

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

Клітинна інженерія
Навчально-методичний посібник
для здобувачів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія



Львів – 2024

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

Клітинна інженерія
Навчально-методичний посібник
для здобувачів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія

Львів – 2024

УДК: 575.853 (075)

Рецензенти:

д-р фарм. наук, професорка кафедри технології ліків і біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; ад'юнкт кафедри фармації і екологічної хімії Опольського університету (Польща) Наталія Гудзь;

канд. мед. наук, доцент кафедри фармації та біології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького Олександр Лісняк

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнологій, протокол №5 від 26. 02. 24 р.

Рекомендовано Львівським національним університетом ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького як навчально-методичний посібник для здобувачів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія.

Клітинна інженерія: навчально-методичний посібник, 2-ге видання / [авт.-уклад. Шемедюк Н. П.] Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2024. 130 с.

Навчально-методичний посібник укладено для здобувачів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія. У посібнику коротко викладено, проілюстровано теоретичний матеріал з дисципліни «Клітинна інженерія», рекомендовано до виконання лабораторні роботи, описано методи клітинної інженерії та суть їх виконання. Наприклад, методи одержання і практичного використання клітинних культур, зокрема стовбурових, гібридом; теоретичні відомості щодо принципів підтримання життєздатності клітин і маніпуляцій *in vitro*. Підібраний матеріал відповідає робочій програмі з дисципліни «Клітинна інженерія» для здобувачів факультету харчових технологій та біотехнології ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
ПРАВИЛА РОБОТИ У ЛАБОРАТОРІЇ	8
ПЕРЕЛІК ПРИЛАДІВ ДЛЯ БАЗОВОГО ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ	12
РОЗДІЛ 1. СУТЬ МЕТОДУ КУЛЬТИВУВАННЯ ТВАРИННИХ ТКАНИН І КЛІТИН. ВИМОГИ ПІД ЧАС РОБОТИ З КЛІТИННИМИ КУЛЬТУРАМИ ..	13
1.1. Історія методу культивування тваринних клітин.....	13
1.2. Застосування методу культивування клітин.....	15
Лабораторна робота №1. Аналіз робочого місця для проведення роботи з культурою тваринних клітин. Вивчення обладнання.....	18
Лабораторна робота №2. Підготовка посуду для роботи з культурою клітин, стерилізація скляного посуду.....	26
РОЗДІЛ 2: КУЛЬТУРИ КЛІТИН	32
2.1. Напрямки культивування клітин тварини.....	32
2. 2. Класифікація культур клітин за способом культивування.....	34
2. 3. Типи культур тваринних клітин.....	36
Лабораторна робота №3. Отримання первинної культури мишачих ембріональних фібробластів <i>MEF (Mouse Embryonic Fibroblast)</i>	42
РОЗДІЛ 3. КУЛЬТУРАЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ	48
3.1 Загальна характеристика культурального середовища.....	48
3.2. Різновиди середовищ.....	50
3.3. Сироватка як компонент культурального середовища.....	54
Лабораторна робота №4. Приготування культурального середовища <i>DMEM</i> у модифікації Дюльбекко для культивування пухлинних клітин....	58
Лабораторна робота №5. Приготування розчинів, які використовуються під час методу культивування клітин.....	60
РОЗДІЛ 4. КЛІТИННИЙ ЦИКЛ, ФАЗИ РОСТУ КЛІТИН У КУЛЬТУРІ ..	64
4.1. Клітинний цикл.....	64
4.2. Фази росту клітин у культурі.....	64
4.3. Синхронізація клітин.....	66

Лабораторна робота № 6. Основні принципи методу культивування тваринних клітин.....	68
Лабораторна робота № 7. Дослідження метаболічної активності клітин з використанням МТТ.....	77
Лабораторна робота № 8. Синхронізація клітин у культурі.....	80
РОЗДІЛ 5. СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ.....	82
5.1. Стовбурові клітини, етапи ембріогенезу.....	82
5.2. Класифікація стовбурових клітин.....	83
5.3. Особливість поділу стовбурової клітини.....	85
5.4. Особливості ембріональних стовбурових клітин.....	86
5.5. Перепрограмування диференційованих клітин та генна терапія стовбурових клітин.....	88
Лабораторна робота №9. Одержання культури ембріональних стовбурових клітин.....	91
Лабораторна робота № 10. Кріоконсервування і розморожування клітин.....	95
РОЗДІЛ 6. ГІБРИДИЗАЦІЯ КЛІТИН.....	99
6.1. Гібриди клітин, клітинна селекція.....	99
6.2. Основні методи злиття клітин.....	101
6.3. Біотехнологія одержання особливих типів гібридних клітин.....	104
РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ГІБРИДОМ, МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ.....	108
7. 1. Антитіла та антигени.....	108
7.2. Шлях до одержання гібридом.....	109
7.3. Етапи одержання моноклональних антитіл (МКА).....	110
7. 4. Застосування МКА у імуноферментному аналізі.....	112
Лабораторна робота №11. Визначення антитіл до тиреопероксидази (АТ ТПО) в сироватці крові ІФА.....	117
ГЛОСАРІЙ.....	120
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	125
ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК.....	128

ВСТУП

Клітинна інженерія – це напрям біотехнології, спрямований на одержання нової генетичної інформації за допомогою гібридизації і реконструкції клітин *in vitro*. Методи клітинної інженерії: гібридизація клітин, одержання стовбурових клітин, химер, клонування. В основі названих вище методів біотехнології – культивування клітинних культур. На відміну від мікроорганізмів, культури клітин вищих організмів є порівняно новими об'єктами, однак на даний час існує можливість культивування клітин практично всіх тканин і органів людини, тварин і рослин. Значну кількість теоретичного матеріалу та лабораторних робіт за цією темою викладено у посібнику, що дасть можливість здобувачеві оволодіти основними компетентностями біотехнолога. Такими компетентностями є:

- ✓ навик роботи з клітинами *in vitro* (вивчення умов, методів культивування, кріоконсервування різних типів клітин, принципів роботи з необхідним обладнанням);
- ✓ отримання гібридних клітин, у тому числі, життєздатних клонів, що активно проліферують;
- ✓ знання гібридомної технології та отримання моноклональних антитіл;
- ✓ одержання стовбурових клітин.

