivé produkty výměny látkové časem odstraňovaly propláchnutím a dodala nová porce výživy ve způsobě zředěné embryonální šťávy. Nevýhodou jest obtížná manipulace při přeočkování. Částekky tkáně, již možno tímto klasičným způsobem pěstovati, jsou nepatrné. Nepřesahují obyčejně rozměrů 6—8 mm² a stačí mnohdy stěží na následný přenos na zvíře. Technika kultivace jest ohromně obtížná, vyžaduje velmi značnou technickou vyspělost a cvik mnoha měsíců. Jest nutno pracovati velmi trpělivě a velmi dlouho, než se docílí jen nepatrných výsledků. K sterilisování a přípravě této operace jest potřebí zvlášť školené osoby a co je nejhorší, sebe nepatrnější poklesek ve sterilitě vede často ke zničení práce, jež se konala řadu měsíců před tím. Další nevýhoda spočívá v tom, že některá tkáň embryonální a tkáň organismů dospělých se dá pěstiti jen velmi těžko. A právě u experimentů bakteriologických jest často potřebí pracovati jen s určitým druhem tkáně. Tak na př. se sice Fisherovi a po něm Doljan skému podařilo vypěstovati téměř úplně čisté kultury

epithelu, ale za obtíží takových, že není téměř možno pomýšletí na konání experimentů na př. s vakcinou, či variolou na čisté tkáni epitheliální. Ještě těžší problém jest kultivace tkáně nervové, lépe řečeno nervových buněk, jež vůbec se nemnoží, nýbrž vydrží určitý čas na živu, aby byly pomalu přebujeny fibroblasty. Veškeré tyto obtíže a snaha zjednodušiti techniku tkáňových kultur a učiniti ji přístupnou experimentálnímu badání všech bakteriologů, vedly prof. Borrela k pokusům, jichž výsledkem je jeho zjednodušená modifikace, od níž si slibuje velmi mnoho jak po stránce výzkumu experimentálního, tak — a to hlavně — po stránce změn histologických. Borrel s počátku kultivoval rovněž dvojím způsobem. Ve visuté kapce a v lahvičkách, jež jsouce modifikacemi lahviček Carrelových nazývají se podle svého upravitelce Borrelovými. Dnes úplně vymýtil ve svých experimentech kulturu ve visuté kapce a kultivuje pouze ve svých lahvičkách. Tvarem jsou tyto téměř úplně shodné s Carrelovými, jejich krček jest však úplně rovný. Rozdíl jest hlavně ve dnu. Lahvička jest na svém distálním konci úplně otevřena a dá se uzavřiti kulatým sklíčkem, jež se nejprve přilepí vaječným bílkem a dodatečně upevní Carrelovým voskem. Substrátem kultur jest opětně slepičí plasma, výživou embryonální šťáva, pokud možno homologní s kultivovanou tkání. Veočkování kultury jest však zcela jiné. Borrel sám tomu říká, že do plasmy naočkovává tkáň asi tak, jako bakteriolog pipetou emulsi mikrobů do zahřáté gelatiny. Již z toho vyjádření jest patrné, že Borrel nekultivuje jen jediný explantát jako Carrel a Fisher, dále že nedbá příliš na to, zdali docílí čistých tkáňových kultur. Jest totiž jisto, že naočkujeme-li tkáň obsahující třeba i převahu epithelu a menšinu fibroblastů jako tkáňovou kulturu, tu po čase obsahuje pouze fibroblasty, neboť epithelie jako méně resistantní a života schopné jsou velmi rychle překultivovány. Tkáň k explantaci získává Borrel většinou též z embryomu a její specificitu určuje podle místa, odkud byla vzata. Podle shora uvedeného jest jasno, že na př. je-li mu výchozím materiálem mozek, považuje kulturu za kulturu buněk mozkových, z vaziva za fibroblasty atd. Čemu nevěří, jest kultivace samostatné tkáně epitheliální. Ale jemu stačí alespoň počáteční převaha buněčných elementů jistého druhu. Embryonální mozek, sval či srdce drtí ve zvláštním sífovitém drtiči, útržky tkáně proplachuje Tyrodovým roztokem asi 3krát za sebou a $\frac{1}{2}$ cm³ zředěné suspense tkáňových útržků smísí s $\frac{1}{2}$ cm³ zředěné embryonální šťávy. Poté přilepí dno ke své sterilisované lahvičce,

