

«Клеточная инженерия»

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

Кость



Натуральный киллер НК клетка



T лимфоцит

Нейтрофил



Базофил

Прогениторная клетка лимфоидного

Тема лекции:

«Биология клетки в культуре. Материалы для клеточных технологий и клеточной инженерии. Часть 2».



Костный матрикс

Стромальная клетка

Кровеносный сосуд

Остеобласт

Адиipoцит

Стромальная стволовая клетка

Кость (или хрящ)

Остеобласт

Пре-остеобласт

Клеточный покров

Остеобласт

Стволовые клетки скелетов мускулов

Стволовые клетки гепатоциты

Гемопозитическая поддерживающая строма



Гемопозитическая стволовая клетка

Адиноцит костного мозга



Культуральные среды.

Компоненты питательных сред.

Аминокислоты

Витамины.

Глюкоза

Антибиотики

Сыворотка

Соли

Культуральные среды.

Минимальная питательная среда Игла (MEM)

Содержит минеральные вещества, аминокислоты (13 незаменимых), 6 водорастворимых витаминов, холин и инозит, выполняющие роль углеводородного субстрата. MEM используется только с сывороткой, так как в ней отсутствуют биотин, витамин В12, ионы железа и микроэлементы. Основа раствор Эрла.

Среда Дульбекко (DMEM)

Является модификацией среды Игла. Содержит в четыре раза больше аминокислот и витаминов, а также различные добавки, улучшающие рост клеток. Изначально была с содержанием глюкозы 1г/л и применялась для эмбриональных клеток мыши. Затем появились модификации среды с высоким и пониженным содержанием глюкозы, пирувата натрия, различных добавок для культивирования клеток различных типов, в том числе нетрансформированных клеток и гибридом. Является основой для бессывороточных сред. При использовании этой среды необходим инкубатор с 10% концентрацией CO₂.

Культуральные среды.

Среда Искова (IMDM)

Модификация среда DMEM. Добавлены незаменимые аминокислоты, биотин, витамин B₁₂, селенит натрия. В среду введен NEPEs и нитрат калия, вместо нитрата железа, а также уменьшены концентрации NaCl и NaHCO₃. Среда бессывороточная, обычно используется для культивирования В-лимфоцитов, В-клеток, стимулированных полисахаридами, Т-лимфоцитов и гибридом.

Среда RPMI-1640

Разработана в *Roswell Park Memorial Institute* в 1966 году Муром и его коллегами для культивирования лейкоцитов. Среда содержит значительное количество фосфата и имеет состав для выращивания в атмосфере с содержанием углекислого газа 5 %, используется с сывороткой. Среда исходно предназначена для суспензионных культур, поэтому в ней отсутствует кальций. В настоящее время особенно широко используется для прикрепляющихся клеток различных типов. Важно отметить, что хоть RPMI 1640 используется для культивирования и мышинных, и человеческих клеток, однако, эта среда изотонична человеческой сыворотке, но гипотонична по отношению к мышинной и крысиной сыворотке. Поэтому, при получении клеточных суспензий от мышей и крыс для последующего культивирования клеток предпочтительнее использовать солевой раствор Хэнкса или другие подобные среды, изотоничные мышинной сыворотке, чтобы предотвратить лизис клеток.