Багато методів, описаних у ході виконання лабораторних робіт, є досить складними під час їх виконання, тому окремо наведено приклади розрахунків, приготування розчинів, уточнення. Для кращого розуміння принципу методу сформовано список рекомендованої літератури. У посібнику містяться найважливіші елементи лекційного матеріалу з дисципліни «Клітинна інженерія» та ілюстраційні пояснення до нього.

Методи клітинної інженерії застосовують для вирішення багатьох глобальних проблем людства, зокрема діагностики, профілактики та лікування захворювань, попередження епідемій, одержання біологічно активних речовин, у дослідженні фундаментальних питань генетики, фізіології, вірусології.

Досягненнями клітинної інженерії є:

1. одержання біологічно активних сполук, використовуючи метод культивування клітин. Прикладом використання деяких культур пухлинних клітин або нормальних клітини, трансформованих *in vitro*, які зберігають здатність синтезувати специфічні продукти: гормон росту (пухлина гіпофізу); колаген, мукополісахариди (фібробласти); кортикостероїди (пухлина наднирників);
2. трансфекція соматичних та статевих клітин і нарощення вірусної біомаси;
3. забезпечення можливостей направленої генетичної трансформації соматичних та статевих клітин тварин і рослин з метою отримання клітин-продуцентів важливих білкових продуктів;
4. встановлення правила комплементации генів у гібридних соматичних клітинах; формулювання поняття про гени «розкоші» і гени «необхідності» та встановлення правила пригнічення функцій генів «розкоші» у гібридизованих клітинах.

Навчальний посібник буде корисним під час виконання курсових та кваліфікаційних робіт.

ПРАВИЛА РОБОТИ У ЛАБОРАТОРІЇ

Основні правила роботи у боксі для роботи з культурою клітин:

1. обережно користуватись електричним, газовим обладнанням;
2. всі прилади, що використовуються для культивування клітин повинні бути заземлені, розетки та вмикачі знаходяться у доступній та безпечній зоні;
3. робота студентів повинна відбуватись лише за присутності відповідального за безпеку у лабораторії персоналу;
4. вмикати та вимикати прилади дозволено лише за згоди відповідального за безпеку у лабораторії персоналу;
5. робота у культуральній лабораторії повинна відбуватись без стороннього шуму та відволікаючих подій;
6. перед початком роботи під ламінаром слід максимально зручно обладнати робоче місце (висоту стільця, доступ до посуду, мікродозаторів, газового або спиртового пальника);
7. перед початком роботи слід з'ясувати ступінь біологічної безпеки, який характеризує обрану для дослідження лінію клітин або первинну культуру;
8. максимально дотримуватись правил та навиків стерильної роботи;
9. після завершення дослідження упорядкувати робоче місце та прозвітувати про виконану роботу.

Основні вимоги до приміщення лабораторії для роботи з культурою клітин:

1. у лабораторії, де проводяться дослідження еукаріотичних культур, не можна працювати з прокаріотичними культурами або експериментальними тваринами;
2. стерильна зона не повинна мати наскрізного проходу;

3. підготовча зона містить мийку, бажано розділену на два блоки – для первинної обробки посуду, в якому культивували клітини, та зону для послідовного миття (проточною, дистильованою та дейонізованою водою) посуду;
4. у стерильній зоні можуть міститись інкубатори, шафи для зберігання стерильного пластикового та скляного посуду;
5. лабораторія повинна бути обладнана холодильниками та морозильними камерами для зберігання реактивів та середовищ культивування клітин, обладнанням для кріоконсервації та зберігання біологічного матеріалу в рідкому Нітрогені.

Загальні правила роботи у лабораторії:

1. під час роботи у лабораторії виконуйте тільки ту роботу, яку Вам доручено;
2. під час виконання роботи дотримуйтеся правил поведінки у лабораторії (не відволікайте увагу колег, не залишайте без нагляду своє робоче місце, розпочату роботу);
3. підтримуйте порядок робочого місця (на робочому місці не повинно бути непотрібних для роботи речей, наприклад, сумок, портфелів, тощо);
4. працюйте лише за закріпленим за Вами місцем у лабораторії;
5. використовуючи речовин для досліду, звертайте увагу на етикетку. У тому разі, коли виникає сумнів щодо відповідності вмісту флакону надпису на етикетці, звертайтеся до викладача або лаборанта;
6. розпочинаючи роботу, уважно ознайомтесь із завданням та правилами техніки безпеки, обладнанням, матеріалами;
7. хімічні реакції необхідно проводити за умов і у кількостях, концентраціях реагентів, які пропонуються у методичній літературі. Для проведення хімічних реакцій використовуйте зазначений у методичних матеріалах посуд і прилади;

8. нагрівання вмісту пробірок відбувається поступово за допомогою пробіркотримача чи штативу. Пробірка спрямовується у напрямку від себе і свого колеги. Не схиляйтеся над пробіркою, в якій кипить рідина;
9. якщо потрібно ідентифікувати речовину за запахом, спрямовуйте до себе випари з пробірки помахом руки;
10. реактиви не пробуйте на смак, не пийте з хімічного посуду;
11. досліди з леткими речовинами проводьте у витяжній шафі;
12. роботи з бензолом, етерами та спиртами проводяться на певній відстані від полум'я, у витяжній шафі;
13. розчиняйте сульфатну кислоту у воді шляхом внесення кислоти до води невеликими порціями, весь час помішуючи розчин. Майте на увазі, що при розчиненні сульфатної кислоти, відбувається нагрівання розчину;
14. зливати у раковину кислоти та лужні розчини можна після їх нейтралізації лугами чи кислотами відповідно;
15. розлиті кислоти та лужні розчини присипати піском або нейтралізувати, лише після цього проводити прибирання;
16. у разі виявлення порушення правил безпеки, повідомляйте викладача або лаборанта.

