

«Клеточная инженерия»

Курс лекций кафедры фундаментальной медицины и биологии ВолгГМУ для студентов медико-биологического факультета

Кость



Тема лекции:

«Специфика технологии ведения клеточных культур».



Преимущества и недостатки метода культуры ткани.

Категория	Преимущества	Недостатки
Физико-химические свойства окружения	Контроль pH, температуры, осмотического давления	Строго асептические условия
Физиологические свойства	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Контроль концентрации питательных и биологически активных веществ ✓ Строгое поддержание условий культивирования регуляция межклеточных взаимодействий (введение матриксов) 	Строгое поддержание условий культивирования
Биологические свойства	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Однородность клеточных линий ✓ Легкоосуществимая характеристика клеточных линий ✓ Криохранение ✓ Повторяемость и воспроизводимость результатов 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Нестабильность клеточных линий ✓ Поддержание клеток в состоянии дифференцировки ✓ Возможность контаминации другими клеточными линиями
Экономика процессов	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Сертификация и аккредитация любой клеточной линии ✓ Контроль концентрации и времени ✓ Экономия реагентов ✓ Механизация процесса 	Высокая стоимость реагентов

Типы культуры ткани.

- 1) **Органная культура** подразумевает, что в культуре сохранены, по крайней мере частично, структурно-функциональные характеристики ткани *in vivo*. Для этого кусочки ткани культивируются на границе раздела сред жидкость-газ (на плотике, решетке или гелевой подложке), которые предпочтительны для фиксации сферической или трехмерной структуры.
- 2) **Первично эксплантируемая культура** подразумевает, что фрагмент ткани (эксплантат) помещается на стекло (или пластик) в жидкую среду, где после прикрепления активизируется миграция клеток по поверхности плотного субстрата.
- 3) **Клеточная культура** предполагает, что фрагмент ткани или полученная из первичного эксплантата культура измельчается (механически или ферментативно) до клеточной суспензии, которая затем культивируется как адгезированный монослой на плотном субстрате или как суспензия в культуральной жидкой среде. В результате сохранения клеточных взаимодействий, изначально существовавших в ткани, которая была использована для культивирования, органные культуры сохраняют специфические свойства этой ткани.

Клеточная культура.

Из первичного эксплантата или диспергированной клеточной суспензии можно получить клеточные культуры.. Монослой или клеточная суспензия со значительной фракцией растущих клеток может быть отделен путем ферментативного воздействия или простым разведением и пересевом (субкультивированием) во флакон со свежей питательной средой. Эта процедура называется **пассажем**, а дочерняя культура, сформированная таким образом, представляет собой начало **клеточной линии**.

Формирование клеточной линии из первичной культуры подразумевает:

- 1) увеличение общего количества клеток после нескольких генераций;
- 2) конечное преобладание клеток или линий дифференцировки, обладающих способностью к высокому темпу роста;
- 3) высокую степень однородности клеточной популяции.

Предел Хейфлика.

