

10. Sejtkultúrák, sejtenyésztés a klinikai kutatásban

NAGY TAMÁS

Előzmények

ANTONI VAN LEEUWENHOEK (1632–1723) volt az első a történelemben, aki – saját készítésű mikroszkópjával – sejteket, egysejtű élőlényeket figyelt meg, többek között baktériumokat, izomrostot, spermiumot. 1839-ben THEODOR SCHWANN és MATTHIAS JAKOB SCHLEIDEN kidolgozzák azon elméletüket, hogy a növények és az állatok sejtekből épülnek fel. A XIX. század második felében jelentős előrelépésekre került sor a sejtkultúrák fenntartásához elengedhetetlen oldatok, médiumok kifejlesztésében; RINGER, akinek neve máig ismerősen cseng minden klinikus számára (Ringer-oldat), nátrium-, kálium-, kalcium- és magnéziumion-tartalmú oldatot készített, hogy állatok izolált szívpreparátumait életben tartsa. WILHELM ROUX 1885-ben speciális tápoldatban több napig életben tartott csirkeembrióból származó idegszövetet.

A sejtenyésztési technikák a múlt század negyvenes-ötvenes éveiben jelentős fejlődésen mentek keresztül; ebben az időszakban vált nyilvánvalóvá, hogy a vírusok önmagukban nem szaporodnak, tenyésztésükhöz és kimutatásukhoz élő sejtek szükségesek. Sejtkultúra segítségével dolgozták ki a pl. a poliomyelitis elleni vakcinát. JONAS SALK az ún. HeLa sejtkultúrát használta a poliomyelitisvakcina tesztelésére. A HeLa sejtvonalat nem sokkal halála előtt a Henrietta Lacks nevű méhnyakdaganatos betegből izolálták, ez az egyik legrégebbi immortalizált sejtvonal, amelyet máig széles körben használnak, és az első humán eredetű sejtvonal, amelyet sikeresen tenyésztettek [1, 2]. Jelenleg a sejtenyésztés szinte minden biológiai kutatólaborban használt általános technika, általános sejtelettani folyamatok és specifikus sejttípusok vizsgálatára is kiválóan alkalmas. Az őssejtkutatások központi kérdése, hogy a sejtkultúrák környezetének, körülményeinek megváltoztatásával hogyan lehet az elkötelezett sejteket specifikus feladatok irányába terelni. Szintén intenzíven vizsgált terület az elköte-

lezett sejtek visszafordítása éretlenebb sejté, hiszen így kiválthatnánk az embrionális őssejtek izolálását és kutatásra való felhasználását, amely eljárások máig vitatott etikai problémákat és kérdéseket vetnek fel.

Egyre szofisztikáltabb technológiai újítások teszik lehetővé, hogy a primitív, immortalizált sejtek helyett olyan sejtkultúrákat és a sejtek számára olyan mátrixokat hozzanak létre, amelyek nagyfokban hasonlítanak a szervezet szerveiben, szöveteiben élő elkötelezett sejtekre. Sőt talán nem kell hangsúlyozni, mekkora a jelentősége azoknak a kutatásoknak, amelyek több sejttípus felhasználásával élő szöveteket és szerveket próbálnak létrehozni.

Sejtenyésztés

SEJTTÍPUSOK

Sejtenyésztésben használt sejtek

A sejtenyésztésben használt sejteket eredetük szerint alapvetően három csoportra lehet osztani:

- primer sejtek;
- transzformált sejtek,
- embrionális sejtek és őssejtek.

Primer sejt

A primer sejtek valamilyen szövetből, szervből annak homogenizálása, szerkezetének kíméletes felbontása által nyerhetők ki. Ez a folyamat lehet mechanikus (pl. lágy szövetből – pl. az idegrendszerből – a szövetet egyre csökkenő belső átmérőjű pipettán/fecskendőn szívjuk át), vagy igénybe vehetők emésztőenzimek (pl. kollagenáz, tripszin), amelyek a sejt-sejt, ill. a sejt-extracelluláris mátrix közötti kapcsolatokat bontják fel. A primer sejtek általában lassabban vagy egyáltalán nem osztódnak, osztódásuk néhány ciklus után megáll, és a sejtek előregednek, el-fajulnak. Ezzel szemben előnyük, hogy kezdetben az

eredeti szövetre, szervre jellemző sajátságokkal rendelkeznek, mint pl. a sejt alakjának, morfológiájának, fehérjeexpressziós profiljának, sejtfelszíni markereinek megtartása. Általában ezek a tulajdonságok az első 1-2 osztódás során a legkifejezettebbek, a későbbi sejtek ezekből a jellegzetességekből veszíthetnek. A keretes mellékletben egy rövid módszertani leírást ismertetünk patkányszívizomsejt izolálásához.

Neonatalis szívizomsejt izolálása. 2–5 napos újszülött patkányokat használunk erre a célra. Az eltávolított patkányszíveket módosított MEM pufferben előbb steril szikével 1-2 mm-es darabokra vágjuk, majd kollagenáz enzim emésztésnek vetjük alá. 3-4 × 10 perces, 37 °C-on lejátszódó emésztési ciklus végén a sejtuszuspenziókat összeöntjük (poolozzuk). Centrifugálás (500 rpm, 10 perc) következik előbb főtális marhaszérumban, majd ún. „overnight” médiumban reszuspendáljuk a sejteket [(DMEM:M199 (4:1) + 15% FBS + penicillin (100 U/mL) + streptomycin (100 µg/mL) + arabinóz C (10 µM)]. A sejtuszuspenziót ezután kollagénnel fedett Petri-csészékbe vagy ún. „chambered coverslip”-re öntjük. A sejtsűrűség ~1×10⁶/mL, ez elegendő ahhoz, hogy a kitapadó cardiomyocyták összefüggő hálózatot alkossanak és spontán, ritmusosan kontraháljanak. 24 óra elteltével a médiumot szérumentes médiumra cseréljük (DMEM + Nutridoma supplement).

Természetesen egy adott primer sejttypus sikeres izolálása és tenyésztése eltérő lehet, így a módszert minden laboratóriumnak egyedileg kell optimalizálnia. Újabban gyári izolálókiteket is lehet vásárolni, sőt primer sejtvonalak is elérhetők kereskedelmi forgalomban, ez esetben a szállító garatálja a sejtszámot és a primer kultúra fenntarthatóságának időtartamát.

Transzformált sejt

A transzformált sejtek lehetnek malignus szövetből származó daganatos sejtek. Az ilyen sejtek élő szervezetben mutációk során alakulnak át kontrollt vesztett, immortális sejtekké (pl. a daganatos betegekből származó minták, lásd HeLa sejtvonat, vagy állatokban mesterségesen, pl. benzpirén, aflatoxin,

vírusok stb. révén előidézett daganatokból származó minták).

A transzformált sejtvonalak egy másik csoportja eredetileg primer sejt volt, de mesterségesen transzformáltak. Az utóbbit elő lehet idézni pl. vagy a telomeráz enzim expressziójának fokozásával, vagy vírusfertőzéssel (SV-40 vírus), vagy esetleg már malignusan transzformálódott sejtek fúziójával. Ez esetben *hibridómáról* beszélünk, amely mindkét „szülő” sejttypus sajátságait magán viseli: ilyen a korlátlan osztódásra való képesség, de megmarad a primer sejtre jellemző fenotípusa. A hibridómatechnológiát leggyakrabban antitestek gyártására használják: egy specifikus antitestet termelő B-sejtet fuzionálnak szintén B-sejt eredetű, de malignus myelomasejttel. A fúzió eredményeként a hibrid sejt hosszú ideig és relatíve rövid ciklusidővel képes osztódni, és szerencsés esetben megőrzi specifikus antitest termelésére való képességét is. Ezek az ún. *monoklonális antitestek* ma már a kutatásnak (immunhisztokémia, Western blot, immunprecipitáció stb.), de a diagnosztikának (szérumfehérjék, hormonok detektálása számos immunológiai módszerrel) is elengedhetetlen reagensai.

A transzformált, immortalizált sejtek, bár a primer sejtekhez képest nagyságrendekkel tovább tenyészthetők, bizonyos idő és osztódásszám (60–80 generáció) után szintén előregedhetnek. Ennek oka a sorozatos osztódásból adódó környezeti hatásokra kialakuló vagy random hibákból származó és egyre gyakoribbá váló DNS-replikációs hibák. Jelei: lassabb növekedés, gyakoribb apoptózis, az eredeti fenotípus eltűnése.

Össejt

Az össejtek differenciálatlan, ún. *pluripotens* sejtek. Ez azt jelenti, hogy egyrészt számos sejtosztódás után sem öregednek el (tehát ilyen szempontból hasonlítanak a transzformált sejtekhez), másrészt az osztódáskor keletkező „leánysejtek” elindulhatnak a differenciálódás irányába valamilyen külső inger hatására. *Totipotensnek* nevezzük azokat az össejteket, amelyekből bármilyen sejttypus kialakulhat, tehát gyakorlatilag egy teljes szervezet minden szöve. A *multipotens* össejtek számos, de egymással szoros rokonságot, hasonlóságot mutató sejttypussá tudnak csak alakulni, az *unipotens* össejt pedig csak egyetlen típusú differenciált leánysejtet képes létrehozni, természetesen önmaga osztódási képességének fenntartása mellett.

Össejteket izolálni több módon lehetséges. Az egyik módja, hogy 50–150 sejtből álló embrióból nyernek ki össejteket. Ez lehetséges állatból (pl. egér) vagy humán embrionális össejteket in vitro fertilizációt (IVF) követően a beültetésre nem kerülő, megtermékenyített petesejtekből. Az utóbbi eset, vagyis humán embrió felhasználása kísérleti célokra szigorú etikai engedélyekhez kötött, és a humán embrionális össejtkutatás jelenleg is komoly viták tárgya. Felnőtt állatokból vagy emberekből is származhat össejt, habár számuk az összes sejthez képest felnőtt szervezetben már kicsi és ezek nagy része is csak multipotens. A gyakorlatban izolálhatnak össejteket vérből, csontvelőből, köldökszinórvérből, de izomszövetből, szívizomból, bőrből vagy akár fejlődő fogból is. A hematopoetikus össejteket már régóta alkalmazzák terápiában is: a saját (autológ) vagy idegen (allogén), gyűjtött össejteket tenyésztés után a betegbe juttatják. Kedvező esetben az össejtek az előzetesen kemoterápiával vagy besugárzással kiirtott csontvelő helyén megtelepednek, és újra beindítják a vérképzést.

