

Biotechnologické využití rostlinné a živočišné buňky

579
663

RNDr. VLADIMÍR JIRKŮ, CSc., Prof. Ing. GABRIELA BASAŘOVÁ, DrSc., Vysoká škola chemickotechnologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha

Klíčová slova: biotechnologie, explantátová kultura, kalus, suspenzní kultura, buněčná proliferace, monokloniová izolace, rostlinné hormony, dedifetenciace, balancovaný růst, imunodiagnostické, imunoterapeutické, metazoa, statická kultivace, buněčná linie, růstový cyklus, diploidní, pseudodiploidní, heteroploidní linie, kontaktní inhibice

ROSTLINNÁ BUŇKA

Podstatou biotechnologického využití rostlinné buňky je nahrazení polní produkce významné rostliny kulturou rostlinných buněk, která byla od dané rostliny odvozena. Tento přístup přináší tyto výhody:

a) Produkce určité sloučeniny (sloučenin), pro kterou rostlinu pěstujeme, se touto cestou stává nezávislá na podnebí, výkyvech počasí, vlastnostech půdního fondu, biodeterioraci rostliny, ekonomických nákladech a dalších faktorech, které jsou významné zejména v případě, kdy je určitá rostlina pěstována jako zdroj farmaceuticky významné látky.

b) Kultura izolovaných rostlinných buněk představuje biologický materiál vysokého stupně homogenity, což je u nativní rostliny nemožné.

c) Kultura rostlinných buněk není kontaminována zbytky insekticidů, fungicidů nebo herbicidů a rostlinné buňky nejsou modifikovány interakcí s kontaminující mikroflorou.

d) Při nahrazení rostliny kulturou rostlinných buněk produkujících žádanou látku odpadá kultivace balastní neprodukcí biomasy. V této souvislosti je kultura rostlinných buněk základem bezodpadových technologií.

e) Kultura rostlinných buněk umožňuje kontinuální produkci žádané látky a mnohem ekonomičtější způsob její extrakce.

f) Kultura rostlinných buněk představuje v mnoha ohledech kulturu jednobuněčných organismů, což umožňuje mnohem snadnější řízení a modelování produkce žádané látky.

g) Rostlinná buňka jako jednobuněčný organismus umožňuje využití široké škály biosyntetických, biotransformačních a biodegradačních aktivit, které v mnohobuněčném společenství nativní rostliny nelze často ani identifikovat.

Kromě uvedených výhod, které nabízí srovnání kultury rostlinných buněk s nativní rostlinou, je možno uvést další směry zcela specifického využití izolované rostlinné buňky:

a) Fúze protoplastů rostlinné buňky umožňuje v oblasti vyšších rostlin aplikovat metody buněčného inženýrství.

b) Izolovaná rostlinná buňka umožňuje manipulace genového inženýrství.

c) Kultury rostlinných buněk umožňují rychlé vegetativní množení určitých rostlin.

d) Kultury pylových buněk umožňují rychlé získání haploidních rostlin a od nich odvozených „čistých“ linií pro šlechtitelské účely.

e) Cestou přípravy kultury rostlinných buněk je možné i získání ozdravených (např. bezvirových) rostlin.

f) Kultura rostlinných buněk umožňuje experimentovat na buněčné úrovni.