СУВОРО ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ

1. Вмикати силові та освітлювальні рубильники без дозволу;
2. Проводити роботи з хімічними речовинами у лабораторіях без загальної витяжної вентиляції;
3. Тримати у приміщенні особистий одяг та інші речі;
4. Їсти у приміщенні;
5. Залишати без догляду запалені горілки та нагрівальні прилади;
6. Проводити роботу без наявності спецодягу (халатів);
7. Залишатися працювати в лабораторії одному. Обов'язкова присутність другої особи для забезпечення надання допомоги.

НЕАКУРАТНІСТЬ, НЕУВАЖНІСТЬ, НЕДОСТАТНЯ ОБІЗНАНІСТЬ З РОБОТОЮ ПРИЛАДІВ ТА ВЛАСТИВОСТЯМИ РЕАГЕНТІВ, ПРАВИЛАМИ БЕЗПЕКИ МОЖЕ ПРИЗВЕСТИ ДО НЕЩАСНИХ ВИПАДКІВ !!!

РЕЧОВИНИ, ЯКІ ВИМАГАЮТЬ ОБЕРЕЖНОГО ПОВОДЖЕННЯ:

1. **Нітратна кислота.** Концентрована кислота спричиняє опіки шкіри. Випари нітратної кислоти подразнююче діють на слизову оболонку дихальних шляхів, очей. Нітратна кислота може вибухати при взаємодії зі скипидаром та спиртом, солями пікринової кислоти, карбідами та порошками металів.
2. **Ацетон.** Летка речовина. Зберігати у колбах з притертим корком.
3. **Луг.** Потрапляючи на шкіру та слизові оболонки, спричиняє опіки. Зберігаються у сухому місці.
4. **Сульфатна кислота.** Потрапляючи на шкіру спричиняє важкі опіки, потрапляючи у дихальні шляхи – подразнення слизових оболонок.
5. **Хлоридна кислота.** Спричиняє опіки шкіри. Випари спричиняють опіки слизових оболонок.
6. **Ацетатна кислота.** Спричиняє важкі опіки шкіри, випари – опіки слизових оболонок. Під час взаємодії з нітратною кислотою та Натрію пероксидом може спалахнути. Гасити водою.

ПЕРЕЛІК ПРИЛАДІВ ДЛЯ БАЗОВОГО ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ ДЛЯ РОБОТИ З КУЛЬТУРОЮ КЛІТИН

1. Ваги аналітичні;
2. Камера для горизонтального електрофорезу;
3. Камера для вертикального електрофорезу;
5. Морозильна камера;
6. Мікроскопи;
7. CO₂ інкубатор;
8. Вортекс;
9. *pH*-метр;
10. Термостат;
11. Магнітна мішалка;
12. Шейкер;
13. Центрифуга/вортекс;
14. Дистилятор;
15. Охолоджуюча центрифуга;
16. Автоклав;
17. Ламінарна шафа II класу захисту.
18. Набір мікродозаторів.

РОЗДІЛ 1. СУТЬ МЕТОДУ КУЛЬТИВУВАННЯ ТВАРИННИХ ТКАНИН І КЛІТИН. ВИМОГИ ПІД ЧАС РОБОТИ З КЛІТИННИМИ КУЛЬТУРАМИ

Суть методу тканинних і клітинних культур полягає у забезпеченні таких умов *in vitro*, за яких клітини зберігають свої біологічні функції. Основним критерієм під час вибору тканини чи лінії клітин для дослідження є природа того процесу, який мають намір вивчати чи мета, результатом досягнення якої є виконання конкретного завдання. Наприклад, вивчення таких загальних клітинних процесів як біосинтез ДНК, проникність мембран, визначення цитотоксичності може бути здійснене на будь-якому типі клітин. Водночас дослідження спеціалізованих клітинних функцій, таких як утворення мікротрубочок, синтез антитіл, регуляція ензимів циклу сечовини, одержання біологічно активних речовин, гібридів потребує використання спеціальних типів клітин, які володіють згаданими функціями.

1. 1. Історія методу культивування тваринних клітин

Широке застосування культури клітин людини і тварин розпочалося з праць, в яких продемонстровано можливість вирощувати віруси у клітинній культурі (1949р.). З цією метою використано клітини нирок ембріонів людини, нирок дорослих мавп, ембріонів курчат. Застосування методу клітинних культур дозволило одержати необхідну біомасу вірусів. Це сприяло розвитку методів діагностики вірусних захворювань й отриманню необхідних вакцин.

Основні дати історії методу культури тваринних клітин

1885р. – У. Ру встановив можливість збереження життєздатності тканин поза організмом, у своїх дослідженнях він показав, що оболонка ембріона курчат може зберігатися у теплому фізіологічному розчині.

1897р. – Ж. Леб підтримував життєздатність клітини крові і сполучної тканини у пробірках із сироваткою і плазмою крові.

1898р. – І. Льюнгрен довів можливість підтримання життєздатності експлантатів шкіри людини, при цьому зберігалася їх здатність до реімплантації.

1904 – 1907 рр. – Р. Гаррісон експериментально довів можливість вирощування ізольованих клітин *in vitro*. Учений виростив нейробласти жаби у лімфатичній рідині і встановив, що швидкість росту нервових клітин становить 20 мкм за 25 хв.