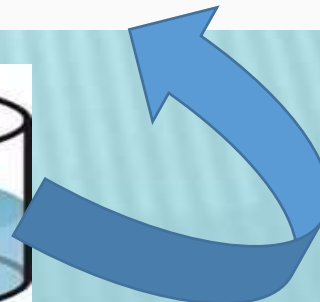
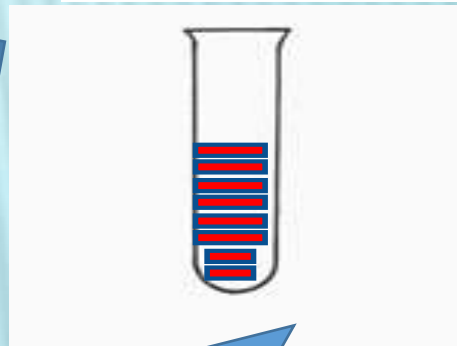
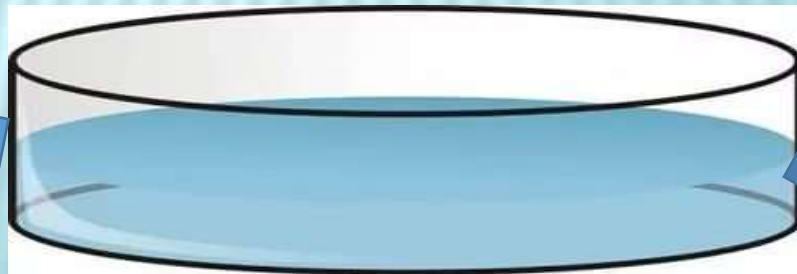
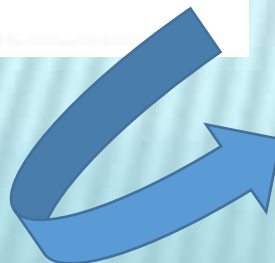
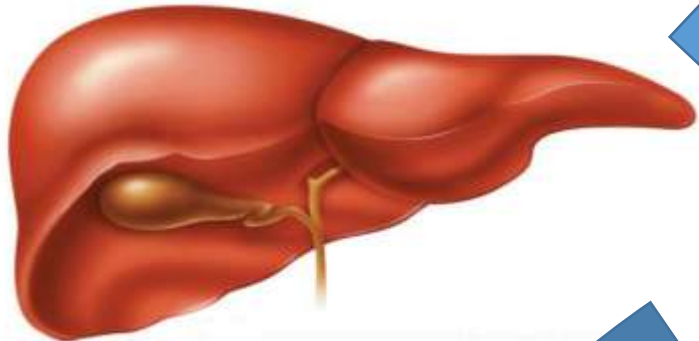
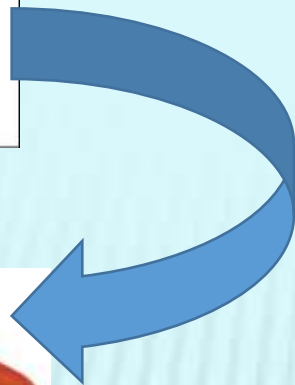
Первичная культура клеток.

Первичная культура — это культура, происходящая от клеток тканей или органов, взятых непосредственно из организма. Культура считается первичной до тех пор, пока ее не субкультивируют, после чего она становится клеточной линией.

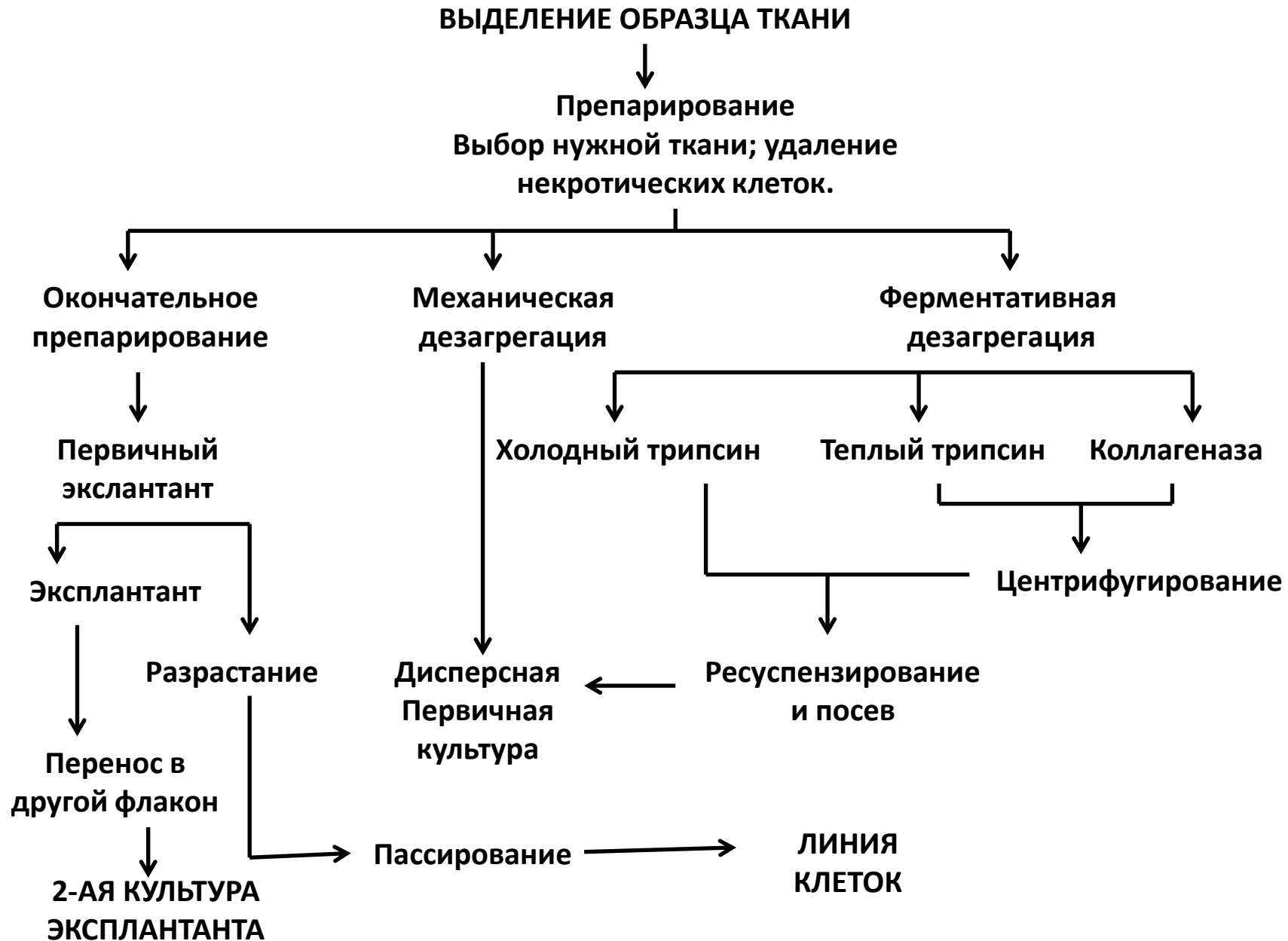
Появление постоянной линии клеток констатируется по