EXPLANTÁTOVÉ KULTURY VYŠŠÍCH ROSTLIN

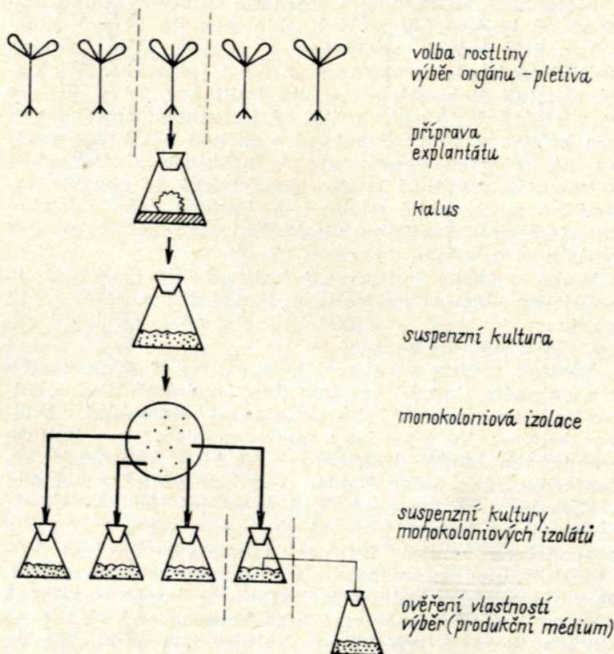
Příprava kultur rostlinné buňky byla na samém začátku motivována snahou dokázat, že neexistuje spodní hranice velikosti rostlinného těla, kdy by bylo možno tuto část neomezeně kultivovat. Vývoj této problematiky byl tedy zahájen hledáním optimálního fragmentu rostliny a způsoby jeho aseptické kultivace. Současný stav metodiky lze ilustrovat následujícími fázemi přípravy kultury aktivně rostoucí rostlinné buňky tzv. **explantátové kultury**:

1. Příprava je zahájena výběrem vhodné matečné rostliny, a to především na základě produkce žádaného metabolitu.

2. Z asepticky pěstované a povrchově sterilované rostliny je asepticky získán fragment některého orgánu — **explantát**, který je asepticky přenesen na sterilní agarové médium. Několikatýdenní kultivací tohoto fragmentu je získán **primární kalus** jako amorfni aglomerace rostlinných buněk schopných dalšího rozmnožování.

3. Získaný kalus je po odstranění zbytku výchozího fragmentu (explantátu) a aseptickém přenesení na vhodné, čerstvé médium schopné neomezené **buněčné proliferace**. První kultivační fáze jsou často přerušeny vznikem **morfologických** a **morfogenetických** změn buněk vznikajících buněčných souborů. Teprve větším počtem pasáží a při dodržení konstantních kultivačních podmínek (složení kultivačního prostředí, teplota, osvětlení popř. fotoperioda, pravidelnost pasážování a další) je získána buněčná aglomerace jako stabilní a homogenní kultura. Tato kultura mohla ovšem během své přípravy získat nové fenotypové znaky, které jsou v daných kultivačních podmínkách stabilní. Jinými slovy, celkový fenotyp získané kultury je podmíněn původním genotypem explantátu a kultivačními podmínkami.

4. Po dosažení popsaného stavu aglomerace rostlinných buněk, uchovávaných na pevném médiu, může být tato kultura převedena v **suspenzní** kulturu jednotlivých buněk. Tuto kulturu získáme buď enzymovým (účinkem pektinas) nebo mechanickým rozvolněním buněčné aglomerace. Suspenzní kultury jsou udržovány v tekutém médiu za kultivačních podmínek, které podmiňují stabilní stupeň disociace buněk. Ideální je kultivace v malých objemech na **rollerech** nebo **třepačkách**. Suspenzní kultura je základem **monokloniové izolace** rostlinné buňky (**klonování**) a velkoobjemových kultivací. Buněčné populace těchto kultur jsou výchozím biologickým materiálem pro manipulace buněčného a genového inženýrství. Jednotlivé fáze jejich přípravy shrnuje **obr. 1**.



Obr. 1. Schéma přípravy produkční explantátové kultury

PODMÍNKY A ZPŮSOBY KULTIVACE ROSTLINNÝCH BUNĚK

Volba podmínek a uspořádání kultivace je podřízena požadavkům, které jsou na kulturu rostlinných buněk kladeny z hlediska jejího použití jako experimentálního nebo biologického materiálu, na jehož základě je budována určitá technologie. V této souvislosti lze obecnou charakteristiku „ideální“ suspenzní kultury rostlinných buněk charakterizovat následujícími vlastnostmi:

- stabilita genotypu, stálá koncentrace DNA,
- zachování žádaných fyziologických a biochemických vlastností pletiva, popř. orgánu, z kterého byla kultura odvozena,
- vyhovující intenzita růstu na definované syntetické půdě,
- homogenita tvaru, velikosti a nutného stupně diferenciaci buněk,
- jednobuněčný stav, tedy výskyt minimálního počtu buněčných agregátů v suspenzní kultuře; snadno rozpadavé buněčné agregáty.