1911р. – зоологи А. Каррель і К. Барроуз вдосконалюють метод культивування тканини і клітини ссавців. Культивуючи тваринні клітини, А. Каррель вносив у середовище плазму крові, збагачену екстрактом ембріона. Внесення такого екстракту пришвидшувало ріст тканин, що дозволило досягнути кращого результату, порівняно з застосуванням середовищ різного хімічного складу без екстракту ембріона С. А. Левіс (1911р.) і Л. М. Рід (1908р.) для культивування клітин кісткового мозку морської свинки. Робота Карреля привернула велику увагу тому, що вона була опублікована під назвою, яка інтригує, – «Культивування «безсмертних» клітин». Інкубацію клітин серця ембріона курки розпочато 17 січня 1912р.

1928р. – для спостереження за культурою клітин Канті розробив метод кінофотомікрофотографії.

1948р. – В. Ерл уперше одержав клони клітин у культурі – популяцію клітин з одної вихідної клітини.

1952р. – Г. Джей виділив першу «безсмертну» лінію клітин. Це лінія клітин *HeLa*, отримана зі злоякісної пухлини шийки матки людини. Дослідження з використанням цієї клітинної лінії відбуваються у багатьох лабораторіях світу.

1954р. – Рита Леві-Монтальчині дослідила білковий фактор, який стимулював ріст клітин нервової системи.

1955р. – створено середовище Ігла. Г. Ігл систематизував всі необхідні хімічні речовини для оптимального існування тваринних культур в умовах *in vitro*.

1961р. – Л. Хейфлік і П. Мурхед виділили лінію диплоїдних клітин фібробластів ембріона людини WI-38 і дослідили, що період існування цих клітин у культурі приблизно 50 поділів. До цього вважалося, що клітинна

лінія має необмежений час життя. Перед відмиранням для клітин лінії WI-38 характерний феномен старіння. Ці клітини впродовж існування залишаються диплоїдними і не характеризуються ознаками злоякісних клітин, тому широко застосовуються для виробництва більш безпечних та ефективних вакцин проти сказу, віспи, аденовірусної інфекції, кору, краснухи.

Клітини, виділені з ракових пухлин або трансформовані під час культивування, характеризуються «безсмертністю» і корелюють із гетероплоїдністю.

1986р. – Рита Леві-Монтальчині та Коген одержали Нобелівську премію у галузі фізіології та медицини за виявлення та дослідження біологічної ролі поліпептидних факторів росту – нового класу регуляторів функцій клітин тварин і людини. Ці фактори поряд з гормонами та нейротрансмітерами мають важливе значення у регуляції основних клітинних функцій. Слід підкреслити, що саме метод клітинних культур дав змогу дослідити біологічну дію поліпептидних факторів росту.

1.2. Застосування методу культивування клітин

Культура клітин дуже часто замінює або доповнює існуючі моделі дослідження з використанням тварин, позаяк використання культури клітин є зручнішим і дешевшим. Культура клітин з достатньою достовірністю може репрезентувати процеси, які відбуваються у певному типі клітин організму. Зростання масштабів використання рекомбінантних терапевтичних протеїнів у клінічній практиці, перетворення антитіл на потужний дослідницький інструмент, сучасні досягнення у дослідженні стовбурових клітин роблять цей метод повсякденною практикою у багатьох лабораторіях, що спонукає науковців до більш детального вивчення процесів, які впливають на вирощування клітин *in vitro*.

На сучасному етапі розвитку культивування клітин постає питання не лише про виділення та підтримання життєдіяльності, але про можливість маніпулювання та зміни клітини у культурі для наукових чи практичних

потреб: створення рекомбінантних чи трансгенних клітинних ліній, модифікація клітин у лініях задля штучного контролю клітинної проліферації.

Культури клітин вважають високоекономічними моделями у дослідженнях з вивчення механізмів впливу різноманітних фізико-хімічних чинників: зміни *pH*, температури, концентрації гормонів, амінокислот, ростових факторів, цитокінів. Головна перевага культур клітин – це можливість прижиттєвого спостереження за ними тривалий час. Зміна умов росту морфологічно однорідної популяції клітин у визначених межах дозволяє оцінити проліферативний ріст клітин через короткий проміжок часу за збільшенням їх кількості і зміною морфології або відслідкувати долю дочірніх клітин за включеними білковими маркерами.

Культури тваринних клітин є важливими продуцентами біологічно важливих речовин. На них вирощують віруси для їх ідентифікації та одержання вакцин. Їх застосовують для тестування та вивчення механізму дії ліків, косметичних засобів, пестицидів, консервантів. Використовуються у трансплантаційній медицині. Так, культура клітин шкіри використовується для лікування опіків, культура клітин ендотелію – для реконструкції стінок судин.

Здатність клітин до росту у культурі призвела до розвитку методів клонування, збереження і злиття клітин, що у свою чергу спонукало до розвитку генетики соматичних клітин. Органні культури використовують для вивчення закономірностей розвитку органів, для вивчення способів збереження життєздатності ізольованих органів з метою трансплантації.

Напрямки застосування методу культивування клітин:

- лабораторні дослідження (доповнює існуючі моделі дослідження, зручніший і дешевший, достатньо достовірний);
- повсякденна практика у роботі зі стовбуровими клітинами, клонами, для одержання і роботи з моноклональними антитілами, на певних етапах трансплантації клітин, тканин, органів, ембріонів;
- синтез природних хімічних сполук;

- одержання вірусної біомаси, яку застосовують для виробництва вакцин і діагностики вірусних захворювань.

Найчастіше культивуються:

- ✓ сполучна тканина – фібробласти;
- ✓ скелетна – кістки і хрящі;
- ✓ м'язева – скелетні, серцеві і гладенькі м'язи;
- ✓ епітеліальна – печінка, легені, шкіра, сечовий міхур, нирки, молочна залоза;
- ✓ різні типи пухлинних клітин.

Лабораторна робота №1

Тема: Аналіз робочого місця для проведення роботи з культурою тваринних клітин. Вивчення обладнання

Мета: засвоїти вимоги щодо умов проведення робіт з культурою клітин.