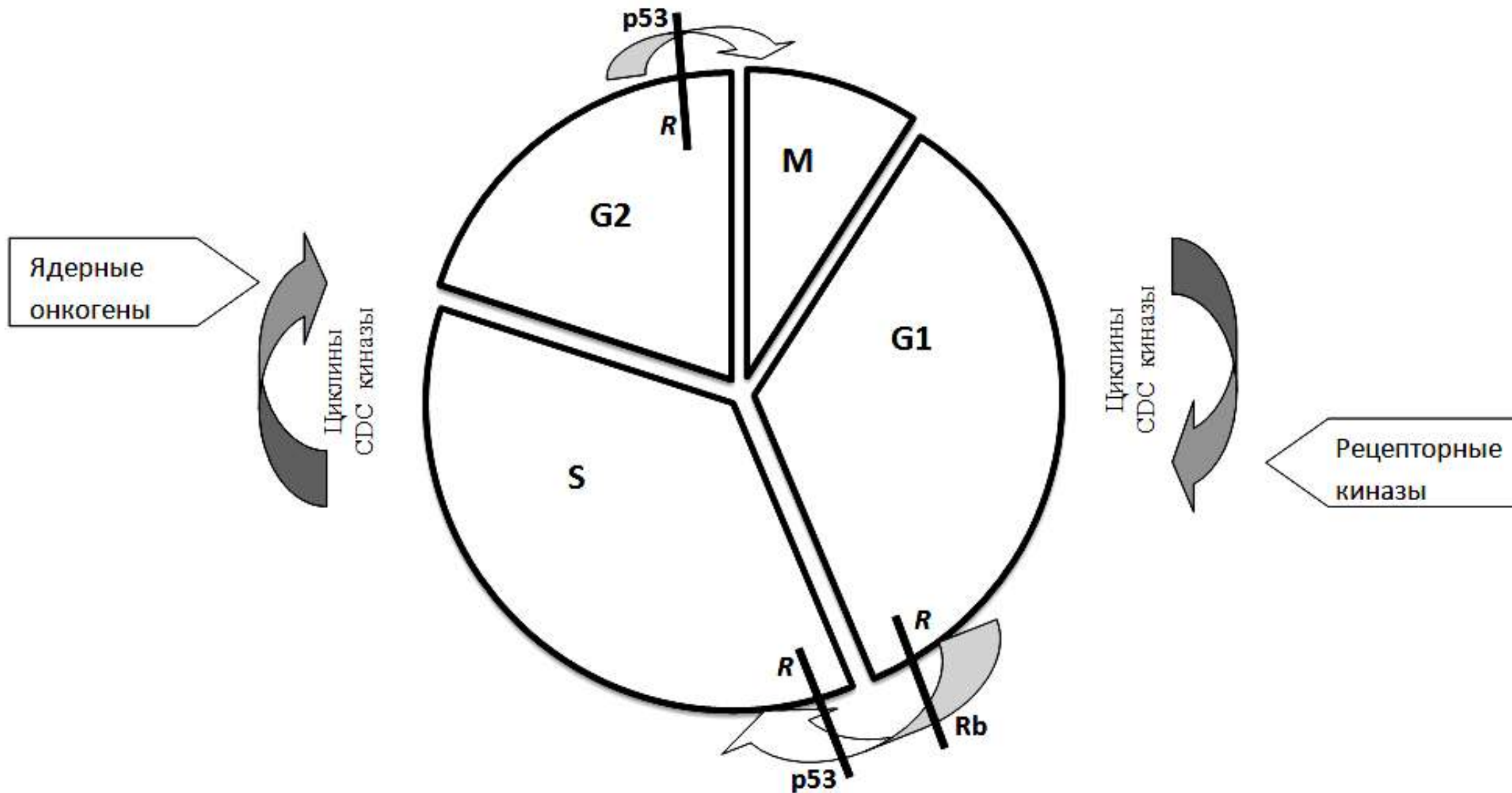
- Предел Хейфлика связан с сокращением теломерных участков ДНК на концах хромосом. Если клетка не имеет активной теломеразы, как преимущественное большинство соматических клеток, при каждом делении клетки теломеры сокращаются, потому что ДНК-полимераза неспособна реплицировать концы молекулы ДНК.
- Когда после определенного числа делений теломеры исчезают совсем, клетка обычно останавливается в определенной стадии клеточного цикла или запускает программу апоптоза.
- На ранних стадиях клетки сохраняют правильный диплоидный набор хромосом, но уже на более поздних этапах большинство клеток становится анеуплоидами. В редких случаях такие анеуплоидные клетки выживают, начинают размножаться и превращаются в клеточный штамм.
- Клеточные штаммы обладают специфическими свойствами, которые сохраняются в течение длительного культивирования. Многие стабильные клеточные штаммы способны к неопределённо длительному росту и размножению в культуре, причём это связано с анеуплоидным кариотипом.

Клеточный цикл.

Клеточный цикл — это период существования клетки от момента её образования путём деления материнской клетки до собственного деления или гибели.