Syntetické kultivační médium je obvykle konstruováno jako směs anorganických solí v makrokoncentracích a mikrokoncentracích a zdroje uhlíku a železa. V počátečních stadiích odvozování těchto kultur je často nutná i přítomnost komplexu aminokyselin a některých vitamínů.

Specifickou složkou těchto kultivačních prostředí jsou **chemické regulátory** růstu a reprodukce rostlinné buňky. Tyto komponenty jsou souhrnně označovány jako **růstové látky, rostlinné hormony** nebo **nativní regulátory**. Kritériem jejich rozlišení může být funkce — **stimulátory, inhibitory**, nebo chemická povaha — auxiny, gibbereliny, cytokininy, ethylen a další.

Přítomnost těchto látek a jejich kombinace je hlavním faktorem určujícím základní charakteristiky kultury, intenzitu růstu, **dediferenciaci** a **rediferenciaci**. Vzhledem k ceně těchto látek je aktuální příprava takových klonů rostlinných buněk, které optimálně rostou bez potřeby exogenních hormonů.

Vzhledem k tomu, že většina kultur se pěstuje ve tmě, popř. ve slabém difuzním světle, je přítomný zdroj uhlíku kompenzací snížené fotosyntetické kapacity (bly však odvozeny i fotosyntetizující kultury). Jako zdroj uhlíku se nejčastěji používá **sacharosa, glukosa** nebo **fruktosa**, mohou být však použity i některé alkoholy a kyseliny, popř. průmyslové odpady (syrovátka anod.).

Biotechnologické využití rostlinné buňky vyžaduje přechod od kultivací v malých objemech do větších objemů, což je jednak spojeno s modelováním levných kultivačních půd a použitím zařízení (bioreaktorů), které zajišťuje dokonale srovnatelnou kultivaci. Tato zařízení se v základních rysech neliší od fermentací používaných pro kultivaci mikroorganismů a mohou být konstruována na principu chemostatu i turbidostatu. Vzhledem k tomu, že rostlinné buňky jsou křehké, je obvykle vyloučeno mechanické míchání a kultury jsou míchány proudem procházejícího sterilního vzduchu. Kultivační teplota se pohybuje v rozmezí 25–30 °C.

Volba způsobu kultivace i kultivačního prostředí je podřízena vlastnostem kultury, stupni diferenciaci a cíli kultivace (tj. buď produkci biomasy nebo produkci extracelulárního metabolitu).

Růstový cyklus suspenzní kultury rostlinných buněk v uzavřeném (batch) systému lze (podobně jako u kultury mikroorganismů) charakterizovat **sigmoïdní** růstovou křivkou. Ve srovnání s mikroorganismy je v kultuře rostlinných buněk dosaženo pouze 10–15 násobné zvýšení celkového počtu buněk, což odpovídá reprodukci v rozsahu 3–4 generací. Exponenciální růst je omezen na relativně krátký interval růstového cyklu a obvykle přechází ve fázi, kdy přírůstek biomasy je lineární. Studie změn hladin buněčných komponentů také naznačují, že v suspenzních kulturách rostlinných buněk nastává situace, kterou označujeme jako **balancovaný růst**, tedy situace, která je typická pro kultury mikroorganismů a při takové jsou relativní koncentrace všech buněčných komponentů (metabolitů, hlavních biopolymerů, struktury) konstantní. V populaci rostlinných buněk v podmín-

kách „batch“ kultury je tedy možno předpokládat určitou kontinuální změnu fyziologie a biochemie buňky, která má u jednotlivých buněk individuální charakter. Ve srovnání s „batch“ kulturami mikroorganismů je pravděpodobně odlišný i profil spotřeby základních živin (např. 90% spotřeba celkové koncentrace zdroje fosforu v čase, který odpovídá reprodukci první generace). Je zřejmé, že tyto specifické rysy suspenzních kultur buněk některých rostlinných druhů do značné míry komplikují poznání kinetických vztahů mezi procesy růstu, metabolismu a buněčného dělení. Tyto poznatky jsou důležité především u průmyslových produkcí farmaceutických významných metabolitů. Z uvedených důvodů je pro biotechnologické využití rostlinné buňky perspektivní vývoj kontinuálních kultivací a použití synchronizovaných kultur.