- ✓ Морфологическим изменениям (уменьшение размера клеток, снижение их адгезивности, округление, увеличение ядерно/цитоплазматического отношения)
- ✓ Увеличению скорости роста (время удвоения клеток в культуре снижается с 36 - 48 до 12 - 36 часов)
- ✓ Снижению зависимости от сыворотки,
- ✓ Увеличению эффективности клонирования
- ✓ Снижению зависимости от субстрата
- ✓ Увеличению гетероплоидности (хромосомные различия между клетками) и анеуплоидности и по увеличению опухолеродности.

Получение первичной культуры клеток.



Первичная культура клеток.



Преимущества и недостатки клеточных линий.

	Свойства	Конечные	Постоянные (трансформированные)
1	Плоидность	Эуплоидные, диплоидные	Анеуплоидные, гетероплоидные
2	Трансформация	Нормальные	Иммортализированные, изменены контроль роста и способность к опухолевому росту.
3	Контактное ингибирование	Да	Нет
4	Тип роста	Монослой	Монослой или суспензия
5	Ведение культуры и пересев	Циклическое	Возможно устойчивое состояние
6	Потребность в сыворотке	Высокое	Низкое
7	Маркеры	Специфические тканевые	Хромосомальные, ферментативные, антигенные
8	Скорость роста	Медленная (T_D 24-96 ч.)	Быстрая (T_D 12-24 ч.)
9	Клеточный выход	Низкий	Высокий

Порядок поддержания клеточной культуры.

Признаки означающие, что культура требует замены среды, либо неадекватности, токсичности среды или сыворотки, микробного заражения или старения клеточной линии:

- грануляция вокруг ядра,
- вакуолизация цитоплазмы,
- приобретение клетками округлой формы с отделением их от субстрата.

Факторы, определяющие необходимость замены культуральной среды:

Падение рН.

Следует принимать во внимание скорость падения и абсолютное значение величины рН. Большинство клеток перестают расти при падении рН от 7,0 до 6,5 а также начинают терять жизнеспособность между рН 6,5 и 6.0. Поэтому если цвет среды меняется от красного через оранжевый до желтого, то средуследует заменить. Необходимо оценивать скорость падения рН: если скорость падения рН в культуре, которая растет при рН 7,0, составляет 0,1 ед. рН в день, то задержка питания на одни-два дня по каким-то причинам не вызовет большого повреждения клеток. В то же время при скорости падения рН на 0.4 ед в день необходимо произвести замену среды в течение ближайших 24-48 ч, не оставляя культуру без питания на выходные дни.