pipetou zkrz hrdélko naleje asi $1\frac{1}{2}$ cm³ slepičího plasmatu a přidá rovněž sterilní pipetou asi $\frac{1}{2}$ cm³—1 cm³ ze směsi útržků tkáně + embryonální šťáva. Kultivuje obyčejně při 37° C na rozdíl od Carrela, jenž kultivuje při teplotách vyšších. Na utuhlou vrstvičku plasmatu, uzavírající v sobě četné tkáňové explantáty, může se při pokusech nalíti podrobně jako při experimentu u Carrela bakt. emulze, tekutina s filtrovatelným virem, toxin atd. Podstata jeho modifikace spočívá v následujícím. Po přidání explantátů s embr. šťávou k plasmatu počíná toto tuhnutí. Doba, po kterou se to pozvolna děje, stačí k tomu, aby ty nejtěžší kousky tkáně klesly zcela dolů, mezi skleněné dno a vrstvu plasmy. Zde pak, mezi sklem a plasmou jsou komprimovány, nacházejí zvláštní podmínky ke svému vývinu. Roztahují se a rostou převážně v rozměru plošném, při čemž adherují pozvolna na sklo. Je-li experiment ukončen, odtrhne se dno i s buňkami na něm lpícími, tyto se se skličkem ponoří do fixační dutiny a in toto barví. Ostatní částičky tkáně, které rostou ve vrstvě plasmatu samotného, vyvíjejí se prý atypicky a nemají pro experiment významu. Borrel sám tvrdí, že jeho explantáty se dají přeočkovat — je to však značně obtížné již proto, že z celé řady útržků tkáně jest těžko nalézt ten vhodný. Ostatně Borrel říká, že to ani není zapotřebí, že kultury fibroblastů mohou žítí věčně, to již prý Carrel dokázal. Nepotřebujeme to po něm opakovat. Borrelovy kultury se tedy udržují na živu prakticky pouze v jedné generaci — to znamená maximálně po dobu 3—4 týdnů. Nutno uznati, že technika jeho kultur jest nepoměrně lehčí než Carrélova, přibližující se skutečně běžnému bakteriologickému očkování. Nebezpečí znečištění jest úplně nepatrné a náklad takový, že si skutečně i chudší laboratoř může podobný luxus dopřát. Ovšem výsledky jeho experimentů mohou se posuzovati vlastně pouze podle jediného měřítka: mikroskopickým vyšetřením různými methodami zbarvených buněk, jež po skončení experimentu zůstaly lpěti na skleněném dně. Lze však právě tímto způsobem získati výsledky velmi zajímavé.

Nyní, než přejdu k posouzení vhodnosti obou method, bych rád podal zcela krátký přehled výzkumů, jež pro bakteriologii byly vykonány na poli tkáňových kultur. Zcela na počátku této éry stojí Lewisovy pokusy s fagocytosou tyfových bacilů. Fagocytosa rozličnými druhy buněk se ukázala různě mohutnou. V těchto pokusech pokračoval sám Carrel, jenž prostudoval undulující membránu klasmatocytů jako příčinu jejich čilejší fagocytární schopnosti ve srovnání s fibroblasty. Fischer pozoroval symbiosu sarkomových buněk s tuberkulosními bacily, aniž by tyto byly jakkoli omezeny či poško-

zeny ve svém vzrůstu. Smyth pozoroval ve tkáňových kulturách infikovaných tuberkulosními bacily vývoj epitheloidních a obrovských buněk, jakož i jejich následné pozvolné rozpouštění. Lymfocyty v tkáňových kulturách jsou pod vlivem tuberkul. bacilů stimulovány k rychlému vzrůstu. Jeví čilé amoeboidní pohyby a mají tendenci se seskupovati v houfečky. Kuczynski, Volbach a Schlesinger zabývali se kultivací původce exanthematického tyfu. A skutečně shledali, že se virus pomnožuje ve tkáňových