BIOTECHNOLOGICKÉ VYUŽITÍ SUSPENZNÍCH KULTUR ROSTLINNÝCH BUNĚK

Cílem vývoje technologií, které jsou založeny na použití suspenzní kultury rostlinné buňky, je především zajištění potřebných množství farmaceutických surovin na průmyslovém základě. Možnost pěstovat a průmyslově využívat rostlinné buňky podobně jako mikroorganismy, odstraňuje především problémy, které jsou dnes spojeny se zajišťováním přírodních surovin (omezování rostlinných zdrojů, narušování životního prostředí, omezení klimatickými pásmy atd.). Kultura rostlinných buněk teoreticky nabízí i mnohem širší využití biosyntetického, biotransformačního a pravděpodobně i biodegradčního potenciálu rostliny.

Historické kořeny vývoje této problematiky můžeme nalézt již v roce 1945, kdy byla realizována první **tkáňová** kultura odvozená z léčivé rostliny. Schopnost syntetizovat sekundární metabolity **in vitro** byla prokázána zanedlouho potom. Patent, který byl přihlášen americkou firmou uvádí 10 rostlinných druhů, jejichž biosyntetický potenciál by bylo možno průmyslově využít v podobě kultur orgánů a pletiv jednotlivých rostlin. První poznatky o přípravě a vlastnostech suspenzních kultur rostlinných buněk byly však k dispozici až v 60. letech.

V současné době jsou k dispozici informace o přípravě suspenzních kultur buněk několika desítek rostlinných druhů. Tyto kultury jsou popsány z hlediska produkce **alkaloidů, antibiotik, enzymů** i **peptidů** a řady chemicky vzdálených látek s biologickou aktivitou. Velmi významná je produkce **alergenů** a **inhibitorů rostlinných virů**.

O většině těchto látek lze říci, že mohou být zároveň substrátem biotransformačního procesu, který je katalyzován enzymovým systémem buňky. Biotransformační potenciál rostlinné buňky lze průmyslově použít nejen pro cílené modifikace jejich produktů, ale i pro chemické modifikace látek připravených organickou syntézou.

Z uvedeného je zřejmé, že velmi důležitým faktorem vývoje **průmyslových klonů** rostlinných buněk je metodika jejich „**screeningu**“ — tj. rychlé a reprodukovatelné detekce žádané vlastnosti získané kultury. S přípravou kultury přirozeně souvisí i poznání její **funkční stability**. Jiným problémem je udržení sterility kultur při dlouhodobých kultivacích. Zcela individuální jsou i ekonomická kritéria. Z těchto i dalších důvodů jsou prognózy úspěšnosti technologií na bázi rostlinných buněk velmi složité a zcela individuální.

ZIVOČIŠNÁ BUNKA

Pěstování jednotlivých buněk živočišného mnohobuněčného organismu **in vitro** byla ve svých počátcích (začátek století) pouze experimentálním přístupem, který byl významným mezníkem ve vývoji studia tohoto buněčného typu. První průmyslové využití **tkáňových** kultur živočišných buněk přineslo až zjištění, že virus **poliomylitidy** (původce dětské obrny) může být pěstován v tkáňových kulturách živočišných (včetně kldových) buněk, což byl základ výroby příslušné vakcíny v padesátých letech. Intenzivní vývoj kultivačních technik, akumulace základních poznatků z oblasti biologie živočišné buňky i možnost aplikovat moderní techniky bu-

něčného a genového inženýrství u tohoto biologického materiálu podmínily, že v 70. letech došlo k vývoji zcela nové kategorie biotechnologií, které otevřely značné možnosti především v oblasti výrob preparátů **imunoterapeutických, imunodiagnostických a imunopreventivních**. Živočišná buňka se zároveň stává zdrojem genové informace, kterou může být (cestou manipulací genového inženýrství) transformována buňka vhodného mikroorganismu, což je základem ekonomicky výhodných výrob dalších farmaceuticky významných produktů živočišné buňky.

Základní charakteristiky živočišné buňky in vitro

Oddělený vývoj organismů obsahujících difuzní (nediferencované) jádro a organismů s morfologicky diferencovaným jádrem pokračoval v případě eukaryot dvěma liniemi: *autotrofní buňky* byly předchůdci mnohobuněčných rostlin — *Metaphyta*, *heterotrofní buňky* daly vznik živočichům — *Metazoa* (živočišné buňky proto sumárně označujeme jako *buňky Metazoi*).