Порядок поддержания клеточной культуры.

Факторы, определяющие необходимость замены культуральной среды:

Концентрация клеток.

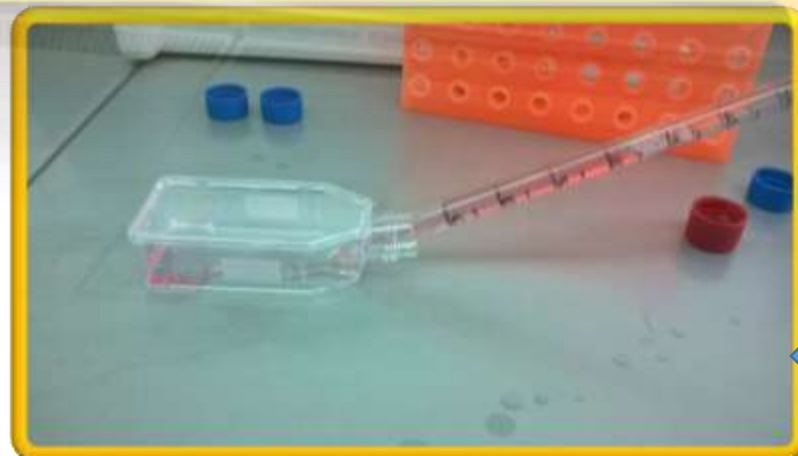
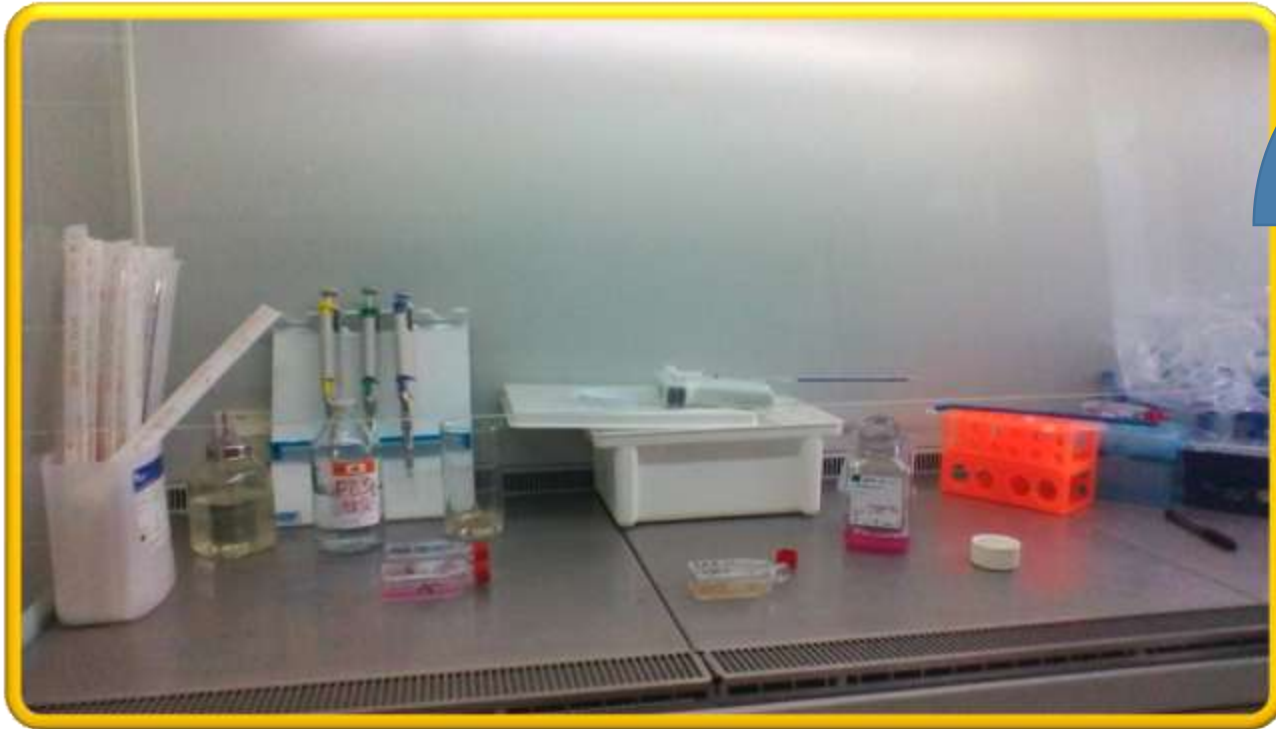
При высокой концентрации клеток в культуре истощение питательной среды происходит быстрее, чем при низкой концентрации. Этот фактор обычно (но не всегда) очевидно прояв-ляется в скорости падения pH.