Újabban sikeres kísérleteket végeztek differenciált, szomatikus sejtek össejtállapotba való visszafordítására. 2006-ban elsőként japán kutatóknak sikerült emberi, differenciált bőrsejtekből össejteket előállítani oly módon, hogy vírus segítségével az össejtekre jellemző transzkripció faktorok génjeit juttatták be. Majd néhány hétre rá a sejtek az össejtekre jellemző morfológiát kezdtek mutatni, valamint a telomeráz enzim (amely megakadályozza a kromoszómák fokozatos rövidülését osztódás során, vagyis a sejtek öregedését) aktivitása is fokozódott [3].

Szuszpenziós vs. kitapadó sejtek

A sejtkultúrák típusait feloszthatjuk aszerint is, hogy kitapadó vagy szuszpenziós sejtekkel dolgozunk. A *szuszpenziós sejtek* leggyakrabban fehérvérsejtek vagy azok transzformált változatai, közös jellemzőjük, hogy a gyakorlatban elterjedt műanyag vagy üvegfalú tenyésztőedények falához nem vagy csak nagyon lazán kötődnek, enyhe rázás elegendő a leülepedett sejtek felkavarásához. E sejtek egymáshoz való kapcsolata is rendszerint kisfokú, az osztódások során ugyan az utódsejtek közel maradhatnak egymáshoz, kisebb csoportokat létrehozva, azonban néhányszor felpipettázva azokat egyenletes, homogén, „egysejtű” sejtszuszpenziót kaphatunk. A szuszpenziós sejtkultúrák előnye, hogy könnyebb a passz-

álás, nem igényel tripszines kezelést, valamint ideális alanyai azon kísérleteknek, ahol a sejteket egyesével, külön-külön szeretnénk vizsgálni (flow citometria, fluorimetria). Mikroszkópos vizsgálatokhoz, mint pl. az immunhisztokémia, a szuszpenziós sejteket ún. citospin eszközzel ülepíthetjük tárgylemezre [4]. A sejtszám optimális beállításával elérhetjük, hogy se túl sűrűn, se túl ritkán ne helyezkedjenek el.

A sejtvonalak nagyobb része *kitapadó sejtkultúra*, vagyis az edény falához, ill. egymáshoz tapadva „monolayereket”, sejtréteget képeznek. E tulajdonságukból kiindulva egy adott kultúra jellemezhető az ún. *konfluenciával*, vagyis hogy egy adott felület hány százalékát fedik le. A legtöbb sejttípusra jellemző valamilyen fokú kontakt inhibíció; ennek hiánya erősen differenciálatlan sejtet jelez. *Kontakt inhibíció* során a sejtek elfoglalva egy adott felületet, elegendő tápanyag esetén sem fognak tovább osztódni. Inhibíció hiányában a monolayer kialakítása után (vagy már közben) második, sőt további rétegeket foglalnak el.

Általános szabályként alkalmazható, hogy körülbelül 5–10% konfluenciát érdemes a passzálás során beállítani, majd a sejtek osztódása után 70–80% konfluenciát elérve tanácsos az újabb passzálást elvégezni. Ez azt jelenti, hogy ha pl. 24 óránként megduplázódik a sejtek száma (korlátlanul rendelkezésre álló tápanyagot feltételezve), kb. 3-4 naponta szükséges átpasszálni a sejteket. Kitapadó sejtekkel dolgozva a passzálás során először el kell távolítani a sejteket mind egymástól, mind pedig a tenyésztőedény felületéről. Ezt leggyakrabban tripszin és valamilyen Ca^{2+} -elvonó (EDTA vagy EGTA) kombinációjával érhető el. Mind a Ca^{2+} -megvonás, mind a sejtfelszíni fehérjék emésztése elősegíti a sejtek lekerekedését és leválását a felületről. Ezután mosást követően vehetjük fel a kívánt mennyiségű, homogén sejtszuszpenziót megfelelő mennyiségű friss médiumban. Az így kezelt sejtek általában néhány óra alatt ismét kitapadnak, és felveszik a rájuk jellemző morfológiát.

A kitapadó kultúrák előnyei:

- A sejtszámnövekedés könnyebben megítélhető.
- Esetleges kontaminációt könnyebb kezelni.
- Mikroszkópos kísérletek során nincs szükség citospinre, közvetlenül növeszthetők fedő- vagy tárgylemezen.
- Nagyobb méretű citoplazma segíti az intracelluláris történések megfigyelését.

- A sejtek egymással való kölcsönhatása is vizsgálható.

Sejtvonalak. Néhány gyakran használt sejtvonal (a teljesség igénye nélkül):

- HeLa: humán cervixcarcinoma.
- 3T3: egér fibroblast (3 naponta transzfer, 3×10^5 sejt/20 cm² sűrűséggel).
- Jurkat: humán T-sejt eredetű immortalizált sejtvonal.
- MDCK – kutyavese epithelialis sejt (Madin Darby Canine Kidney).
- RBL: patkányhízósejtek (Rat Basophilic Leukemia).
- SHSY5Y: humán neuroblastoma.
- Caco: humán epithelialis colorectalis adenocarcinoma.
- CHO: hörcsög petefészek (Chinese Hamster Ovary).
- PC12: patkány phaeochromocytoma.
- Hep G2: humán hepatocellularis carcinoma.

Természetesen több ezer további sejtvonal létezik, talán a legteljesebb katalógus, megvásárolható törzsekkel, az ATCC (American Type Culture Collection) honlapján található [5].

TENYÉSZTŐEDÉNYEK, FLASKÁK

A sejtek tenyésztéséhez ún. tenyésztőflaskákat alkalmazunk [6]. A tenyésztőflaskák helyett használhatunk steril Petri-csészét vagy akár steril, fektetett kémcsövet is, de a flaskák kiképzése biztosítja az optimális feltételeket:

- Felületet biztosít kitapadó sejtek számára. A kitapadás leggyakrabban a flaska anyagához történik, de bevonhatják a felületet pl. kollagénnel vagy poli-D-lizinnel a jobb kitapadás érdekében.
- A flaskát az inkubátorban elfektetve nagyobb felületen érintkezik a médium az inkubátor levegőjével, elősegítve ezzel a gázcserét.
- A döntött nyak megkönnyíti a pipettázást és a fektetett tárolást.
- A kupakban elhelyezett filter a gázcserét megengedi, de a pórusméretnél (0,2 µm) nagyobb részecskék, baktériumok átjutását nem.

Különböző méretben kaphatók flaskák, leggyakrabban 25, 75 vagy 150 cm² felszínű típusokat alkalmazunk. A kisebb, 25 cm²-es flaskát kb. 8–10 mL médiummal optimális feltölteni, a 75 cm²-es flaska 40–50 mL, a 150 cm²-es flaska pedig 100–150 mL médiummal is feltölthető anélkül, hogy az az inkubátorban a fektetett flaskából kifolyna.

A flaskák kívül gyakoriak a lemezek [7]. Különböző számú és méretű lyukakban (well) helyezhetjük el a sejteket tartalmazó szuszpenziót (6, 12, 24 vagy 96 lyuk). Ezeket a lemezeket nem elsősorban a sejtek fenntartására vagy szaporítására használjuk, hanem olyan kísérleteknél, ahol párhuzamosan több különböző kezelés hatását vizsgáljuk. Fedőlemezeket is elhelyezhetünk bennük, amelyeken a sejtek kitapadása után pl. immunhisztokémiai vizsgálatokat végezhetünk. A fedőlemezeket 96%-os alkoholba mártva, majd Bunsen-égő lángjában leégetve sterilizálhatjuk, mielőtt a sejtuszuszpenziót rápipettázzuk.

INKUBÁTOR

A sejtenyésztés elengedhetetlen feltétele a hőmérséklet és a gázcsere kontrollált körülmények között tartása, ezért minden sejtenyésztéssel foglalkozó laboratóriumban megtalálható legalább egy inkubátor. Az esetek nagy részében 37 °C-ot és normális légköri oxigén- és nitrogén tenzió mellett 5-os CO₂-tartalmat tartunk fent. Ez a CO₂- (vízben oldódva, fiziológias pH-n HCO₃⁻-tá disszociál) koncentráció jóval nagyobb a légköri értéknél (~0,04%), azonban megközelíti az emberi és állati szövetekben, kapillarisokban található, aerob metabolizmus által termelt HCO₃⁻-koncentrációt. Az inkubátorok a hőmérsékletet és csatlakoztatott gázpalack segítségével a CO₂-ot is a beállított értéken tartják. A levegő szűrőn keresztül jut el az inkubátor légterébe. A szűrő állapotát időszakosan ellenőrizni, szükség szerint cserélni kell. Mivel az inkubátor hőmérsékletét 37 °C-on tartjuk, a párolgás sokkal kifejezettebb, mint szobahőmérsékleten. Így az inkubátorba helyezett sejtenyészetek médiumai nagyon gyorsan bekoncentrálnának. Ennek kivédésére az inkubátorba egy edényben vizet helyezünk (lehetőség szerint desztillált vizet, és a sterilizására is ügyelni kell, hiszen könnyen kontamináció forrása lehet), ami az adott hőfokon telített vízgőzt alakít ki, megakadályozva a médiumok túlzott párolgását.

MÉDIUMOK

Médiumok összetevői

Míg régen általában a laboratóriumok maguk állították össze a médiumokat, manapság gyakoribb azok megrendelése biotechnológiai kereskedelmi cégektől. Kétféle formátum terjedt el: az azonnal használható oldat, ill. a tárolás szempontjából kedvezőbb por forma, ezt használat előtt megadott térfogatú vízben fel kell oldani és pH-ját beállítani.

A 10-1. táblázatban egy gyakran alkalmazott és viszonylag egyszerűbb összetételű médium, az RPMI-1640 összetételét ismertetjük. E médiumot gyakran alkalmazzuk „igénytelen”, jól tenyészthető sejtek esetén. Az RPMI mint „minimál” tápoldat összetétele jól demonstrálja a sejtek számára alapvetően szükséges összetevőket: ionok (nátrium, kálium, kalcium, magnézium, klorid), glukóz, vitaminok, esszenciális aminosavak.