Zatímco si mikrobiální buňky v obecném smyslu udržely svoji individualitu, je pro buňky s pravým jádrem charakteristické sdružování ve větší celky. Ty měly lepší naději na přežití v nepříznivých podmínkách, do nichž po sobě jdoucí generace reprodukovaly, a proto se mohly zprvu primitivní shluky buněk postupně vyvinout až k dnešním složitým tvarům mnohobuněčných organismů. Složitost tělesné organizace *Metazoi* a vytvoření funkčně vázaných souborů specializovaných buněk byly spojeny s uplatněním nových stále komplexnějších regulačních mechanismů. Z těchto důvodů (na rozdíl od mikroorganismů) jsou také buňky *Metazoi* v kultuře podřízeny primárně *intercelulární* regulaci růstu i biochemické diferenciace. Z těchto důvodů je komplikované uplatnění poznatků a experimentálních zkušeností z oblasti mikrobiálních kultur při řízení aktivity buněk *Metazoi*.

Hlavním nedostatkem těchto buněčných kultur je ztráta *organové specifity*, k níž může dojít při dlouhodobé kultivaci *in vitro*. Ztráta organově specifických funkcí je způsobena *selekcí* buněk a *modulací* jejich fenotypu, které jsou často indukované již vlastní přípravou buněčné kultury. K prvé selekci dochází při *mechanickém* nebo *enzymovém rozvolňování* tkáně. I při pečlivém provedení dochází ke značnému úhynu buněk: při mechanickém uvolňování zbývá 5–30 % buněk schopných autoreprodukce, při použití *kolagenasy* 10–15 % a při použití *trypsinu* pouze 1–2 % z přibližného celkového počtu buněk, které tvořily použitou tkáň. Tento stav je dáte modifikován tím, že ve vyvíjející se kultuře může převládnout vitálnější buněčný typ, který byl v *donorovém* organismu pod negativní kontrolou a jehož populace v kultuře převládne. Třetím činitelem může být i druh zvoleného kultivačního prostředí, které selektivně stimuluje růst a reprodukci některých buněčných typů. Optimální kultivační prostředí by mělo zajistit ty vlivy, které v rámci mnohobuněčného organismu působí jako *intercelulární* a které zajišťují žádanou buněčnou aktivitu i v podmínkách kultivace *in vitro*.

Jiným významným faktorem je poměr objemu kultivovaných buněk a objemu média. Ve srovnání s mnohobuněčným organismem je v kultuře poměr objemu mimobuněčné a buněčné tekutiny mnohem vyšší. Z tohoto důvodu je v mimobuněčném prostředí výrazně nižší i hladina látek, které jsou buňkami produkovány a které fungují v intercelulární regulaci.

Nutriční požadavky živočišné buňky jsou obvykle mnohem komplexnější než požadavky eukaryotní buňky mikrobiální. Nejvýznamnějším energetickým zdrojem jsou přirozeně sacharidy (glukosa, manosa, fruktosa, galaktosa). Pro růst buněk *in vitro* je nezbytná jak *glykolýza*, tak i *oxidativní metabolismus glukosy*. Komplex minerálních solí je obvykle pečlivě volen a zajišťuje osmotickou stabilizaci a pufraci schopnost média. Pro buňky kultivované *in vitro* je esenciální komplex aminokyselin, jejichž primární funkcí je přímá inkorporace do buněčných proteinů. Základní složkou médií jsou obvykle i komplexy *vitaminů* a *purinové a pyrimidinové báze*. Nejvýznamnějším stopovým prvkem je železo.