Створити умови для проведення наступних лабораторних робіт.

Завдання:

1. Ознайомитись зі структурою лабораторії для роботи з культурою клітин;
2. Ознайомитись з основним обладнанням лабораторії для роботи з культурою клітин;
3. Вивчити правила поведінки у боксі для роботи з культурою клітин;
4. У висновку коротко описати основні моменти, які потрібно врахувати при підготовці боксу до роботи з культурою клітин.

Біобезпека під час роботи з клітинними культурами

Лабораторія для роботи з культурою клітин характеризується рядом додаткових ризиків, пов'язаних зі специфікою культивування. До класу робіт з підвищеною небезпекою (робота з клітинними культурами контамінованими вірусними або бактеріальними інфекціями, за впливу речовин підвищеної небезпеки – токсинами, радіоізотопами), як правило, допускається лише досвідчений персонал. Тому, важливим етапом перед початком роботи з культурою є оцінка ризиків, визначення природи та масштабів потенційної небезпеки, ступінь та частота контакту з небезпечним матеріалом. Під час роботи з культурами клітин є загроза пожежної небезпеки (використання пальників) та можливе обмороження, працюючи з рідким Нітрогеном. Якщо виконання робіт у лабораторії пов'язане з ризиком для дослідників, потрібно дотримуватись чітких послідовних маніпуляцій на основі стандартних операційних процедур (СОП), які готуються перед початком роботи із врахуванням всіх можливих небезпек. Щодо експлуатації обладнання, в лабораторії повинні бути чіткі інструкції.

Завдання 1. Ознайомитись зі структурою лабораторії для роботи з культурою клітин

Запорукою успіху у роботі з культурою клітин є стерильність!!!

Стерильність роботи з культурами клітин досягається шляхом проведення досліджень у боксовому приміщенні.

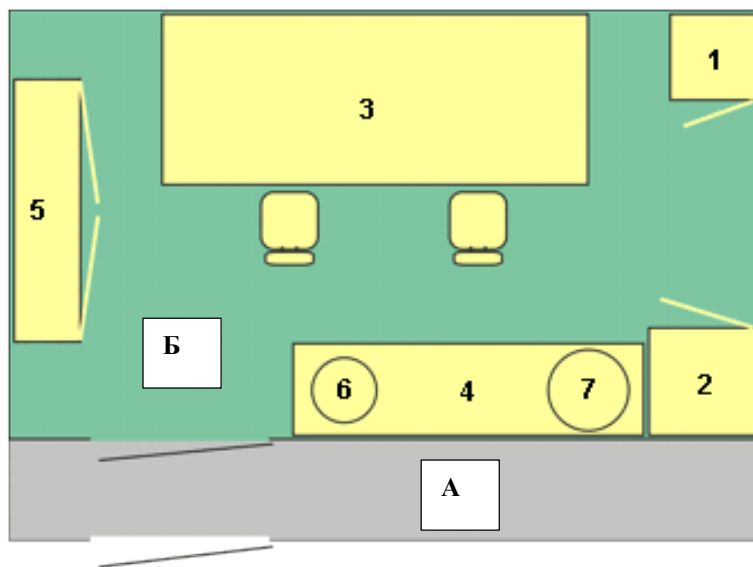


Рис. 1. Приміщення культурального блоку:

Передбюксник (А),

Бокс (Б):

1 - CO₂-інкубатор

2 - холодильник

3 - ламінар

4 - стіл з мікроскопами:

світловим (6)

та інвертованим світловим (7)

5 - шафа з посудом

За правилами стерильної роботи культуральний блок поділений на декілька зон – бокс, в якому знаходяться: ламінар, CO₂-інкубатор, інвертований мікроскоп, холодильник для зберігання необхідних середовищ для культивування клітин та передбюксове приміщення з додатковим обладнанням. Поза межами боксу із ламінаром та CO₂-інкубатором в двох окремих приміщеннях повинні бути розміщені автоклав та сухожарова шафа для стерилізації розчинів та посуду, кріообладнання, Дьюари для заповнення та зберігання рідкого Нітрогену та Дьюари, обладнані спеціальними пронумерованими касетами для довготривалого зберігання клітинних ліній, первинних культур, перевивних штамів, стовбурових клітин, клонів.

Завдання 2. Ознайомитись з основним обладнанням лабораторії для роботи з культурою клітин

Характеристика основного обладнання лабораторії для роботи з культурою клітин

Обладнання лабораторії можна поділити на 4 групи:

1. прилади та обладнання для культивування клітин;
2. прилади для прижиттєвої візуалізації клітин (мікроскопи; відеокамери);
3. прилади та обладнання для кріоконсервації та зберігання клітинних культур;
4. прилади та обладнання, що забезпечують методи роботи під час експерименту з клітинними культурами.



Рис. 2. Використання ламінарну для роботи з культурою клітин

Прилади та обладнання для культивування клітин

Ламінар – це локальне стерильне робоче місце. Надлишковий тиск повітря у робочому об'ємі та спеціальні конструкторські заходи виключають можливість потрапляння повітря із приміщення в місце розташування біологічного матеріалу. Додатково

стерильність забезпечується підведенням усередину газового пальника, який повинен мати добре відрегульований потік газу. Також альтернативою є спиртові пальники, які використовуються у більшості випадків, оскільки є менш аварійно небезпечними. Окрім цього, ламінари обладнано ультрафіолетовими лампами для стерилізації камери перед початком (за 30хв) та після завершення роботи (на 30хв). Періодично стерилізацію ламінарну проводять 70%-им спиртовим розчином, протираючи всі робочі поверхні. Кожен раз перед початком роботи робочу поверхню стола ламінарну, руки, флакони, культуральний посуд протирають 70%-им спиртовим розчином. Після завершення роботи робочу поверхню стола протирають 70%-им спиртовим розчином.