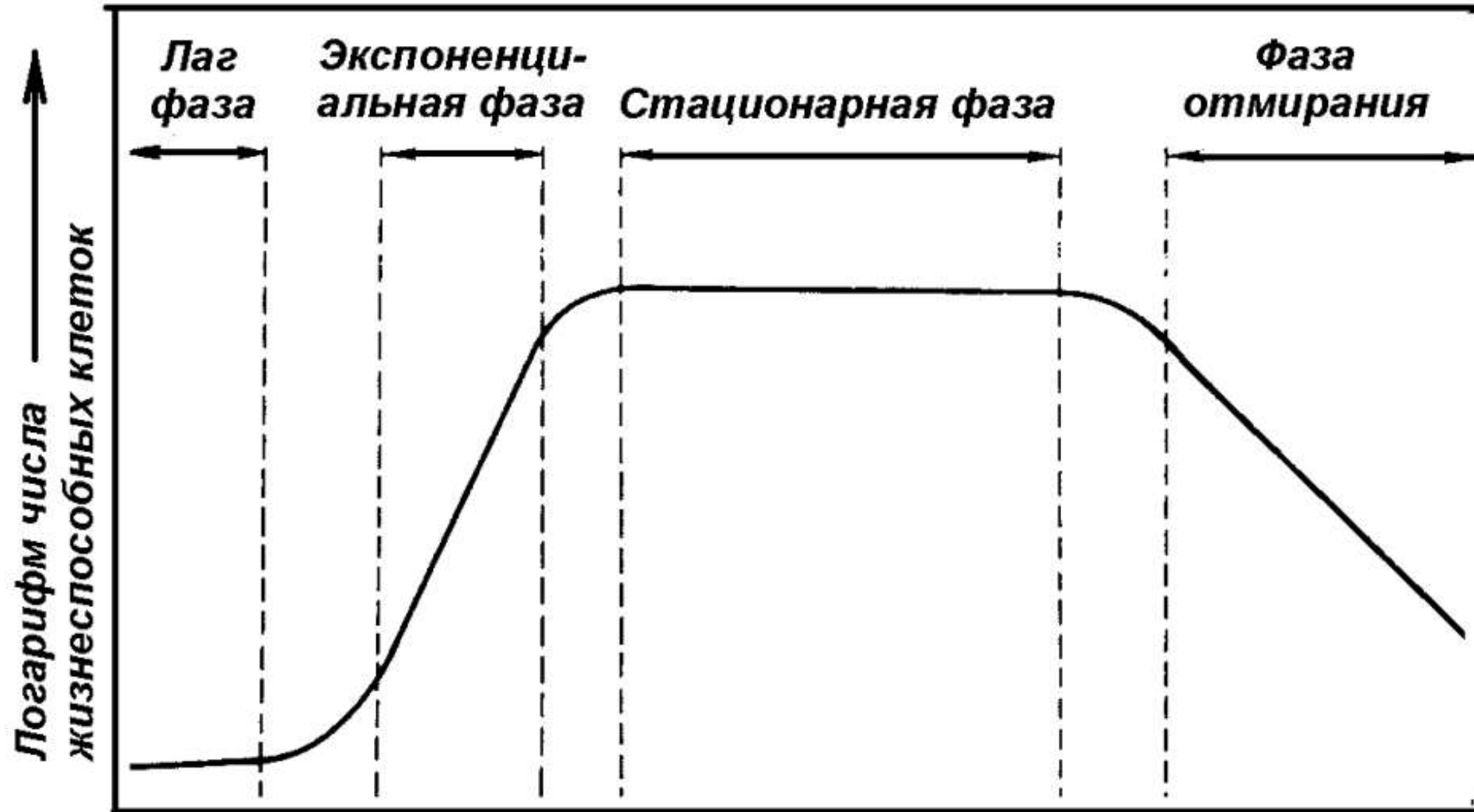
1. М-фаза (Mitosis) - хроматин конденсируется и образуются хромосомы; две отдельные хроматиды, составляющие хромосому разделяются для того, чтобы перейти в дочерние клетки.
2. G1-фаза (Gap1) - происходит либо подготовка к синтезу ДНК и следующему циклу клеточного деления, либо обратимый выход клетки из клеточного цикла (выход в G₀-фазу). Возможен также необратимый переход в стадию дифференцировки. В ходе G1-фазы клетка частично способна контроли-ровать прохождение клеточного цикла в ряде точек рестрикции, которые определяют, войдет ли клетка в пролиферативный цикл, выйдет ли из него временно, либо покинет его, перейдя к дифференцировке.
3. S-фаза (Synthesis) - происходит репликация ДНК
4. G2-фаза (Gap2) - клетка готовится вновь перейти в стадию митоза.

Регуляция клеточного цикла.



Кривая клеточного роста.

Кривая, описывающая зависимость логарифма числа жизнеспособных клеток культуры от времени называется кривой роста.



Кривая клеточного роста. Фазы.