Specifickou složkou kultivačních médií jsou bílkoviny. Jako součást prostředí se nejčastěji užívá krevní sérum

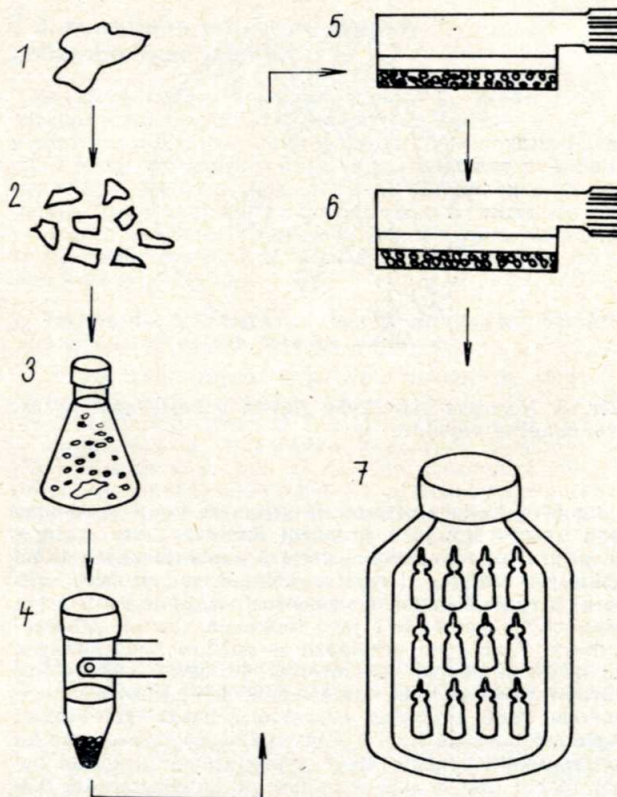
nebo jeho vysokomolekulární frakce, i když bílkoviny z jiných zdrojů mohou mít rovněž *růstově stimulační* účinky. V této souvislosti byly izolovány *růstově stimulační proteiny (růstové faktory)*, které specificky stimulují růst některých typů buněk.

Kultivace jsou obvykle prováděny při pH 7,2 a teplotě 37 °C.

Úspěšná práce s kulturami živočišných buněk je podmíněna nejen správnou volbou typu média a dodržením technologie jeho přípravy, ale i důsledným sledováním kvality všech užitých materiálů. Nejobtížnější je sledování kvality séra. Nejčastěji se používá opakované pasážování několika buněčných typů v médiu s prověřovanou šarží a průběh růstu se srovnává se standardem. Příprava buněčné kultury *Metazoi* shrnuje *obr. 2*.

Typy kultur

Buněčné kultury *Metazoi* lze klasifikovat podle způsobu kultivace (popř. růstového potenciálu) a chromozomálního složení buněk. Při *statické* kultivaci (*obr. 2*) se



Obr. 2. Příprava buněčné kultury *Metazoi* a její statická kultivace

Izolovaná tkáň (1) je fragmentována (2) a získané fragmenty jsou mechanicky nebo enzymově rozvolněny na jednotlivé buňky (3); buňky jsou separovány centrifugací (4) a touto populací je inokulováno kultivační prostředí statické kultivace (5); statická kultura může být pasážována (6) a získaná buněčná populace skladována v kapalném dusíku (7).

buňky pěstují na pevném podkladu (skle, plastických hmotách), který je někdy upravován použitím perforovaného celofánu, mřížkou z plastické hmoty apod. k docílení trojrozměrného růstu. *Fyzický kontakt* buňky s pevným povrchem je u řady buněčných typů základní podmínkou normálního růstu a reprodukce. Pro tyto případy jsou komerčně vyráběny sférické **mikronosiče** (*obr. 3*), jejichž povrchové úpravy umožňují optimální fixaci buněk. Vhodné optické vlastnosti těchto materiálů usnadňují průběžné sledování buněčného růstu světelnou mikroskopií. Použití těchto nosičů umožňuje splnit požadavek fyzického kontaktu buňky a pevného podkladu (který ji

nak zajišťuje statická kultivace] v podmínkách kultivace v tekutém míchaném médiu, tedy v podmínkách **suspenzní** kultury, která jinak vyhovuje pouze těm buněčným typům, jejichž růst a reprodukce není podmíněna fyzickým kontaktem buňky s pevným materiálem. Fixace buněk na povrchu mikronosiče je v současné době základem velkoobjemových kultivací v souvislosti s produkcí protilátek, interferonů, hormonů, enzymů a dalších terapeuticky významných bioproduktů živočišné buňky. Fragilita živočišné buňky je způsobena tím, že buněčný povrch není kryt buněčnou stěnou, ale pouze biologickou membránou, která zprostředkovává komunikaci vnitrobuněčného a mimobuněčného prostředí, ale nedostatečně kompenzuje osmotické a mechanické vlivy. Tato fragilita vyžaduje takovou formu mechanického míchání tekutých médií, která nevyvolává mechanickou destrukci buněk nebo jejich uvolňování z povrchu mikronosiče (obr. 3). Z tohoto důvodu je výhodné použití *perforovaných reaktorů*, které mechanické destrukce eliminují, ale zároveň zajišťují optimální provzdušňování a výměnu média v mikroprostředí buňky, a to i při vysokých buněčných denzitách.