Місце розміщення ламінару повинно бути ретельно підібрано; зазвичай

це куток кімнати з доступом до електроенергії, газовідводу та водовідведення (у випадку використання автоматичних водяних відсмоктувачів рідини).

CO₂-інкубатор. Основна функція – це підтримання життєдіяльності клітин поза організмом. Це термостат, у якому відбувається регулювання



Рис. 3. CO₂-інкубатор

температури, підтримання вологості, концентрації CO₂. Культивування більшості клітин тварин та людини відбувається за умов:

температура – 37°C;

вологість – 100%;

концентрація CO₂ – 5 %.

Періодично проводиться профілактичне відключення CO₂-інкубатора, промивання внутрішньої камери. Лабораторні термостати для культивування клітин повинні відповідати певним вимогам: забезпечувати високу стабільність

заданої температури, мати систему швидкого відновлення температури після короткотермінового охолодження. Внутрішня поверхня термостатів виготовлена із біологічно пасивних матеріалів, тобто таких, що не впливають на життєздатність клітин та стійких до дії компонентів живильних середовищ. Зазвичай термостати мають зовнішні та внутрішні дверцята. Внутрішні дверцята виготовлено із прозорого матеріалу, що дозволяє спостерігати за культуральними флаконами без порушення температурного режиму. Регуляція CO₂ відбувається за допомогою редуктора, приєднаного до балону (зокрема, з карбонатною кислотою). Редуктор обладнано двома манометрами: перший із них показує тиск (у атмосферах) у балоні, другий забезпечує постійну подачу необхідного відсотка карбонатної кислоти у камері інкубатора для культивованих клітин.

Оптимальне pH для більшості культур клітин тварин і людини становить 7,2–7,4. Зазвичай підтримання такого pH забезпечується бікарбонатним буфером, який створюється у культуральному середовищі. Компонентами цього буферу є аніон HCO_3^- (походить від Натрію бікарбонату у культуральному середовищі) та H_2CO_3 (з вуглекислого газу, який закачують у робочу камеру). За умов визначеної кількості доданого бікарбонату треба забезпечити 5% концентрацію CO_2 у газовій фазі, щоб pH культурального середовища становило 7,2–7,4.

Прилади для прижиттєвої візуалізації клітин



Рис. 4. Інвертований мікроскоп

Інвертований мікроскоп. В основі роботи інвертованого мікроскопа – принцип «перевернутості» (інвертованості), у результаті чого у полі зору можна спостерігати за клітинами, прикріпленими до дна планшету, флакону, чи чашки Петрі. З використанням інвертованого мікроскопа

можна також спостерігати за клітинами, що ростуть у суспензії. Більшість сучасних інвертованих мікроскопів обладнані відеокамерами та цифровими фотоапаратами, що дозволяє проводити прижиттєве спостереження за клітинами на всіх етапах їхнього культивування. Мікроскопи можуть мати спеціальне програмне забезпечення (наприклад AxioVision, Carl ZEISS), що дозволяє обраховувати площу, інтенсивність забарвлення, розміри та інші параметри культивованих клітин; постійно спостерігати за інтенсивністю поширення субстратзалежних клітин за визначений проміжок часу.

Прилади, пристрої для кріоконсервування та зберігання клітин

Для кріоконсервування клітинних субкультур лабораторія повинна бути оснащена кріоцистернами різної ємності, 5 – 10-ти літровими для щоденної роботи з культурами та 40-ка літровими для їх тривалого збереження у рідкому Нітрогені (рис. 5). Первинне замороження клітин проводять у холодильній



Рис. 5. Дьюари з рідким Нітрогеном і штатив з кріопробірками

камері за -20°C та -80°C . Зазвичай, працювати з рідким Нітрогеном дозволено лише персоналу після спеціальної підготовки

з врахуванням усіх правил безпеки поведінки з реактивами, що можуть спричиняти обмороження. Для створення клітинних банків необхідно мати окреме приміщення.

Прилади та обладнання, що забезпечують методи роботи під час експерименту з клітинними культурами

Серед допоміжного необхідного обладнання в першу чергу виділяють автоклави та сухожарові шкафи, бідистилятори та дейонізатори для очищення води, прилади для ультрафільтрації середовищ та буферів, що використовуються для культивування клітин, мультилункові



Рис. 6. Автоклав



Мультилунковий спектрофотометр



Центрифуга



Водяна баня



Рис. 7. pH-метр



Мікродозатори



Магнітна мішалка

спектрофотометри, автоматичні відсмоктувачі рідини, водяні бані, pH-метри, лабораторні магнітні мішалки, гемоцитометри, а також широкий спектр біохімічних, молекулярно-біологічних та хроматографічних приладів, необхідних для обладнання культуральної лабораторії певного напрямку досліджень. Робота з культурами клітин передбачає наявність у лабораторії

центрифуги, електронних вагів для зважування компонентів середовищ і розчинів. Необхідний також комплект напівавтоматичних мікродозаторів об'ємом від 10 до 1000мкл зі змінними стерильними наконечниками 10, 100 або 200 і 1000мкл.

Завдання 3. Вивчити правила поведінки у боксі для роботи з культурою клітин

Вхід в бокс, де проводяться роботи з культурами тваринних клітин, є обмеженим (не більше 3 особи). Робота проводиться у спецодязі з натуральних тканин (халат, змінне взуття; шапочка, маска – залежить від специфіки досліджуваних об'єктів і методів роботи).