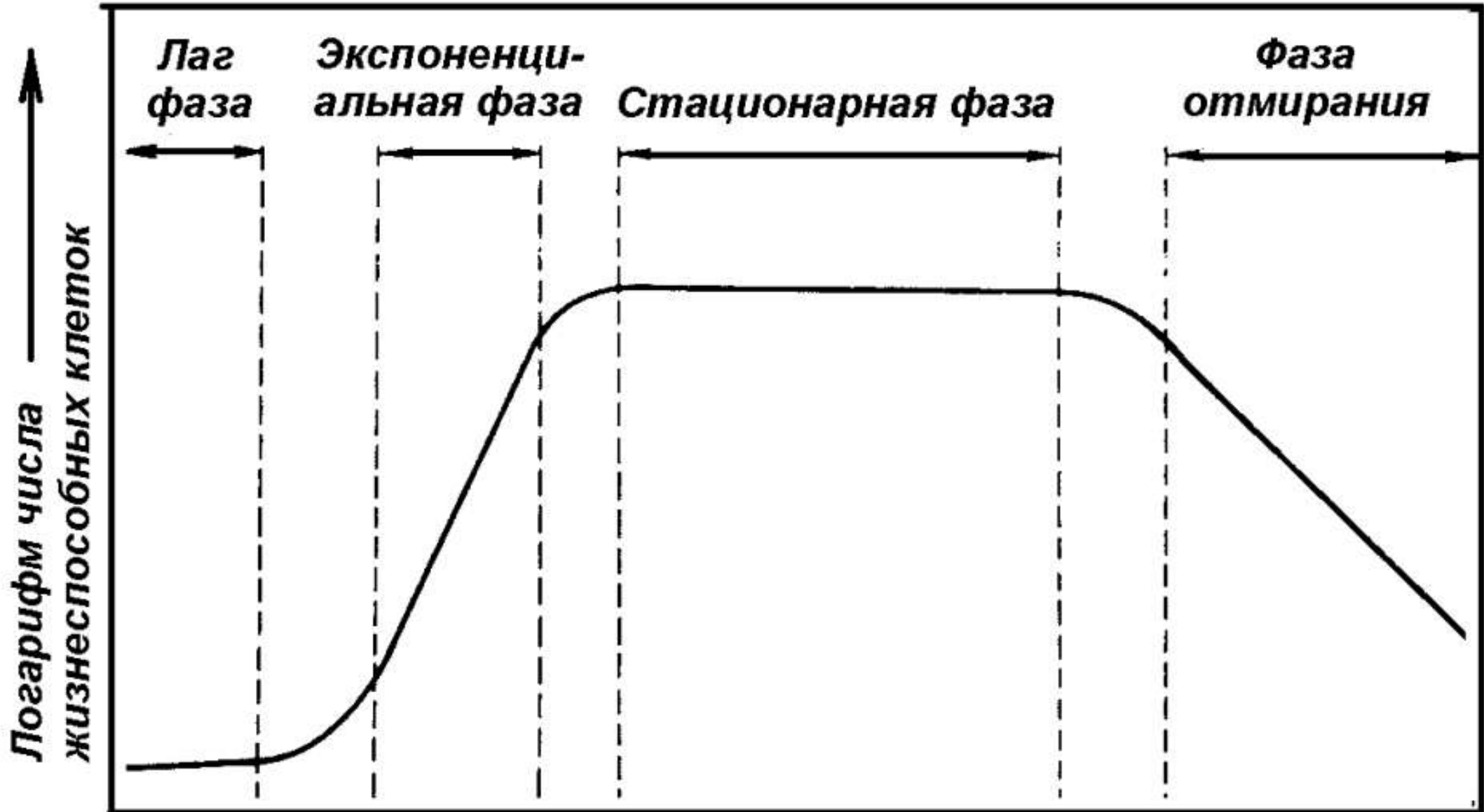
1. Lag-фаза - клетки не растут, их число и биомасса не изменяется. Клетки адаптируются к новым условиям, происходит изменение химического состава среды (кондиционирование) . Чем больше исходная плотность клеток, тем короче лаг-фаза.
2. Log-фаза - фаза экспоненциального роста. Значительное число клеток вовлекается в клеточные деления. Интенсивно используются ресурсы питательной среды. Клеточные культуры более единообразны, отбор образцов в конце log-фазы дает самый высокий выход клеток и воспроизводимость.

Кривая клеточного роста. Фазы.