Obr. 3. Ilustrace sférického nosiče s částečným nárůstem buněčné populace

Buněčné kultury připravené přímo ze tkání organismu jsou označovány jako **primární kultura**. Tyto kultury se připravují rozvolněním čerstvě **explantovaných** tkání některými enzymy (trypsin, kolagenasa, pronasa, papain) a vzniklá buněčná suspenze (obr. 2) je použita (za aseptických podmínek) jako inokulum vlastní primární kultury. V určitých případech se používá i mechanického uvolnění buněk. Pasažováním primární kultury lze odvodit **buněčné linie**, které mohou být pěstovány dlouhodobě. Podle finálního charakteru buněk lze rozlišit **diploidní** buněčné linie a kontinuálně pěstované stabilní **heteroploidní** buněčné linie (chromozomální složení buněk těchto linií je značně odlišné od buněk původní tkáně). Tyto buněčné linie mají tzv. **nelimitovaný** buněčný potenciál a jsou označovány jako „nesmrtelné“ (dnes jsou k dispozici stovky těchto buněčných linií odvozených od živočišných buněk různých typů). Na rozdíl od nich mají linie buněk s diploidním počtem chromozómů **limitovaný** růstový potenciál. Tyto buňky mají zprvu vysokou růstovou rychlost; po období aktivní replikace, jehož délka kolísá podle druhu živočicha, z něhož byla tkáň izolována, vstupují buňky do fáze sníženého růstu a po určitém období přežívání hynou. Pro diploidní linie byl navržen rovněž název **homonukleární**, neboť variace v chromozomálním složení mezi buňkami klonů téže linie jsou minimální. Alterace v chromozomálním složení heteroploidních linií se týká počtu a morfologie chromozómů.

RŮSTOVÝ CYKLUS KULTURY BUNĚK METAZOÍ

V suspenzních kulturách, ve kterých lze pěstovat jen buňky s nelimitovaným růstovým potenciálem, je průběh růstu analogický růstu mikroorganismů v tekutém prostředí. Kultury jsou obvykle charakterizovány **délkou lag fáze**, **generační dobou** a **maximální populační den-**

zitou. Za standardních vnějších podmínek jsou tyto parametry konstantní vlastností buněčné linie. Maximální populační denzita, kterou buňky dosahují ve stacionární fázi, je označována jako **denzita saturační**.

Rozlišení základních růstových fází (lag, exponenciální a stacionární) i uvedené parametry jsou používány i při hodnocení **statických** kultur. Podle dosažené maximální populační denzity lze statické kultury **Metazoi** rozdělit na tři typy:

a) kultury **diploidních linií**, u nichž zástava růstu nastává při denzitách $5,0 \cdot 10^4$ až $1,0 \cdot 10^5$ buněk na 1 cm^2 plochy;

b) kultury **pseudodiploidních** a některých **heteroploidních** linií, jejichž reprodukce ustává při stejně nízkých populačních denzitách;

c) **kultury většiny stabilních** linií, které dosahují saturační denzity nejméně $3,0 \cdot 10^5$ buněk na cm^2 plochy. Statické kultury s limitovaným růstovým potenciálem jsou **jednovrstevné**. Kultury stabilních linií (nelimitovaný růstový potenciál) mohou být mnohovrstevné. Omezený růstu na jednovrstevné je podmíněno **kontaktní inhibicí**.

Generační doba heteroploidních linií je relativně krátká — 12 až 28 hodin. U ostatních typů trvá 24 hodin až několik dní. Délku generační doby lze ovlivnit regulací dodávky živin, hodnotou pH prostředí, teplotou a zejména druhem a množstvím séra, které je používáno jako součást kultivačního prostředí.