Általában a megvásárolható médiumokból vagy a glutamin, vagy a nátrium-bikarbonát szándékosan hiányzik (a táblázatban pirossal jelezve), ezt utólag kell pótolni a médiumot használónak. Az utólagos adagolásra elsősorban a glutamin lebomlása miatt van szükség. Újabban a glutamint más aminosavhoz kötve (alanin), dipeptid formátumban adhatják, így a médiumban a glutamin koncentrációja lassabban csökken le, élettartama nagymértékben megnő. Ilyen médiumok vásárlásakor győződjünk meg arról, hogy az általunk használt sejttípus képes-e a dipeptidből kinyerni a glutamint.

A fenolvörös pH-indikátor savas oldatban sárga, lúgosban lila színű; ezáltal a régóta használt vagy nyitva felejtett oldatokban a szén-dioxid elpárolgását, eltűnését lila színnel, a sejtek metabolizmusa miatt felszapo-

10-1. táblázat. Az RPMI-1640 médium összetétele*

Vegyület	Mennyiség	Mértékegység
L-lizin-monohidroklorid	40	mg/l
L-szerin	30	mg/l
glicin	10	mg/l
L-aszparagin, vízmentes	50	mg/l
L-leucin	50	mg/l
L-prolin	20	mg/l
L-aszpartánsav	20	mg/l
L-triptofán	5	mg/l
L-glutaminsav	20	mg/l
L-izoleucin	50	mg/l
L-fenilalanin	15	mg/l
L-hidroxi-L-prolin	20	mg/l
L-valin	20	mg/l
L-cisztin-dihidroklorid	65,2	mg/l
L-hisztidin	15	mg/l
L-metionin	15	mg/l
L-arginin, kötetlen bázisos	200	mg/l
L-treonin	20	mg/l
L-tirozin-dinátrium, dihidrát só	28,83	mg/l
L-glutamin	300	mg/l
kalcium-nitrát-tetrahidrát	100	mg/l
nátrium-foszfát, dibázikus, vízmentes	800	mg/l
nátrium-klorid	6,000	mg/l
nátrium-bikarbonát	2,000	mg/l
magnézium-szulfát, vízmentes	48,84	mg/l
kálium-klorid	400	mg/l
folsav	1	mg/l
D-biotin	0,2	mg/l
miinozitol	35	mg/l
riboflavin	0,2	mg/l
D-Ca-pantotenát	0,25	mg/l
piridoxin-hidroklorid	1	mg/l
B ₁₂ -vitamin	0,005	mg/l
p-aminobenzoesav (PABA)	1	mg/l
kolin-klorid	3	mg/l
tiamin-hidroklorid	1	mg/l
nikotinamid (nikotinsavamid)	1	mg/l
fenolvörös nátriumsó	5,3	mg/l
L-glutation, redukált	1	mg/l
D-glukóz, vízmentes	2,000	mg/l

*A piros színnel jelzett vegyületek a készen beszerzett médiumból hiányozhatnak, utólag pótlandók.

rodó savak (tejsav, szénsav) megjelenését pedig sárga színnel jelzi.

Egy adott médiumon belül is számos változtatásra van lehetőség, pl. az egyik leggyakoribb, amikor glükózmentes médiumot rendelnek/állítanak elő. Mivel a médium általában 10–20 mM glükózt tartalmaz (alapesetben a sejtek bőséges tápanyagellátása élvez prioritást), fiziológiás (~5,5 mM) mennyiségű glükózt igénylő kísérletekben ilyen médium nem használható, glükózmentes médium glükózkoncentrációja viszont tetszőlegesen állítható be.

pH, indikátor

A médium pH-ját több tényező befolyásolja: a benne oldott pufferek (foszfátok, amfotér aminosavak, bikarbonát), az inkubátor által szabályozott $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, a szérum (albumin, fehérjék, laktát stb.) és a sejtek által termelt anyagok (bikarbonát, laktát). Médiumok elkészítésénél a bikarbonát hozzáadása után a pH-t általában 7,2–7,4 közé kell beállítani. Mivel a bikarbonát illékony, idővel a tárolás során a médium lúgos irányba változhat. Ezt a médium indikátora színváltozással jelzi is, legtöbbször ez mégsem okoz különösebb gondot, hiszen az inkubátorban a magasabb CO_2 -tenzió a pH-t megfelelő szintre állítja vissza.

Szérum

A táptalajok egyik legfontosabb összetevője a szérum. Ez leggyakrabban főtális marhasavó (FBS), de használható pl. lószérum, ezek keverékei vagy akár humán szérum is. A szérumra azért van szükség, mert a sejtek elsőprő többsége nem élne, nem osztódna pusztán szintetikus médiumot tartalmazó táptalajban. A szérumban többek között albumin, vastartalmú fehérjék (transzferrin), koleszterinforrás, inzulin és számos növekedési faktor található. A szérum pufferkapacitása segíti a pH-t fiziológiás tartományban tartani. Arányát általában 5–15%-ra (leggyakrabban 10%-ra) állítják be. Ez elegendő ahhoz, hogy a sejtek megfelelő egyéb tápanyagok esetén exponenciális növekedésnek induljanak.

Újabban megvásárolhatók ún. szérumkiegészítők is, amelyekben mesterségesen pótolják a felsorolt szérumalkotókat. Szérumkiegészítő választandó, ha egy speciális igényű sejtvonalat (pl. neuronalis eredetű sejtek) kívánunk tenyészteni. Számos különböző összetételű, előre gyártott szupplemens megvásárolható

vagy egyedi igény esetén magunk is megpróbálkozhatunk megfelelő összeállításukkal, kiegészítésükkel.

Számos esetben széruméheztetésre kerülhet sor, a médiumból kihagyjuk szérumot. Erre azért lehet szükség, mert az adott kísérletet annak jelenléte zavarja (szérumfehérjék megköthetnek bizonyos gyógyszereket, fluoreszcens festékeket, radioaktívan jelzett anyagokat). Mivel a szérum szükséges a sejtek növekedéséhez, a széruméheztetést a megfelelő sejtszám elérése után, maximálisan 24–48 óráig szokás alkalmazni. A sejtek osztódása ekkor leáll, hosszabb időtartamig fennálló széruméheztetés hatására pedig apoptózis is bekövetkezhet.

Régebben gyakran alkalmaztak hőinaktiválást, mielőtt a szérumot sejtenyésztésre felhasználták volna. Ennek az az oka, hogy az 56 °C-os, 30 perces kezelés a szérum komplementfaktorait és más, pontosabban meg nem határozott sejtnövekedés-gátló faktort is inaktiválja. Ez azonban idő- és eszközigenyes, ráadásul a kezelés inaktiválhatja a sejtek számára fontos faktorokat is. Amióta az FBS terjedt el az újszülött-marhasavó helyett, erre az eljárásra nemigen van szükség. Néhány differenciált sejtvonalnál azonban elképzelhető, hogy hőinaktivált szérumban jobban érzik magukat a sejtek. Ilyen esetekben továbbra is ez a választandó protokoll.

Antibiotikumok

A sejtenyészetek az élő szervezetből kiragadott monokultúrák, amelyek nem rendelkeznek immunitással, ezért a fertőzések, kontaminációk veszélye igen nagy. Ráadásul a használt médiumok kiváló táptalajt jelentenek a baktériumok számára is. A fertőzések elkerülése érdekében természetesen a sterilítási szabályok betartásán túl nagyon gyakran alkalmazunk a médiumokban antibiotikus védelmet. Az antibiotikumok kiválasztását és koncentrációját igyekszünk úgy beállítani, hogy effektív védelmet nyújtsanak, de ne gátolják a sejtek növekedését. A leggyakoribb alkalmazott kombináció a 100 U/mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin keveréke. Ez elegendő arra, hogy az óhatatlanul a médiumba kerülő, de kis csíraszámú baktériumokat megölje, masszív kontaminációt azonban nem képes kivédeni, hiszen nagyon gyorsan kialakul az antibiotikumrezisztencia.

Komplett DMEM médium készítése

Tájékoztatásul ismertetjük az egyik leggyakrabban

használt médium, a DMEM elkészítését és kompletálását.

- A por formában kapható (pl. Sigma®, Invitrogen®), 1 L médium készítésére elegendő médiumot (kb. 10g/L) ~900 mL desztillált vízben folyamatosan keverve feloldjuk.
- A gyártó által javasolt mennyiségű NaHCO_3 -ot (általában 2 g) kimérjük, és a médiumhoz adjuk. A keverés során igyekezzünk elkerülni a túlzott buborék/hab képződést.
- Lehetőség szerint minél hamarabb beállítjuk a pH-t 7,3 ($\pm 0,05$) értékre 1 N sósavval.
- Az oldatot desztillált vízzel 1 L-re egészítjük ki.
- Hozzáadunk 10% FBS-t (100 mL). Opcionális: kiönthetünk a médiumból 100 mL-t, mielőtt az FBS-t hozzátesszük, így valóban 10%-os lesz, valamint a kiöntött médiumot külön tárolva később felhasználható olyan esetekben, amikor a szérumtartalmú médium nem alkalmazható.
- Hozzáadunk 10 mL, 100X antibiotikum- törzsoldatot (10 000 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin), így a végkoncentráció 100 U/mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin lesz.
- A komplett médiumot steril fülke alatt 0,22 µm pórusátmérőjű steril szűrővel, ugyancsak steril, autoklávozott üvegedénybe leszűrjük.
- Amennyiben e lépések bármelyikét nem tudjuk rögtön elvégezni, érdemes a médiumot lezárni, lefedni, állás közben ugyanis a bikarbonát CO_2 formájában idővel távozik a rendszerből, a pH-értékét megváltoztatva.
- Az FBS-t általában 0,5 L-es kiszerelésben árulják; érdemes 50 mL-es részletekre osztani (steril edényben, csövekben), és fagyasztva tárolni. Az antibiotikum-törzsoldatból szintén érdemes legalább 100 mL-t készíteni, és 10 mL-es alikvotokban, fagyasztva tárolni.

A TENYÉSZETEK KEZELÉSE

Passzálás, szuszpenziós sejtek

A tápanyagok fokozatos felhasználása miatt időről-időre szükséges a médiumot lecserélni a sejtekről. Ez végezhető az eredeti médium megtartásával vagy a médium teljes cseréjével. Az első esetben is törekedni kell arra, hogy az elhasznált médium aránya minél kisebb legyen, pl. 1 mL sejtsuszpenziót 9 mL friss médium oldatával hígítunk.