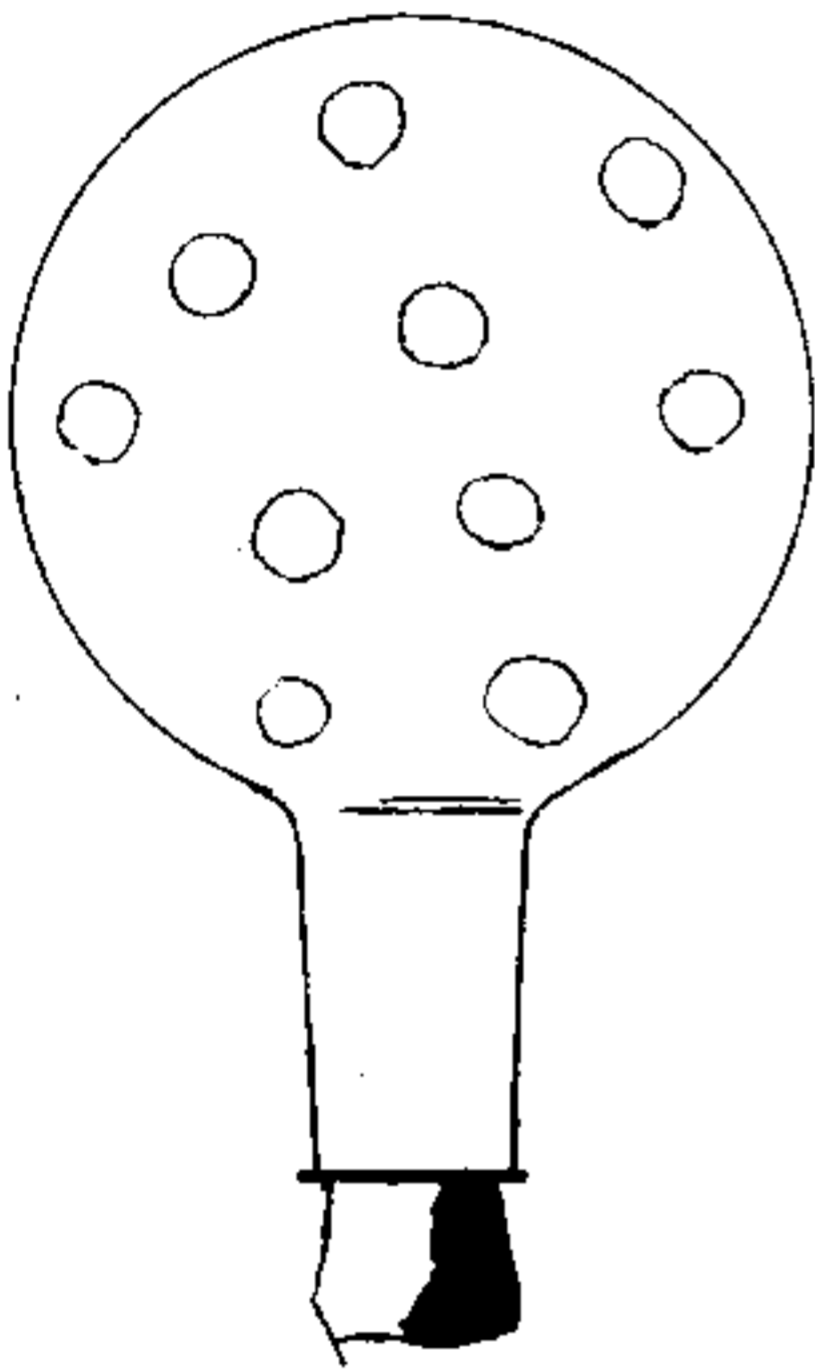
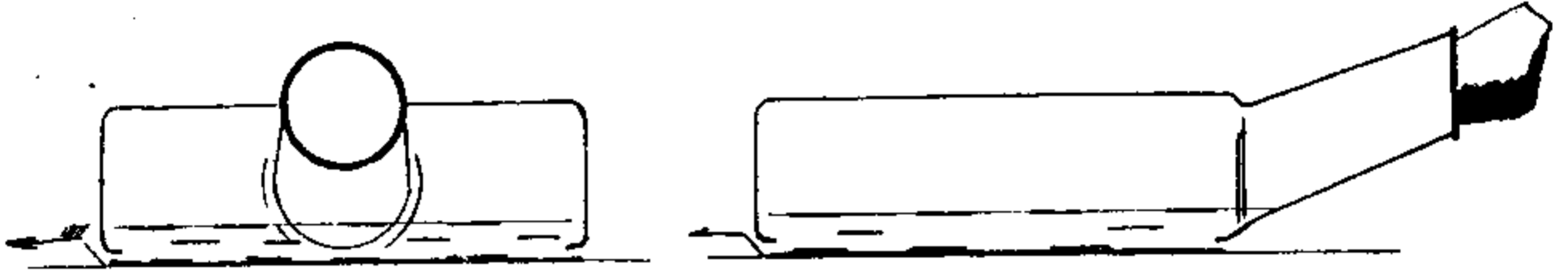


Obrázek I. znázorňuje tkáňovou kulturu v Carrelově lahvičce s explantátem rostoucím při povrchu slepičího plasmatu.

kulturách, založených ze sleziny infikovaných morčat, přidá-li se ovšem embryonální šťáva z morčecích emryonů. Sídlem viru jsou endotheliální buňky, které in vitro se stávají podobnými buňkám endoth. nemocných živých morčat. Pokud mohly být tyto endotheliální buňky přeočkovány, byl virus živý a pomnožoval se. Zašel pak současně s rozpadem těchto.