Перед початком роботи слід ввімкнути у ламінарі ультрафіолетову лампу (30 хвилин), ламінарний потік повітря. *Працюючи з культурами у ламінарі, ультрафіолетову лампу вимикаємо!!!*

Перед роботою у ламінарі необхідно обробити руки спиртом. Після цієї процедури руками працюють лише у ламінарі. Якщо руки опинились поза ламінаром, процедуру з оброблення спиртом слід повторити. Працюючи, слід роботу організувати так, щоб «чисті» і користовані предмети були розділені у просторі, за можливості – у часі. Наприклад, відібрати середовище у ламінарі, решта, задля попередження контамінації, винести з-під ламінарну; лише після цього вносити під ламінар культури і проводити з ними маніпуляції. Використання стерильних рукавичок не завжди є безпечним, оскільки використання етанолу та пальника у ламінарі може призводити до пожежі. Приміщення, в якому проводиться стерильна робота з клітинами не відвідують сторонні люди, воно не провітрюється, обладнане кондиціонером. Стіни, підлога вкриті матеріалом, який добре миється дезінфікуючими розчинами.

Не допускати проведення робіт з бактеріями, дріжджами та клітинами вищих еукаріот в одному ламінарі. Для робіт з різними об'єктами, як правило, використовуються окремі приміщення. Якщо виникає необхідність одному досліднику працювати з різними об'єктами, послідовність роботи – клітини, бактерії, дріжджі.

Лабораторна робота №2

Тема: Підготовка посуду для роботи з культурою клітин, стерилізування скляного посуду

Мета: ознайомитись з різноманітністю і значенням посуду для роботи з культурою клітин, методами його підготовки до роботи.

Завдання:

1. Ознайомитись з пластиковим посудом для роботи з культурою клітин;
2. Ознайомитись зі скляним посудом для роботи з культурою клітин та методами його підготовки до роботи.

Є два основні види культурального посуду – скляний та пластиковий. Кожен з цих видів посуду має свої переваги та недоліки. Скляний посуд для культивування клітин виготовляється із спеціального нейтрального скла.

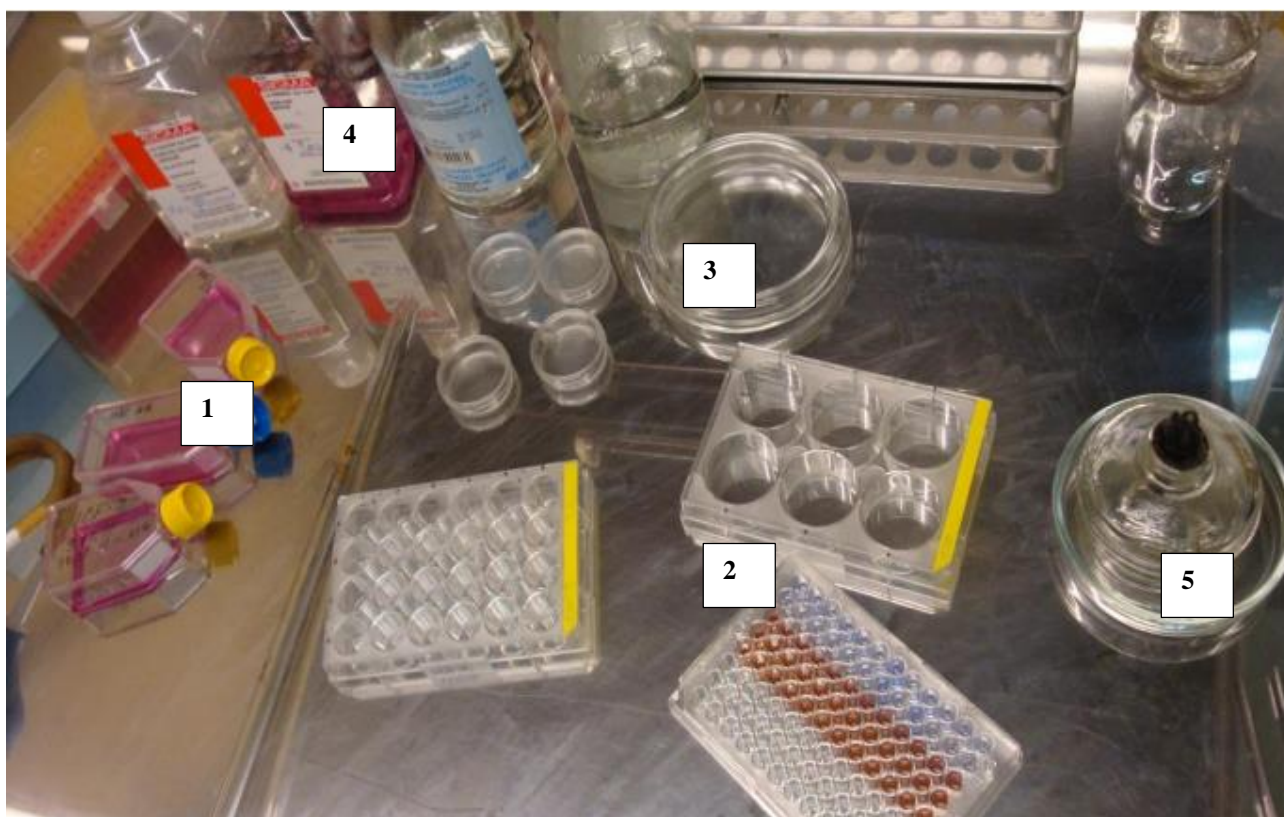


Рис.8. Посуд для культивування клітин:

- 1 – культуральні флакони;
- 2 – культуральні планшети: 6-, 24-, 96-лункові;
- 3 – чашки Петрі різного діаметру;
- 4 – флакони з середовищем;
- 5 – спиртівка.

Переваги скляного посуду: багаторазове використання, стійкість до агресивних рідин. Недоліки: клітини гірше прикріплюються до поверхні

скляного посуду, ніж до пластикового, він крихкий. Пластиковий посуд надходить стерильним, він легкий, клітини до нього краще прикріплюються, має рівнішу поверхню. Недоліки: висока вартість.