Célszerűbb azonban a teljes médiumot lecserélni: ez esetben steril centrifugacsőbe, csövekbe töltjük a kívánt mennyiségű sejtet tartalmazó szuszpenziót, majd rövid, kis sebességű centrifugálás után (1200 rpm, 2 perc) a felülúszót leöntjük (figyelve arra, hogy a nem túl erősen letapadt sejteket a cső aljáról ne keverjük fel), majd friss médiumban, néhányszori fel-le pipettázással felvesszük a sejteket.

Amennyiben kitapadó sejtkultúrának csak a médiumát kívánjuk lecserélni, egyszerűen leöntjük a használt médiumot és újat pipettázunk a sejtekre. Fontos, hogy a pipettázással ne mossuk le a sejteket: irányítjuk a pipettát a flaska oldalfalára.

Tripszin

A kitapadó sejtkultúrák passzálásához szükség van a sejtek szuszpenzióba vitelére. Ehhez a mechanikus eltávolítás – a sejtek lekaparása valamilyen steril, nem túl éles végű eszközzel, pl. sejtkaparóval (cell scraper) [8] – is megfelelő lehet, ha nem célunk homogén, különálló sejtekből álló szuszpenzió készítése. Mivel azonban a sejtek erősen tapadhatnak egymáshoz, a mechanikus eltávolítás, majd az ezt követő kitaró pipettázás sem elegendő homogén sejtsuszpenzió létrehozására. Passzálásnál azért van erre szükség, mert a sejtek gyorsabban osztódnak, gyorsabban benövik a rendelkezésükre álló felületet, ha egyenletesen elosztjuk őket. Ellenkező esetben a nagyobb sejtcsoportok, csomók a kontakt inhibíció miatt eleve lassabban osztódnak, és egyenetlenebbül is oszlanak el a tenyésztőedény felületén.

Tripszines emésztés során a tripszin a sejtek közötti fehérje-fehérje, ill. a sejt (membránfehérjék) és a tenyésztőedény felülete közötti kapcsolatokat roncsolja el.

A tripszines oldat összetétele:

- 0,25% (g/g) tripszin
 - 0,5 mM EDTA
- PBS-ben oldva.

Az EDTA szerepe a Ca^{2+} megvonása, ui. a Ca^{2+} fontos kofaktor a sejtek kitapadásához. Sok esetben már az EDTA-s oldat is elegendő lehet a sejtek szuszpenzióba vitelére, PBS pedig biztosítja a fiziológiás ozmotikus koncentrációt és pH-t.

A tripszines passzálás menete:

- A médiumot tartalmazó üveget tegyük 37 °C-os vízfürdőbe, vagy várjuk meg, amíg szobahőmérsékletre melegszik.

- Az elhasznált médiumot leöntjük vagy leszívjuk a sejtekről.
- 1-2 mL steril PBS-sel (vagy akár a tripszinoldattal) mossuk a sejteket, vigyázva arra, hogy a mosófolyadék pipettázásakor ne sodorjuk le a sejteket (célszerű a tenyésztőedény oldalára irányítani a pipettát).
- A mosó leszívása után 0,5–1,5 mL (a tenyésztőedény felületétől függően) friss tripszinoldatot pipettázunk a sejtekre, és meggyőződünk arról, hogy a teljes felületet ellepi az oldat.
- 37 °C-os termosztátba helyezzük a tenyészetet 2–15 percre (az időtartam függ a sejttípustól, ill. a tripszin minőségétől, az optimális időt egyénileg kell meghatározni).
- Az inkubálás után a szuszpenzióba került sejteket (a flaska enyhe ütögetésével meggyorsíthatjuk a folyamatot) steril csőben lecentrifugáljuk (500 rpm, 5 perc, vagy mikrocentrifugában 10 másodperc „pulse” üzemmódban), a felülúszót leöntjük, és a sejteket friss, komplett médiumba felvesszük.
- Mivel a komplett médium tartalmaz szérumot, az pedig antitripszint, a tripszinezés után mosás nélkül is felvehetjük a sejteket, ügyelve arra, hogy a tripszin alaposan kihíguljon (legalább 30–50-szeresre).
- A szuszpenziót új, steril tenyésztőedénybe helyezzük, azt pedig a 37 °C-on termosztátba. Ügyeljünk arra, hogy flaskában a sejtsuszpenzió egyenletesen ülepedjen le (körkörös mozgásokat, a flaska szükségtelen rázását kerüljük).

Fontos megjegyezni, hogy a tripszines emésztés valamilyen mértékben mindig károsítja a sejteket, ezért annak időtartamát érdemes a még szükséges minimumra csökkenteni.

Sterilizálás, filtrálás

Eszközök

A sejtenyésztés elengedhetetlen feltétele a sterilitás megteremtése. Minden olyan eszköznek, oldatnak, edénynek, amely a sejtekkel kapcsolatba kerülhet, sterilnek kell lennie. Pipetták, műanyag tenyésztőedények, Petri-csészék, centrifugacsövek megvásárolhatók steril csomagolásban. Ezek az eszközök egyszer használatosak, ui. a gyártó γ -besugárzással sterilizál, amire normális laboratóriumi körülmények

között általában nincs mód, az autoklávozás hőfokát pedig nem mindegyik műanyag eszköz bírja.

Az üvegeszközöket, ill. azon oldatokat, tápfolyadékokat, amelyek minősége hőkezelésre nem változik, autoklávozhatjuk: 120–130 °C, fél óra időtartamig elégséges sterilitást ad. Ügyeljünk arra, hogy az autoklávban legyen elegendő víz, ill. hogy az üvegedényeket lazán zárjuk csak, így a forró vízgőz a belső felületüket is fertőtleníti.

Tápfolyadatok szűrése

A tápfolyadékok többségét nem célszerű autoklávozni vagy egyéb hőhatásnak, kémiai hatásnak kitenni, ezért itt a választott sterilizációs módszer a szűrés. Az oldatokat (természetesen előzetesen sterilizált vagy sterilen megvásárolt) filteren szűrjük át, túlnyomás vagy ellenkező oldali szívás (vákuum) segítségével [9]. A filter pórusátmérője legfeljebb 0,22 μ m lehet. A szintén kapható 0,4 μ m pórusátmérőjű filterek csak előszűrésre alkalmasak, hiszen számos baktérium átmérője ennél kisebb. Meg kell azonban jegyezni, hogy a 0,22 μ m pórusátmérőjű filter sem véd meg minden kórokozótól: a vírusokat nem szűri ki, ill. a sajnos nagyon gyakori mycoplasmát sem.

„Laminár boks”

A sejtenyészetekkel való foglalkozás során különös gondot kell fordítani arra, hogy a kialakított steril körülményeket fenntartsuk. Az ún. laminár boks olyan fülke, amely egyenletes, szűrt légáramlatot biztosít, így a fülke alatt dolgozva a nyitott edényekbe a levegőből bekerülő kontamináció esélyét csökkenti. A fülke lehet negatív vagy pozitív nyomású. A negatív nyomású a fülkét használó személyt védi elsősorban, veszélyes (pl. *M. tuberculosis*) anyagokkal való munka során (egyenletes légáramlás – „légfüggöny” mellett) a fülke alatti levegő a negatív nyomás miatt nem kerülhet ki közvetlenül a kinti térbe. Pozitív nyomás esetén az áramoltatott levegő egy része a nyitott fülke ajtaján kiszökik, viszont ez a pozitív nyomás a kinti levegő szálló részecskéit, a potenciális kontaminációt „kifűjja”.

A laminár boxok filterei (amelyek a lamináris áramlású levegőből kiszűrlik a lebegő részecskéket) időszakosan cserére szorulnak. Ugyancsak ellenőrizni kell megfelelő műszer segítségével a bekapcsolt fülké belsejében a levegőben található részecskék számát. A legtöbb fülke rendelkezik beépített UV lám-

pával. Bekapcsolásával (ha a fülke zárt és a ventiláció ki van kapcsolva) a fülke belső felületét, terét lehet sterilizálni: 15 perc UV megvilágítás a munka megkezdése előtt és után elegendő.

A fülke alatt végzett munka szabályai;

- Minden edényt, tenyésztőflaskát, médiumot tartalmazó üveget, steril pipettahegyek dobozát csak addig nyitjuk ki, amíg dolgozunk vele, utána azonnal visszazárjuk.
- Kesztyűt kell használni.
- Nyitott edény felett nem nyúlunk át, mert a pipettahegyről vagy a kezünkről beszennyezhetjük a sejtkultúrát.
- Az edények, flaskák kupakját fejfelé tegyük le, így annak steril felülete nem ér a fülkéhez vagy más, a fülkében található tárgyhoz.
- Bunsen-égő használata; bezárás előtt az edények száját, ill. a kupakokat rövid ideig (1-2 s) „leégethetjük” Bunsen-lángban – fontos, hogy Bunsen-lángot csak bekapcsolt lamináris áramlás esetén használjunk, és soha ne hagyjuk felügyelet nélkül vagy a kelleténél tovább bekapcsolva!
- A munka megkezdése előtt 15 percre kapcsoljuk be a fülke UV lámpáját. A munka végeztével alkoholos dezinficiálóval a munkalapot töröljük át, majd ismét kapcsoljuk be az UV-t szintén kb. 15 percre.

A TENYÉSZET KONTAMINÁCIÓJA

Felismerés

A kontaminációt okozhatja baktérium, gomba, vírus, mycoplasma vagy akár egy másik eukarióta sejtvonal, sejttípus is.

A *bakteriális* kontaminációt könnyű felismerni, mert a populáció növekedése jóval gyorsabb, mint a sejteké: kétóránként megduplázódhat a baktériumok száma. Ezt jelzi a médium gyors lesavanyodása (a médium pH-indikátora sárga színre vált), zavarossá válása. Sokszor az inkubátort kinyitva már jellegzetes szag fogadja a kutatót. Mikroszkóp alatt már közepes nagyítással is jól megfigyelhetők a nyüzsgő baktériumok. Antibiotikus védelem mellett a baktériumok szaporodása lassabb lehet, de amint kialakul az antibiotikumrezisztencia, felgyorsul a folyamat. Általában a tenyésztett sejtek elhalása is bekövetkezik a baktériumok hatására.

Gombás kontamináció szerencsére jóval ritkább, kevésbé fulmináns, és mikroszkópban szintén könnyen felismerhető jellegzetes morfológiája alapján.