Tvorba buněčných makromolekul a její rozsah závisí na fázi růstového cyklu kultury. **Lag fáze** je charakterizována rychlou syntézou DNA, RNA a proteinů; v **exponenciální fázi** obvykle klesá množství nukleových kyselin bez přímého vztahu k rychlosti buněčného dělení. V lag fázi se může DNA nahromadit až do dvounásobného či trojnásobného množství vzhledem k jejímu obsahu v buňce v pozdějších stadiích.

Z uvedeného přehledu základních charakteristik živočišné buňky je zřejmé, že technologie založené na tomto biologickém materiálu vyžadují kromě odvození vhodné kultury citlivou optimalizaci kultivačních podmínek a to především ve vztahu ke kvalitativním a kvantitativním parametřům žádané buněčné aktivity.

Pro bližší orientaci v metodické oblasti i v současném stavu a perspektivách biotechnologického využití rostlinné a živočišné buňky lze čtenáři doporučit články a monografie [1—12].

Literatura

(Rostlinná buňka)

- [1] BERGMANN, L.: J. Gen. Physiol. **43**, 1960, s. 841.
- [2] BHOJWANI, S. S., RAZDAN, M. K.: Plant Tissue Culture: Theory and Practise. Elsevier, 1983.
- [3] DOUGALL, D. K.: The Biochemistry of Plants, Vol. 7, 1981, s. 21, Academic Press.
- [4] STREET, H. E.: Tissue Culture and Plant Science, 1974, Academic Press.
- [5] DEUS, B., ZENK, M. H.: Biotechnol. Bioeng. **24**, 1982, s. 1965.
- [6] TANAKA, H.: Biotechnol. Bioeng. **23**, 1981, s. 1203.
- [7] TABATA, M., OGINO, T., YOSHIOKA, K., YOSHIKAWA, N., HIRAOKA, N.: v: Frontiers of Plant Tissue Culture. Thorpe, T. A. (ed.), IAPTC, Calgary, 1978, s. 213.
- [8] ZENK, M. H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E. W., DEUS, B.: v: Plant Tissue Culture and its Biotechnological application. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M. H. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, 1977, s. 27.
- [9] KURZ, W. G. W., CONSTABEL, F.: v: Advances on Applied Microbiology, Vol. **25**, 1979, s. 209.

(Živočišná buňka)

- [10] MICHL, J.: Buněčné kultury, 1977, Academia, Praha.
- [11] FEDER, J., TOLBERT, W. R.: Scientific American **246**, 1983, s. 36.
- [12] PHAFF, H. J.: Scientific American, **245**, 1981, s. 77.

Jirků, V. - Basařová, G.: **Biotechnologické využití rostlinné a živočišné buňky**. Kvas. prům., **32**, 1986, č. 2, s. 37—41.

Tento přehledový článek je věnován významným otázkám, které tvoří základ průmyslového využití jednobuněčných kultur rostlinných buněk a kultur buněk živočišných. Současné požadavky a problémy jsou rovněž uvedeny.

Иирку, В., Басаржова, Г.: Биотехнологическое использование растительной и животной клеток. Квас. прум. 32, № 2, стр. 37—41.

Эта обзорная статья посвящена важным вопросам, составляющим основу промышленного использования одноклеточных культур растительных клеток и клеток животных. Приводятся также современные требования и проблемы.

Jirků, V. - Basařová, G.: Biotechnological employment of plant and animal cell. Kvas. prům., 32, 1986, No. 2, pp. 37—41.

This review article deals with significant topics which

are the basis of the industrial employment of single cell cultures of plant cells and cultures of animal cells. Current demands and problems are also covered here.

Jirků, V. - Basařová, G.: Biotechnologische Ausnutzung der Pflanzen- und Lebewesen-Zelle. Kvas. prům. 32, 1986, Nr. 2, S. 37—41.

Der Übersichtsartikel ist den bedeutenden Fragen gewidmet, die die Basis der industriellen Ausnutzung der Ein-Zellenkulturen der Pflanzenzellen und der Kulturen von Lebewesenzellen bilden. Es werden auch die gegenwärtigen Forderungen und Probleme angeführt.