3. Стационарная фаза - фаза плато. Популяция клеток, которые выходят на стадию плато, имеет значительно меньшую долю растущих клеток и разнообразную морфологию, клетки могут быть более дифференцированными или более поляризованными. Обычно они имеют тенденцию к секреции большего количества внеклеточного матрикса, и могут возникнуть сложности при дезагрегации. Число клеток и их биомасса меняется слабо, митотический индекс падает.
4. Фаза деградации - клетки начинают интенсивно гибнуть (наступает в случае отсутствия субкультивирования при достижении стационарной фазы)

Фазы лог и плато дают крайне важную информацию о клеточной линии, в том числе и время удвоения клеточной популяции (PDT) в ходе экспоненциального роста и максимуме клеточной плотности, достигаемой в фазе плато (т. е. плотности насыщения). Измерение PDT используется для количественной оценки ответа клеток на различные ингибиторы или стимуляторы культур, такие как различия концентрации питательных веществ, действие гормонов или токсических препаратов.

Кривая клеточного роста. Фазы.



Клеточная адгезия.

Молекулы межклеточной адгезии (ICAM, англ. intercellular adhesion molecule) - это связанные с плазматической мембраной белки, которые обеспечивают механическое взаимодействие клеток друг с другом. Часто это молекулы, которые пронизывают мембрану и присоединены к цитоскелету. С их помощью клетки при движении могут «подтягиваться» к другим клеткам или перемещаться по внеклеточному матриксу. Во многих случаях отдельная молекула межклеточной адгезии способна взаимодействовать не с одним, а с несколькими лигандами, для чего служат разные участки связывания.

Взаимодействие двух типов клеток может изменяться в результате увеличения числа молекул адгезии на клеточной поверхности либо при изменении их **аффинности** и/или **авидности**.

Клеточная адгезия.

Существуют два механизма увеличения числа молекул адгезии на поверхности клеток:



запасы адгезивных молекул хранятся во внутриклеточных везикулах, которые способны через несколько минут после активации устремляться к поверхности цитоплазматической мембраны;



синтез молекул адгезии и перенос их на поверхность.

Клеточная адгезия. Классификация.

Выделяют два класса молекул межклеточной адгезии:

1. Кальций-зависимые
2. Кальций-независимые

Все молекулы межклеточной адгезии можно разделить на четыре структурных семейства:

1. **Интегрины** - гетеродимерные молекулы, функционирующие как клеточно-субстратные, так и межклеточные адгезивные рецепторы;
2. **Адгезивные рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов**, которые участвуют в межклеточной адгезии;
3. **Селектины** - адгезивные молекулы, лектинподобный домен которых обеспечивает адгезию;
4. **Кадгерины** - кальцийзависимые гомофильные межклеточные адгезивные белки.

Контактное торможение.

При направленном движении по субстрату клетка может столкнуться с рядом факторов, по-разному влияющими на ее дальнейшее успешное продвижение. В результате такого столкновения клетка прекращает направленное движение. Это явление получило название **контактного торможения**

Впервые явление контактного торможения было описано Аберкромби и Хейсманом в 1954 году при столкновении куриных фибробластов в культуре. Авторы определили это явление как остановку перемещения в направлении, где осуществляются столкновения, или "запрещение" после осуществления межклеточного контакта дальнейшего продвижения одной клетки по поверхности другой. По Аберкромби эта реакция является непосредственным результатом межклеточного взаимодействия и включает в себя адгезию, паралич псевдоподиальной активности в зоне контактирования, сокращение и расхождение контактирующих клеток.

Трансформация.

Трансформация ассоциируется с генетической нестабильностью и тремя основными классами фенотипических изменений, один из которых может быть выражен в одном клеточном штамме:

- бессмертие, приобретение бесконечного срока жизни;
- аберрантный контроль клеточного роста, утрата клеточной подвижности в результате контактного ингибирования подвижности, утрата ограничения клеточной пролиферации при высокой клеточной плотности и утрата зависимости от прикрепления к субстрату;
- злокачественность, доказательством которой служит рост инвазивных опухолей *in vivo*.

Трансформация клеточных культур подразумевает все три этих процесса. Приобретение «бессмертия» само по себе называется *иммортализацией*, поскольку оно может быть достигнуто без значительных нарушений механизмов контроля роста и злокачественности, которые обычно взаимосвязаны.