A *vírusfertőzések* sajnos kevésbé feltűnőek, sokszor csak a sejtek látszólag indokolatlan pusztulása hívhatja fel a figyelmet rá. Hagyományos sterilizációs eljárások elégtelenek a vírusok eliminálására, a vírusok a filtereken átjutnak, ill. maga a sejt hordozhatja a vírust intracellulárisan. Amennyiben nem ismert, megbízható forrásból származó sejtvonalat alkalmazunk, a saját biztonságunk érdekében is különösen ügyelnünk kell a sterilitás betartására. Primer, különösen humán eredetű sejtek tenyésztésében hepatitis-, HIV-vírus is előfordulhat.

A *mycoplasma* által okozott kontamináció sajnos nagyon elterjedt, és kivédése is nehéz, mivel intracelluláris kórokozó. A kereskedelmi forgalomban kapható szérumok is nagyon gyakran mycoplasmával fertőzöttek, ill. a garantáltan mycoplasmamentes szérumok sokkal drágábbak. A kontamináció meglete nehezen fedezhető fel, viszont kísérleti eredményünket megzavarhatja. Ilyen a mycoplasma hatása a peroxidáz/kataláz aktivitásra, ami szignifikánsan befolyásolhatja pl. egy H_2O_2 -vel kiváltott oxidatív stressz kísérlet eredményeit. A mycoplasma felfedezésére számos kit áll rendelkezésre, in vivo festési technikák vagy PCR alapú detekciós eljárások egyaránt.

Elsősorban primer kultúránál, de többféle, nem kellő körülményekkel kezelt, immortalizált sejtvonal tenyésztésében is előfordulhat a *sejttípusok keveredése*. Csekély számú, akár egy-két rossz helyre került sejt is okozhat komoly problémát, hiszen már minimális előnnyel rendelkezve is néhány generációt követően túlsúlyba kerülhet, „túlnőheti” a másik sejtvonalat. Primer kultúránál leggyakoribb a fibroblastszennyezés; ez a médiumot illetően viszonylag igénytelen sejt, gyorsan osztódik.

Kezelés, a sejtvonal megmentése

A kontamináció elkerülésének alapja a precíz, steril munka, a fülke rendeltetésszerű használata, steril, egyszer használatos eszközök, antibiotikumok alkalmazása. Gyakori médiumcsere nem csak a sejtek tápanyagforrását hivatott szolgálni, de az óhatatlanul bejutó baktériumok megtelepedésének esélyét is csökkenti.

A kontamináció felfedezése után az első dolog a még meg nem fertőzött kultúrák elkülönítése, és amennyiben lehetséges, a kontamináció forrásának

felkutatása. Ha rendelkezünk lefagyasztott, biztosan kontaminációmentes sejtekkel, a kontaminált kultúrát dobjuk ki, és olvasszuk fel a tárolt törzset.

A médiumokat, törzsoldatokat, ha szemmel láthatóan kontamináltak, mindenképpen, de ha nem vagyunk biztosak benne, akkor is célszerű kiönteni és új, friss oldatokat készíteni (esetleg opció lehet a médium újbóli szűrése is). Az inkubátor dezinficiálása (és amennyiben szükséges, a filterek cseréje), a használt eszközök újbóli sterilizése, a nem sterilizálható kidobása ugyancsak elvégzendő.

Még korai fázisban és nem pótolható sejtek kontaminálódásakor megpróbálkozhatunk a kontaminációmentesítéssel. Először is a sejteket steril, biztosan kontaminációmentes médiumban kell mosni, majd – ha baktériumfertőzés történt – antibiotikus kezelést alkalmazni (ha eredetileg is alkalmaztunk antibiotikus védelmet, természetesen váltani kell más típusú, más hatásmechanizmusú antibiotikumra). Gyakori médiumcsere is hasznos lehet, esetleg több, külön kezelt kisebb csoportra osztva a sejteket növelhetjük a sikeres dekontamináció esélyét.

Vírusfertőzésben nem sok lehetőségünk van, célszerű új, vírusmentes törzsszel újratekdeni a tenyésztést, és a fertőzött sejteket kidobni. Mycoplasmafertőzés leküzdésére viszont ma már kaphatók meglehetősen hatásos kitek, amelyekkel a sejtvonal megszabadítható a mycoplasmától. Ugyanakkor sikeres mycoplasma-mentesítést követően fontos a monitorozás, ill. a továbbiakban biztosan mycoplasma-mentes médiumok alkalmazása.

Másik sejttel, sejtvonallal történt keveredés után egyetlen választandó megoldás a fagyasztva tárolt, homogén sejtkultúra újraindítása. Ugyanakkor primer, nem osztódó sejtek esetén a fibroblastok növekedésének megakadályozására alkalmazhatunk mitózisgátló citozin-arabinozidot (Ara-C). Nem tünteti el a fibroblastokat, de megakadályozza, lassítja az osztódásukat, így a primer sejtek túlsúlya tovább megmarad. Szintén alkalmazható primer sejteknél, kisszámú sejt esetén sztereomikroszkóp alatt a morfológiai jegyek alapján elkülönítve a nem kívánt sejtípus mechanikus elpusztítása (pl. vékony steril tűvel).

FAGYASZTÁS, FAGYASZTÁSBÓL VALÓ FEOLVASZTÁS

Mivel még az immortalizált sejtek sem tenyészthetők a végtelenségig, valamint a kontamináció veszélye

miatt a sejtvonalakat több részre osztva, hosszú távon folyékony nitrogénben fagyasztva tároljuk. Egy új sejtvonalból izolálása vagy beszerzése, vásárlása után, minél hamarabb, néhány passzálás után célszerű lefagyasztani sejteket, 2-3 egymást követő passzálásból külön-külön.

Fagyasztás során a lassú fokozatos fagyasztás, valamint ún. „cryopreservative” anyagok hozzáadásával (dimetil-szulfoxid (DMSO), glicerin) gátoljuk meg a jégkristályok kialakulását és a sejtek struktúrájának sérülését.

A fagyasztás menete:

- Kb. 10^6 , log-fázisban lévő sejt, legalább 90% viabilitással.
- Szuszpenzióba hozzuk a sejteket (kitapadó sejtek esetén tripszinezéssel, szuszpenziós kultúránál elegendő centrifugálás után friss médiumban felszuszpendálni).
- Lecentrifugáljuk (1200 rpm, 2 perc), majd 1-2 mL *fagyasztó médiumban* reszuszpendáljuk a sejteket (komplett tenyésztőmédium 5–10% DMSO-val kiegészítve; a fagyasztó médiumot a DMSO hozzáadása után szűrjük!).
- 2 mL-es, steril, ún. „cryo-vial”-ba, fagyasztócsövekbe töltjük a sejtsuszpenziót (1 mL/cső) [10].
- $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hűtőbe helyezzük a csöveket, vagy még jobb, ha speciális fagyasztóval szabályozottan hűtjük le (controlled rate freezer [11]).
- 24 óra múlva a csöveket áttesszük folyékony nitrogén ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) tartályba, ahol hosszú ideig tárolhatók [12].
- Fontos a folyékony nitrogénes tároló nyilván tartásának naprakész vezetése, ami nagyban megkönnyíti az esetenként több száz, évekkel korábban lefagyasztott minta megtalálását.

Sejtek kiolvasztása:

- Készítsük elő a sejtek tenyésztéséhez szükséges médiumot és a tenyésztőflaskát.
- Vegyük ki a nitrogénből a sejteket tartalmazó csövet.
- Hagyjuk szobahőmérsékleten kiolvadni.
- Centrifugálást követően mossuk egyszer komplett tenyésztőoldatban, majd pipetázzuk át a médiumot tartalmazó flaskába.
- 24 óra múlva cseréljük médiumot, így a lassab-

ban üledő, ki nem tapadó, elhalt sejtektől, sejtörmeléktől megszabadulva az életképes sejtek túlsúlyba kerülnek.

A TENYÉSZET SEJTJEINEK OSZTÓDÁSA, SEJTSZÁMVÁLTOZÁSOK

Populáció, növekedés

Médiумcsere nélkül a sejtek száma időben szigmoid görbe lefutását mutatja. Kezdetben exponenciális növekedés figyelhető meg (ezt megelőzi egy „lag”-fázis, amely a sejteknek ahhoz szükséges, hogy a tripszinnel való kezelés, az előző elhasznált, tápanyagban szegény, savas médiум okozta stagnálás után ismét log-fázisba kerüljenek. A log-fázis végén a tápanyagok elfogyásával lassulás következik be, majd a sejtek osztódása teljesen leáll, sőt friss médiум adásának elmulasztása esetén apoptózis és sejtszámcsökkenés következik be [13].

A sejtek számára ideális körülmények között – log-fázisban – a következő sejteket figyelhetjük meg:

- Élő, nyugalmi fázisban (G0) lévő sejtek (kitapadó sejtek esetén ellapult, széles citoplazmával, laza kromatinszerkezetű maggal rendelkező sejtek): >85–90%.
- Osztódó sejtek (lekerekedett sejtek, keskeny citoplazma, „denz” kromatin): 1–10%.
- Apoptotikus sejtek, elhalt sejtek, sejtörmelék (kisebb, kontrasztosabb részecskék, lebegnek vagy más sejtekhez tapadhatnak): < 5%.

Ez az átlagos összetétel természetesen optimálistól eltérő körülmények között megváltozhat, ezért célszerű a sejtek fenntartása esetén naponta egyszer, a médiум színe (pH) és a sejtsűrűség megítélése mellett mikroszkópban is ellenőrizni a sejtkultúrákat.

Szinkronizáció

Szinkronizálás alatt azt értjük, hogy minden sejt (de legalábbis a sejtek nagy többsége) a sejtciklus ugyanazon fázisába kerül (pl. G1, S, G2). Ennek elérésére szérumeheztetést, timidint vagy egyéb kémiai ágenst alkalmaznak, amellyel a sejteket valamelyik fázisban megállítják, amíg az összes sejt ugyanazon fázishoz nem ér. A helyes módszer megválasztása sejtfüggő, és nem utolsó szempont a sejtek átlagos ciklusidejének ismerete.