Velmi živý zájem poutala vakcína, již se také velká část prací týká. Již r. 1913 Steinhardt a Israeli uchovali delší dobu virus vakcinální v explantatech corney králičí. Pomnožení viru nebylo pozorovati, neboť explantát sám zůstal ve vzrůstu stacionární. Byl-li explantát kultivován v plasmatu zvířat immunisovaných, přestal býti infekčním. Fischer smísil čistou kulturu duhovkového epithelu a fibroblastů s emulzí vakcinálního viru a pozoroval, že se epithel brzy rozpadl, kdežto fibro-

blasty zůstaly zachovány. Skutečné pomnožení viru v tkáňových kulturách dokázáno po prvé Plotzem, jenž kultivoval kousky varlete z orchitis vaccinica s kousky varlete normálního. Virus byl uchován a mírně pomnožen po 6 přeočkováních. Pokus sám trval asi 54 dnů. Parker dokázal udržeti vakcin. virus po dobu 132 dnů v kulturách a pozoroval, že poslední kultura byla asi 50tisíckrát virulentnější než ta, s kterou pokus začal.



Obrázek II. znázorňuje explantáty v lahvičce podle Borrela, které se nacházejí ve vrstvě povrchové, uvnitř plasmatu a na skleněném dně, které se dá odtrhnouti a tkáň na něm lpící fixovati a barviti.

Carrel a Rivers pěstovali vakcinální virus v kulturách lahvičkových a docílili jako později Hagen pomnožení až 100tisícinásobného po asi měsíční době kultivační, takže předpokládali, že by se kultur tkáňových dalo použít ve velkém k výrobě vakciny. Levaditi kultivoval virus poliomyelitidy v gangliích nervových a třebaže nedosáhl zřejmého pomnožení, udržel ho na živu po dobu dvou měsíců. Týž kultivoval v ganliích opic virus lyssy a shledal, že explantáty i po měsíci stačily k infekci králíka. Parker dosáhl udržení, ale ne pomnožení viru herpetického v kulturách králičího mozku a varlat. Přidá-li se ke kultuře morčecí kostní dřeně kozí krev jako antigén, dokážeme v extraktu z kultury po 5 dnech inkubace specifické hemolysiny proti kozí krvi.

Levaditi a Muttermilch kultivovali částičky ze srdce kuřete, ponořené na krátký čas do antitoxinu diphter. v Carrelových lahvičkách, do nichž přidán zředěný dipht. toxin. Srdeční elementy jevily faktickou resistenci proti toxinu, jež se dostavila okamžitě. Tím mají tito autoři za prokázáno, že antitoxin se váže na buňky a chrání je proti toxinu, aniž by byl přítomen v tekutinách tkáňových, kde by se s toxinem spojoval.

Podobně dokázána v tkáňových kulturách produkce bakteriolyzinů, precipitinů a cytotoxinů, zejména cytotoxinů různých maligních nádorů.

Jest patrné z tohoto krátkého přehledu, že průkaznost většiny experimentů spočívá nejen v tom, že virus byl na živu udržen v jedné generaci, nýbrž že jevil i tendenci k pomnožení při následném přeočkování, jímž se tkáňová kultura omladí. K ukončení většiny těchto experimentů jest nutno explantát vyjmouti a provésti jím pokus na zvířeti, eventuálně imunitní reakci ve zkoumavce. Histologické vyšetření samo, jediná věc vlastně možná při zařízení Borrelově, nestačí přirozeně vždy experiment osvětliti. Nad to Borrel nemá vůbec možnost přesně srovnávati vzrůst kultury použité k experimentu, což jest velmi dobře možno u Carrela, který dělí původní explantát, vykultivovaný ve visuté kapkové kultuře, na dva stejné díly, jež přenáší do 2 svých lahviček. Jedna jest kontrolou, druhá experimentem.

Dále se naskýtá otázka, do jaké míry krásné preparáty Borrelovy, po stránce histologické jistě velmi zajímavé odpovídají skutečným změnám v explantatu, způsobeným vlivem experimentu a jak dalece jsou ovlivňovány abnormálním uložením pod plasmatem, vlivem tlaku a roztážením na skle.

Jako poslední uvedu biologický rozdíl obou method. Borrel kultivuje své tkáně se zanedbáním biologického principu tkáňových kultur. Jeho věci nejsou nejčastěji nesmrtelnou kulturou bujících celulárních elementů, nýbrž tkáňovými explantáty podléhajícími pozvolné nekrobiose. Důležitá podmínka všech biol. experimentů jest vynechána. dělati pokusy s elementem, jenž se za normálních okolností nachází v úplné rovnováze výměny látkové a energetické s tkání, jež se za normálních okolností prakticky nemění. Tkaňový explantát se stává pravou nesmrtelnou kulturou po době asi 3 neděl stálého přeočkování od okamžiku založení kmene. A tak tehdy, kdy tkáňová kultura podle Carrela se stává biologickou konstantou a může být použita k experimentu, Borrelova kultura již pozvolna zachází.