Тип клеток.

Нормальные клетки (например, дипло-идные фибробласты) обычно перестают делиться при высокой плотности клеток. Клетки блокируются в G1-фазе клеточного цикла и долго сохраняются. Однако состояние трансформированных клеток, постоянных клеточных линий и некоторых эмбриональных клеток быстро ухудшается при высокой плотности клеток, если только среду не заменять ежедневно или не производить субкультивирование

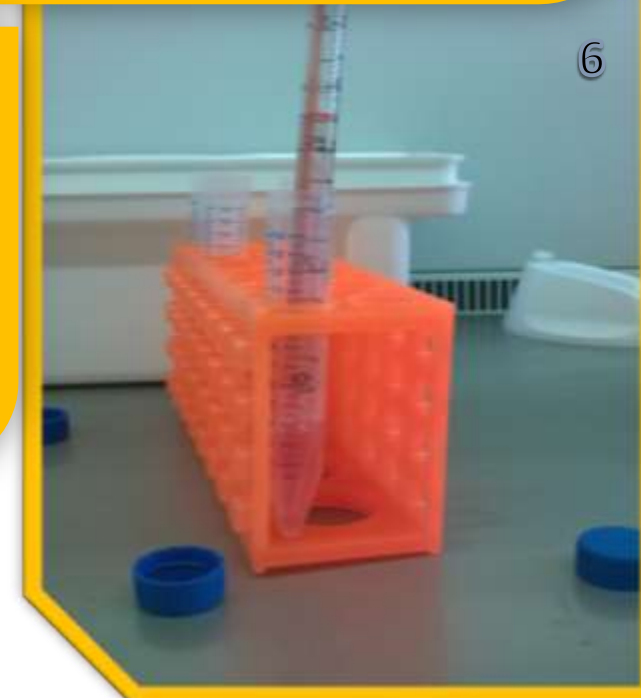
Порядок поддержания клеточной культуры.

Замена питательной среды



Порядок поддержания клеточной культуры.

Субкультивирование



Критерии субкультивирования.

Плотность культуры.

Нормальные клетки должны быть субкультивированы, как только они достигают стадии, когда границы клеток смыкаются (конфлюэнтности). Если оставить их в этом состоянии более чем на 24 ч. они выйдут из цикла деления. Трансформированные клетки также следует субкультивировать по достижении конфлюэнтности, хотя они будут продолжать пролиферировать и после, но состояние культуры начнет ухудшаться после приблизительно двух периодов удвоения, и эффективность посева будет снижаться.

Истощение среды.

Истощение среды обычно показывает, что среда должна быть заменена, но если падение рН развивается слишком быстро, то среду приходится менять чаще, чем необходимо с точки зрения субкультивирования. Обычно падение рН связано с возрастанием плотности клеток, которое является главным индикатором потребности в субкультивировании.

Критерии субкультивирования.

Время, прошедшее с последнего субкультивирования.

Рутинное субкультивирование наилучшим образом проводится по строгому расписанию, чтобы воспроизведение культуры было качественным и контролируемым. Если клетки при этом не достигают достаточно высокой плотности (т.е. не достигают стадии конфлюэнтного монослоя) за со-ответствующее время, то следует повысить концентрацию клеток при посеве. Если же они достигают конфлюэнтности слишком быстро, то концентрацию клеток при посеве следует уменьшить. При установлении стандартного режима субкультивирования, при данной постоянной концентрации клеток, периодически повторяющийся рост клеток при посеве должен иметь постоянную периодичность и стабильный клеточный выход. Отклонения от этого стандарта будет признаком отклонения от нормальных условий или ухудшения состояния клеток.