Az itt ismertetett protokoll szerinti szinkronizálás elvégzése a HeLa sejtekben a sejtciklus G1/S fázisban való szinkronizációját okozza, amely 1-2 sejtciklus idejéig fennmarad:

- Növesszük a sejteket standard DMEM + 10% FBS médiumban kb. 40% konfluenciáig.
- Adjunk a médiумhoz 2 mm végkoncentrációjú timidint (törzsoldat legyen kb. 20-szoros; 40 mm oldva PBS-ben).
- Inkubáljuk 37 °C-on 19 óráig (fontos az idő betartása!).
- Mossuk a sejteket 3-szor steril PBS-sel.
- Adjunk friss (timidinmentes) médiумot, és újabb 9 óráig inkubáljuk a tenyészetet 37 °C-on.
- Ismét 2 mm timidint adjunk a médiумhoz és inkubáljuk 16 óráig 37 °C-on.
- A sejtek G1 fázisban vannak, új, timidinmentes médiumban szinkronizáltan fognak belépni a sejtciklus következő fázisába (S) [14].

A sejtszám monitorozása

Gyakorlattal rendelkező kutató a sejtenyésztő flakon áttekintve az oldat fényszórásából vagy a felületre kitapadt, szabad szemmel is látható monolayerből is jó közelítéssel meg tudja mondani, mennyi sejt található a médiumban, vannak azonban ennél pontosabb és informatívabb mérési lehetőségek.

Talán legegyszerűbb *Bürker-kamra* használata [15], ahol az osztott felületű tárgylemez és 0,1 µm távolságra lévő fedőlemez közé cseppentjük a sejtsuszpenziót, majd mikroszkópban leszámoljuk a sejteket. Elvégezhető festés nélkül is, de célszerű a sejtekhez 1:10 arányban 2%-os tripánkék oldatot adni. Ez az ún. *vitálfestés* az élő sejteket nem, csak az elpusztult sejteket festi kékre, így a sejtek száma mellett azok viabilitását is megmérhetjük.

A Bürker-kamránál pontosabb eredményt kaphatunk, ha *sejtszámláló automatában* is meg tudjuk mérni a sejteket. A rutin klinikai laboratóriumokban használt vérképes automaták ún. nyitott módban alkalmasak homogén sejtsuszpenziók mérésére, és szemben a Bürker-kamrában leszámolható néhány száz sejttel, az automata több ezer sejtet mér le pillanatok alatt. A fényszórási értékek ismeretében (forward scatter, side scatter) a sejtek méretéről, morfológiájáról is információt kaphatunk.

Nagyszámú sejtet tartalmazó mintában a *sejtek* *össztömege* is informatív lehet, sőt teljes kiszáritás

előtt és után megmérve azt, a *nedves és száraz súlyt* is megkapjuk. Pontos tömegméréshez analitikai mérleg (0,1 mg-os érzékenység) és legalább 80–100 mg nedves súlyú sejt kell. Az utóbbi mennyiség már elegendő ahhoz, hogy elfogadható hibán belül tudjuk a sejtledekről a felülúszót leszívni és a súlymérést nedves és száraz súly esetén is elvégezni.

A sejtek alkotóinak, pl. a DNS vagy a fehérjék izolálás utáni mennyisége is egyenesen arányos a kiindulási sejtmennyiséggel. Habár a *fehérjemennyiség meghatározása* általában nem az elsőként választott módszer sejtnövekedés ellenőrzésére, nagyon gyakran alkalmazzuk viszonyítási alapnak egyéb sejtalkotók koncentrációjának mérésekor. *Ionok*, pl. a kalcium vagy a *kis molekulák, metabolitok*, pl. glükóz-6-foszfát koncentrációját sejtféhrjére vonatkoztatjuk (mmol/g protein vagy mg/g protein).

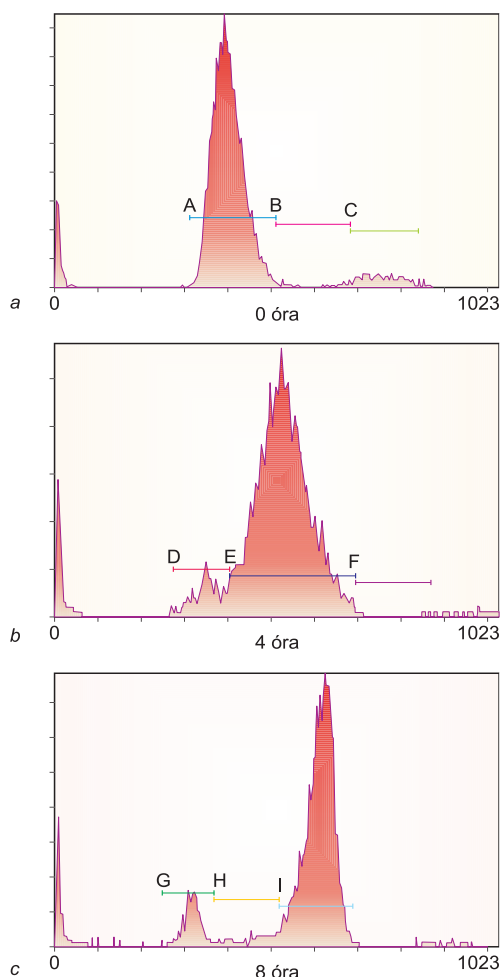
A sejtciklus követése

A mikroszkópos megfigyeléssel csak durva becsléssel állapíthatjuk meg az osztódó sejtek számát, azonban a sejtciklus egyéb fázisaiban lévő sejtek vizsgálatához festés szükséges. A propidium-jodid fluoreszcens festék, amely a kettős szálú DNS (vagy RNS) láncába interkalálódva fest. Az élő sejt membránján nem jut át a festék, viszont az elpusztult vagy fixált sejtekbe bejut, és a festődés mennyisége arányos lesz a sejtekben található DNS (RNS) mennyiségével. A megfestett sejteket legkönnyebben áramlási citométerrel (flow citométer) mérhetjük le, így minden (több ezer) sejt fluoreszcenciáját és az azzal arányos DNS-mennyiségét külön-külön le tudjuk mérni.

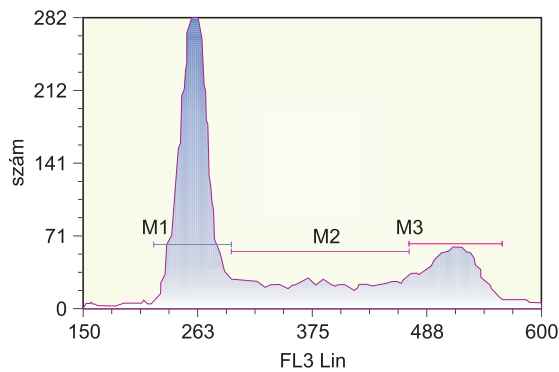
A propidium-jodid-festés menete:

- Nagyjából 10^5 – 10^6 , homogén, különálló sejtekből álló szuszpenziót készítünk, PBS-ben mosuk.
- Lecentrifugáljuk (kb 8–10 s, pulzus üzemmódban), majd 50 μ L kivételével a felülúszót leszívjuk.
- A maradék 50 μ L PBS-ben a sejteket alaposan felkeverjük, majd cseppenként 1 mL jéghideg (az eljárás előtt fél órával -70 °C-es hűtőben hűthetjük le), 96%-os alkoholt adunk a mintához. Minden csepp után vortexszel összekeverjük. Ez a felszálló sorozatú alkoholkezelés fixálja a sejteket, valamint kioldja a lipidkomponenseket, így átjárhatóvá válik a sejtmembrán a propidium-jodid számára.

- A mintát 2-szer mossuk PBS-ben. Az etanolfixált sejtellel könnyebben felkeveredik a felülúszó leszívásakor, így fokozott óvatosság szükséges e művelet elvégzésekor.
- A sejteket 1 mL propidium-jodid-oldatban szuszpendáljuk fel (az oldat összetétele: PBS, 0,1% Triton X-100, 20 μ g/ml propidium-jodid, 0,2 mg/ml RN-áz A). A Triton X-100 detergens, a festék sejtbe való bejutását segíti elő, az RN-áz pedig a RNS molekulákat bontja le, így csak a kettős szálú DNS fog jelölődni. A propidium-jodid karcinogén, ezért megfelelő elővigyázatosság szükséges! Bőrre kerülve bő vízzel azonnal mosuk le!
- 30 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten, sötétben,
- A mintákat mosás nélkül, azonnal vizsgálhatjuk flow citométerrel, 610 nm hullámhosszú fluoreszcens detekcióval.



10-1. ábra, a, b, c. Jurkat-sejtek propidium-jodid-festődése (1)



10-2. ábra. Jurkat-sejtek propidium-jodid-festődése (1)

A 10-1. a, b, c ábra és a 10-2. ábra Jurkat-sejtek propidium-jodid-festődését mutatja. A legnagyobb csúcs a G0, G1 fázisban lévő sejtek (M1), a második, kisebb csúcs a G2 fázisban lévő, dupla DNS-tartalmú, ezért nagyjából dupla mennyiségű propidium-jodiddal jelölődött sejtek számát adja meg (M3). A kettő közötti, átmeneti régió az S fázisú, DNS-replikációt folytató sejteket mutatja (M2). Ezeken a csoportokon kívül előfordulhat nagyobb mennyiségű jelölés (triploid, multiploid sejt, esetleg két vagy több sejt összetapadását a műszer 1 sejtnak érzékeli) vagy kisebb (apoptotikus vagy elhalt sejtek).

Apoptózis kimutatása

Az apoptózis fokának mérése egyrészt a sejtenyésztés optimális körülményeinek beállítására is kiválóan alkalmas, de még gyakrabban alkalmazzák konkrét kísérletekben a sejtek életképességének felmérésére. Az apoptózis több módon is detektálható, pl. a DNS-fragmentáció vagy a kaspázaktivitás mérésével, továbbá a foszfatidil-szerin membrán transzlokációját kimutató Annexin-V-vel.

Az utóbbi módszer esetén élő, fixálatlan sejteket rövid (15 perc) ideig propidium-jodid és fluoreszcinnel konjugált Annexin-V keverékével inkubáljuk. A propidium-jodid az elhalt sejteket festi, míg az Annexin-V minden olyan sejthez kötődik, amelyen bekövetkezett a foszfatidil-szerin membrán transzlokációja. A jelölés után flow citometriával detektálhatók a sejtek.

Négy csoportot különíthetünk el:

1. Élő, egészséges (kettős negatív) sejtek.
2. Élő, apoptotikus (Annexin-V-pozitív, propidium-negatív) sejtek.
3. Apoptózisban elhalt sejtek (kettős pozitív).
4. Nekrotizált sejtek (propidium-pozitív) [16].

DETEKTÁLÁS – A SEJTKULTÚRA ÁLLAPOTÁNAK ELLENŐRZÉSE, AZ ÁLLAPOT VÁLTOZTATÁSA

Az immunhisztokémia, immunfluoreszcencia, Western blot, Southern blot, PCR módszer alanyai természetesen nagyon gyakran sejtenyésztésből származó sejtek, minták. Valamennyi kísérleti technikát, mérési módszert azonban lehetetlen itt részletesen tárgyalni. Ehelyütt a korábban már említetteken kívül azokat említjük meg, amelyek in vivo vizsgálják a sejteket, vagy magával a sejtenyésztés technikájával mint módszertannal összefüggésbe hozhatók.

A médium összetételének változása

A sejtkultúra állapotát nemcsak a sejtszám, a sejtosztódás mérésén keresztül deríthetjük ki. A médium rengeteg információt tartogat: a sejtek által elhasznált anyagok vagy a sejtek által termelt és médiumba kiválasztott anyagok vizsgálatának jelentős szerepe van. Ilyenek pl.:

- glükóz, laktát, pH (a metabolizmus állapota, növekedés nyomon követése),
- összetétel ellenőrzése (pH, ionok, aminosavak),
- felhasznált anyagok (pl. radioaktív izotóp felvétele),
- kiválasztott anyagok detektálása (laktát, export fehérjék).

Különösen a sejtek által termelt fehérjék kerülnek gyakran a megfigyelés középpontjába. Ezek lehetnek – a teljesség igénye nélkül – hormonok, extracelluláris mátrixfehérjék, immunglobulinok, de a sejthalás termékei is: laktát-dehidrogenáz, kretin-kináz, troponin stb. Fontos megjegyezni, hogy ez esetben a szérumtartalmú médiumot szérummentesre kell cserélni, majd bizonyos idő elteltével mintát gyűjteni a fehérjék detektálásához. Túl rövid idő kis kiválasztott fehérjemennyiséggel, túl hosszú pedig a szérumheztetésből fakadó nem kívánt mellékhatásokkal jár; alapesetben 24 óra után célszerű a mintavétel.

In vivo detektációs módszerek

A mikroszkóp minden sejtekkel foglalkozó laboratórium elengedhetetlen kelléke. Szükséges egy invertált mikroszkóp, amelynek tárgyasztalán a tenyésztőflaska elfér, így bármikor ellenőrizhető a sejtek osztódása, kitapadása, morfológiája.

Ha sejtünk fluoreszcens anyagot tartalmaz, pl.

Green fluorescent proteint (GFP-t) termel, vagy fluoreszcens festéket juttattunk a sejtekbe (pl. Fluo3 festéket, amely a Ca^{2+} -hoz kötődve zölden fluoreszkál) szükség lehet *fluoreszcens mikroszkópra*.

Fluoreszcens spektrofotometria alkalmazható; szintén élő sejteket vizsgálnak, általában sejtszuspenzióban, de speciálisan kialakított küvettában fedőlemezre kitapadt sejteket is elhelyezhetünk. Az előbb említett Ca^{2+} -festéket tartalmazó sejteket fotométerben pontosabban és nagyobb számban mérhetjük meg, mint mikroszópban.

Transzfekció

Transzfekciónak nevezzük azt a módszert, amikor kívülről juttatunk a sejtbe *nukleinsavat*. Amennyiben ezt vírussal tesszük, szokás *transzdukcióról* beszélni. A transzfekció, transzdukció (amennyiben szándékos) célja, hogy a sejtek fehérjeexpressziós profilját megváltoztassa (akár új fehérjék termelődnék, akár meglévők szintje nő vagy csökken), ezáltal a fenotípus megváltozzék.

Mivel ezek a nukleinsavak meglehetősen nagy molekulák, a sejtmembránon való átjutást elősegíti ún. *transzfekciós ágensek* alkalmazása (lényegét tekintve kationos lipid, liposzómát alkotva beolvad a sejtmembránba, tartalmát a sejt belsejébe ürítve), vagy elektroporáció felhasználása, amikor elektromos tér hatásra ideiglenes pórusok, lyukak keletkeznek a membránban. *Vírus általi transzdukció* is szóba jöhet, amelynek előfeltétele, hogy a vírus genomjának tartalmaznia kell az adott fehérjét kódoló szekvenciát.

A bejuttatni kívánt nukleinsavat leggyakrabban *expressziós vektorban* (módosított plazmid) kódolják. Sikeres transzfekció után a sejt termelni fogja azt a fehérjét, amelyet a vektor kódolt. Egy GFP-t kódoló szekvenciát beillesztve a vektorba (akár úgy, hogy translációkor az expresszálni kívánt fehérjével ún. kimérát, közös fehérjét alkosson a GFP, akár két különálló fehérjetermékként) monitorozhatjuk a transzfekció sikerességét.

A transzfekció lehet átmeneti vagy állandó. Az utóbbi esetben a transzfektált szekvencia beépül a sejt saját genomjába. Általában elegendő az ideiglenes transzfekció, de ha stabil transzfekció a célunk, szükséges egy szelekciós marker beépítése is. Ilyen pl. egy toxikus anyag rezisztenciagénje. A genéticin (G418) a legtöbb sejtre toxikus hatással van, de ha transzfektáljuk a sejteket a rezisztenciagénnel (egy közös vek-

torban más génnel együtt), akkor csak azok a sejtek maradnak életben és szaporodnak, amelyek genetikai állományában a vektor (és benne a rezisztenciagén) stabilan megtalálható.

A *géncsendesítés* (RNA silence) fiatal módszer, de gyorsan népszerű lett sokoldalú felhasználhatósága miatt. Egy rövid (20–25 nukleotid hosszúságú), ún. siRNS-t (short interfering RNA) juttatnak a sejtekbe, amelyek egy adott, komplementer szekvenciájú gén expresszióját csökkentik azáltal, hogy a messenger RNS-hez kötődve annak lebomlását, degradációját okozzák. Az siRNS-ekkel a sejtek természetes mechanizmusát használjuk ki: normális sejt is használ siRNS-t és mikroRNS-t, egyrészt a virális, parazitás fertőzés elleni védekezőmechanizmusban, másrészt az siRNS-ek a fehérjeexpresszió fontos szabályozó elemei [17].

Állatkísérleti modellek

Előzmények

Természeténél fogva állatkísérlet végzése sokkal régebbre tehető, mint a sejtes modellek. Már az ókori görögöktől (ARISZTOTELÉSZ) és rómaiaktól is maradtak feljegyzések állatkísérletek végzéséről. GALENUS a második században, mivel a római birodalomban az emberi boncolás tilos volt, majmokon és sertéseken elvégzett vizsgálatokból kiindulva és azokat az emberi szervezetre is érvényesnek tartva alapozta meg az anatómia, a patológia, a fiziológia, a neurológia tudományát. Felfedezte, hogy az erek két csoportba oszthatók: artériákra és vénákra, ugyanakkor úgy gondolta, hogy ezek két különálló rendszert alkotnak, a vénás vér a májban, az artériás a szívben termelődik. GALENUS keringési rendszerről alkotott tanai egészen 1628-ig kitartottak, amikor is WILLIAM HARVEY bebizonyította, hogy a szív pumpaként keringteti a vért.

A XII. században az arab világban AVENZOAR emberi boncoláson kívül állatkísérleteket is alkalmazott a sebészeti beavatkozásai tesztelésére, mielőtt emberekre végrehajtotta volna azokat. A középkorban és azt követően is gyakori kísérleti alanyok voltak az állatok, a „modern” tudomány pedig, habár számos kritika érte és éri állatvédelmi szempontból, egyelőre nem talált tökéletes helyettesítést, és továbbra is kénytelen állatokat feláldozni a kísérletek oltárán.

Bevezetés

Állatkísérletekre általában akkor kerül sor, ha az egyszerűbb modellek, mint pl. a sejtkultúrákon végzett kísérletek sikeres, új felfedezéseket hoztak, vagy igazoltak egy elméletet, és a kutatók szeretnék magasabb szerveződési szinten is megvizsgálni az adott problémát. Hasonlóan állatkísérleteket végeznek, ha a felvetett tudományos cél eleve nem vizsgálható sejteken, mert szöveti, szervi vagy szervrendszeri folyamatokat kívánnak vizsgálni. Ehelyütt nincs mód arra, hogy a számtalan kísérleti módszert ismertessük, ezért a továbbiakban néhány általános szempontot emelünk ki az állatokkal való tudományos munkával kapcsolatban.

Mintavétel

Az állatkísérletek több csoportba oszthatók:

- Mintavétel nincs, az állatot „egészben” vizsgáljuk. Megfigyelhető a viselkedése, a tünetei, megismerhető afiziológiája, utódai, megvizsgálhatók képkötő eljárással, boncolással belső szervi elváltozásai stb.
- Az állat „csak” a minta forrása, pl. bizonyos sejteket izolálunk vagy bizonyos szöveteket, szerveket (pl. izolált szívperfúziós kísérletek), amelyeken azután magát a kísérletet elvégezzük.
- A különböző kezelésen átesett (pl. gyógyszerkipróbálás, sebészeti beavatkozás stb.) állatokat feláldozzuk, majd mintákat gyűjtünk különböző szövetekből kísérletünk sikerességének tesztelésére.

A két utóbbi esetben a minta izolálása és feldolgozása között eltelt idő és a minta tárolásának módja döntő fontosságú. Az élő szervezetből eltávolított szövetek megfelelő védelem nélkül gyorsan bomlásnak indulnak, ezért az elsődleges (természetesen az etikai előírások betartása mellett) a kísérlet megtervezésekor a minta minél gyorsabb feldolgozása. Izolálás után azonnal megfelelő hőmérsékletű és összetételű tápfolyadékban tartva megnövelhető a szövetek, sejtek élettartama. Folyékony nitrogénben való lefagyasztás és tárolás célszerű, ha a mintavétel helyén nem lehetséges az azonnali feldolgozás. Ha a mintából fehérjéket szeretnénk izolálni, proteázinhibitor adjunk a mintához, RNS izolálásához (amely, szemben a DNS-sel, különösen labilis) kaphatók RNS-stabilizáló oldatok szövetek számára (pl. Qiagen – RNeasy).

Vérvétel esetén, akárcsak a humán diagnosztikában, elengedhetetlen megfelelő alvadésgátló kiválasztása és mintagyűjtés után centrifugálás az alakos elemek elválasztására.

A standardizálás elvei

Éppen az állati szervezetek bonyolultsága okán az állatkísérleteket sokkal nehezebben lehet kivitelezni standard körülmények között – nehezebben standardizálhatók, hiszen a biológiai variabilitás sokrétűbb (a sejtkultúrákhoz viszonyítva).

Néhány szempont, amely segítheti a standard körülmények kialakítását:

- Állandó páratartalom, hőmérséklet, nappal-éjszaka ciklus (12–12 óra).
- Ugyanazon időszakokban adagolt, ismert mennyiségű táplálék és ivóvíz – az állatok által elfogyasztott mennyiség feljegyzése, súlygyarapodásuk regisztrálása.
- Csak hím vagy csak nőstény állat alkalmazása.
- Egyazon korú és hasonló súlyú állatok (a kísérleti állatok életkora döntő faktor lehet bizonyos kísérletek megtervezésekor).
- Idegrendszeri, viselkedésbiológiai vagy a tanulást, a memória állapotát felmérő vizsgálatok során, de sokszor egyéb esetben is (pl. hormonok, adrenalin vagy akár vércukorszint mérésekor) az állatot ért ingerek, az egymással való összezárás megléte vagy hiánya is fontos szempont lehet.

A felsorolt követelmények maximális betartása mellett is nagy valószínűséggel nagyobb lesz a kísérleti eredmények szórása, mint sejtkultúrákat vizsgálva.

Kísérleti állatfajok

A megfelelő *állatfaj kiválasztása* számos tényező eredője:

- A kísérlet célja (pl. humán vonatkozás, gyógyszerkipróbálás esetén az emberrel minél közelebbi rokonságban lévő fajt érdemes választani).
- A szükséges esetszám (nagy esetszámhoz szapora, gyorsan tenyészthető állat használata indokolt).
- A rendelkezésre álló „facility”-állatház felszereltsége.
- Az adott fajra jellemző szekvencia-adatbázis elérhetősége (manapság már szinte az összes, gyakran használt állatfaj genomja elérhető).

- Specifikus, adott fajra jellemző tulajdonságok vizsgálata.
- Költségek: „cost–benefit”.

A leggyakrabban használt fajok a következők:

Emlősök: egér, patkány, macska, kutya, sertés, majom.

Rovar: *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica – klasszikus, de máig használt alanya a genetikának, egyedfejlődése mindössze 7 napig tart).

Halak: zebrahal (zebradánio – gerincfejlődés, genetika).

Újabban elérhetővé váltak genetikailag módosított vagy ritka mutációval rendelkező állatok is. Néhány példa:

- ún. knockout egerek, amelyek valamely génje mesterségesen el lett némítva;
- ZDF (Zucker Diabetic Fatty) patkányok [18] 2-es típusú diabetes betegséggel rendelkeznek;
- a GFP állatok [19] genetikai állományát úgy módosították, hogy a GFP fluoreszcens fehérjét termeljék a sejtjeik.

Az állatkísérleti modellek előnyei

- Összetettebb rendszer, emberi fiziológiára, humán kutatásokra könnyebben adaptálhatók.
- Több szervet, szövetet lehet egyszerre vizsgálni.
- Primer sejteket lehet izolálni különböző szövetekből.
- Műtéti eljárások kidolgozása és nyomon követése.
- Több szerv, szövet kölcsönhatásának vizsgálata.
- Daganatok terjedésének vizsgálata.
- A keringési rendszer vizsgálata (szívizom teljesítménye, érrendszer állapota bizonyos hatásokra).
- Magasabb idegi funkciók vizsgálata (tanulás, memória, viselkedés, magatartás).

Az állatkísérleti modellek hátrányai

- Etikai engedély köteles.
- Összetett rendszer, sokkal körülményesebb standardizálni a sejtvizsgálatoknál. Nagyobb a szórás, ebből következőleg nagyobb esetszám szükséges.
- „animal facility” állatház fenntartása szükséges.
- Költségesebb.

- Kísérlet időtartama általában hosszabb.
- A kísérleti szerek, gyógyszerek hatásos dózisa nehezen számítható ki. A készítményekből jóval nagyobb mennyiség szükséges, ami megdrágítja a kísérletet. Sokszor nem adható be a kísérlet szempontjából szükséges dózis, mert az állat elpusztulna, holott az általunk vizsgálni kívánt szerv, szövet még elviselné az adott dózist.

Etikai megfontolások

Míg a sejtkultúrákhoz meglévő sejtvonal esetén etikai engedély általában nem szükséges (kivéve az őssejtkutatásokat), addig az állatkísérletek engedélykötelesek. Az ismertetendő magyarországi törvényi szabályozás előírja a következőket [20]:

- Az állatkísérleteknek indokoltnak, tudományosan megalapozottnak kell lennie. Bizonyítani kell, hogy más módon az adott kísérlet nem végezhető el (pl. alapvető sejtélettani funkciók vizsgálatához elegendő sejtkultúra, de a keringési rendszer vizsgálata csak magasabb rendű, élő szervezet segítségével lehetséges).
- Biztosítani kell, hogy a legkevesebb, még elégséges számú állatot, a lehető legkíméletesebb módon használunk fel a tudományos kísérlet során.
- Alapos dokumentáció szükséges minden egyes állatról.
- Az engedélyért való kérelmet a Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsághoz (MÁB) kell benyújtani.

Idézet a 1998. évi XXVIII., Az állatok védelméről és kíméletéről szóló törvényből:

25. § (1)

(2) Állatkísérlet kizárólag nyilvántartásba vett intézményben és engedély alapján végezhető.

(4) Állatkísérlet kizárólag akkor engedélyezhető, ha annak elvégzését

a) az ember, a gerinctelen és gerinces állatok vagy növények betegségének, kóros egészségi állapotának, egyéb rendellenességének elkerülése, megelőzése, felismerése és gyógyítása, valamint azok élettani állapotának feltárása, felderítése, szabályozása vagy módosítása érde-

kében gyógyszerek, élelmiszerek, egyéb adalékanyagok vagy termékek fejlesztése, termelése, minősítése, hatékonyságának és ártalmatlanságának vizsgálata,

b) az emberek vagy állatok egészsége vagy jólléte érdekében a természetes környezet védelme,

c) tudományos kutatás,

d) oktatási és gyakorlati képzés, vagy

e) igazságügyi orvostani vizsgálatok elvégzése teszi szükségessé.

(5) Az engedélyezés során – a kérelmező által benyújtott dokumentáció, továbbá az állategészségügyért felelős miniszter (a továbbiakban: miniszter) által felkért szakértői testület véleménye alapján – különösen figyelembe kell venni:

a) az állatkísérlet elvégzésének indokoltságát és tudományos megalapozottságát.

27. § (1) Az állatkísérlet során felhasznált állatok számát a feltétlenül szükséges mértékre kell csökkenteni. Azt a vizsgálati módszert kell választani, amely előreláthatóan a legkisebb fájdalom okozásával, illetőleg legkisebb élettani, idegi vagy viselkedésszerű károsodás mellett végezhető el.

(2) Az állatkísérletről és az állatot ért beavatkozásról részletes jegyzőkönyvet kell felvenni.

(3) Minden kísérletet úgy kell megtervezni, hogy elkerülhető legyen a szükségtelen fájdalom, szenvedés, tartós nélkülözés, ill. maradandó károsodás okozása.

6. § (1) Állatkísérlet csak az illetékes állomás által kiadott engedély alapján végezhető. A Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (a továbbiakban: MÁB) által jóváhagyott állatkísérlet engedélyezése iránti kérelmet a 2. számú melléklet szerint kell benyújtani az állomáshoz. Az állatkísérlet engedélyezése iránti kérelem elbírálása során az állomás az Állatvédelmi Tanácsadó Testület Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanácsának (a továbbiakban: Etikai Tanács) véleményét kikéri. Az engedély – a rendeletben meghatározott kivételekkel – a kiadásától számított legfeljebb öt évig érvényes.

IRODALOM

- [1] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/d/d7/Henrietta_Lacks_%281920-1951%29.jpg
- [2] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4c/HeLa_Hoechst_33258.jpg
- [3] TAKAHASHI, K., YAMANAKA, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663–676, 2006.
- [4] http://www.medica.co.nz/media/catalog/product/cache/2/image/265x265/5e06319eda06f020e43594a9c230972d/f/i/file_55_26
- [5] www.atcc.org
- [6] <http://www.enasco.com/prod/images/products/50/AC104062l.jpg>
- [7] http://i00.i.aliimg.com/img/pb/383/602/312/3126023-83_941.jpg
- [8] <http://www.hellopro.fr/images/produit-2/0/2/3/grattoir-cell-scraper-longueur-manche-180-mm-430320.jpg>
- [9] [http://www.millipore.com/images/xl/MB4163-06\[681-ALL\].jpg](http://www.millipore.com/images/xl/MB4163-06[681-ALL].jpg)
- [10] http://www.usascientific.com/productimages/14209-100_300.jpg
- [11] <http://www.cellcryogenics.com/>
- [12] http://www.ccos.ch/userfiles/CMS/189187_lagerung_staemme_in_fluessigem_stickstoff.jpg.jpg
- [13] <http://image.wistatutor.com/content/plant-growth-movements/growth-curve.jpeg>
- [14] http://mousely.com/wiki_image/c/c4/Cell_cycle.png
- [15] <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/imagecache/preview/image005.jpg>
- [16] http://www.biotech.uiuc.edu/images/Annexin_IMG-%202.jpg
- [17] http://www.retrogen.com/images/siRNA_diagram1.jpg
- [18] http://www.criver.com/SiteCollectionImages/Images_255x164/rm_rat_obese_black_hood1_0027_lres.jpg
- [19] <http://www.biolreprod.org/content/78/3/425/F3.large.jpg>
- [20] 1998. évi XXVIII. Törvény az állatok védelméről és kíméletéről
- [21] PAUL, J.: Cell and tissue culture. 3rd Ed. E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh–London, 1965.
- [22] PARKER, R. C.: Methods of Tissue Culture. 3rd Ed., P. Hoeber, New York, 1961.
- [23] http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture
- [24] <http://userpages.umbc.edu/~jwolf/method5.htm>