Завдання 1. Ознайомитись з пластиковим посудом для роботи з культурою клітин

Пластиковий посуд одноразовий, стерильний. Для культивування використовуються культуральні флакони з різною робочою поверхнею (від 25см² до 500см²) та чашки Петрі з різним діаметром. Планшети, які найчастіше використовують, бувають трьох видів (плоскодонні, V-подібні, та круглдонні). Для посуду існують оптимальні норми висівання клітин та об'єму середовища для культивування.

Таблиця 1

Характеристика пластикового посуду, який використовується для культивування кліти

Тип флакону	Площа (см ²)	Об'єм (мл)	Об'єм середовища інкубації (мл)	Щільність висаджуваних клітин
Флакон	24	50	7	4,8x10 ⁵
флакон	25	70	7	5x10 ⁵
флакон	75	250	25	1,5x10 ⁶
флакон	83	260	30	1,6x10 ⁶
флакон	175	800	68	3,5x10 ⁶
Чашка 35x10	9,6		2,5	1,6x10 ⁵
Чашка 65x15	21		6,0	4,2x10 ⁵
Чашка 100x20	58		16,0	1,1x10 ⁶
96 лунковий планшет	0,32		0,2	6x10 ³
24 лунковий планшет	1,88		1,5	3,7x10 ⁴
12 лунковий планшет	3,83		2,0	7,6x10 ⁴
6 лунковий планшет	9,4		3,0	1,8x10 ⁵



Рис. 9. Пластиковий посуд:
а – центрифужні пробірки різного об’єму;
б – пробірки для кріоконсервації клітин;
в – мікропробірки Епандорф;
г – наконечники для мікродозаторів.



Рис. 10. Різновиди фільтрів
а – шприцеві фільтри;
б – використання шприцевих фільтрів;
в – мембранні фільтри;
г, д – використання мембранних фільтрів.

Серед іншого пластикового посуду – пробірки для кріоконсервації клітин, центрифужні пробірки різного об’єму, одноразові наконечники. Особливо, необхідними є мембранні фільтри (нітроцелюлозні з діаметромпор 0,22 мкн) та шприцеві фільтри, які розраховані на фільтрування невеликої кількості розчинів та буферів.

Завдання 2. Ознайомитись зі скляним посудом для роботи з культурою клітин та методами його підготовки до роботи

Скляний посуд для роботи з культурою клітин

Скляний посуд – це посуд різної ємності (колби, хімічні склянки, піпетки, пробірки), основне призначення якого приготування розчинів для культивування клітин. Цей посуд спеціально готується. Під час миття посуду обов'язково відбувається процедура замочування у спеціальних детергентах або у розчині Калію біхромату («хромка») (93г Калію біхромату в гумових рукавичках та у респіраторі, ватно-марлевій пов'язці добре розтирають у порошкоподібну масу в ступці, додають мінімально необхідний об'єм води та порційно розчиняють у 1 л сульфатної кислоти). Ополіскують посуд у проточній воді, потім – у дистильованій та бідистильованій воді. Наступний етап – кількогадинна обробка посуду за високої температури (160–180°C). Після цього посуд обгортають фольгою і стерилізують автоклавуванням. Підготовка скляних піпеток також містить процедуру ретельного миття; замочування і обробка детергентами відбувається у циліндрах для замочування піпеток. Важливим є ретельне ополіскування в проточній та дистильованій воді. Перед стерилізацією тупі кінці піпеток закорковують ватними тампонами, поміщають у спеціальні пенали або загортають кожну піпетку окремо в папір, який витримує стерилізацію за 180°C. За такої обробки посуд можна зберігати у шафі боксу впродовж тижня часу, після чого його слід автоклавувати повторно.

Стерильність посуду важлива для отримання достовірного результату роботи з культурами клітин. Посуд, що використовується для культивування клітин, не використовується для біохімічних та молекулярно-біологічних досліджень.

Послідовність процедури підготовки піпетки до роботи:

1) необхідно зняти кришку пеналу в полум'ї пальника (це робиться правою рукою). Кришка після прожарювання над полум'ям відставляється вправо.

Контрольні питання:

1. Суть методу культивування клітин.
2. Історія методу культивування клітин.
3. Практичне застосування методу культивування клітин.
4. Біобезпека в лабораторії для культивування клітин.
5. Основні правила техніки безпеки в лабораторії для культивування клітин.
6. Загальна структура лабораторії для культивування клітин.
7. Групи основного обладнання для роботи з культурами клітин.
8. Як створюється локальний стерильний простір?
9. Які основні принципи стерильної роботи?
10. Посуд для культивування клітин.
11. Способи миття скляного посуду, що використовується для стерильної роботи.
12. Яким чином слід підготувати посуд до стерилізації?

РОЗДІЛ 2: КУЛЬТУРИ КЛІТИН

2.1. Напрямки культивування клітин тварини

Організм тварин складається з різноманітних типів спеціалізованих диференційованих клітин. Так, наприклад, у людини (як і у більшості ссавців) ідентифіковано понад 200 типів клітин, які, у свою чергу, можуть бути розподілені на ще більшу кількість функціонально й морфологічно спеціалізованих типів клітин. За сучасними уявленнями вся різноманітність фенотипів соматичних спеціалізованих клітин базується на тому, що в кожному конкретному клітинному типі функціонує властивий лише цьому типу набір експресованих генів.

Відповідно до мети і завдань експериментальної роботи можна виділити два напрямки культивування клітин тварини:

- культури органів і тканин (органні культури);
- культури клітин.

Культура тканин тварин і людини – система підтримання впродовж більше, ніж 24 год. життєздатності ембріонів, зачатків органів, цілих органів, експлантів чи клітин, отриманих від тварин чи людини.

Органна культура – культура, в якій невеличкі фрагменти тканини або цілі ембріональні органи експлантуються зі збереженням тканинної архітекτονіки і розташовуються у живильному середовищі, куди окремі клітини спонтанно мігрують з фрагментів тканини зі збереженням мітотичних процесів у них. **Клітинна культура (культура клітин)** – культура початково роз'єднаних (дезагрегованих) клітин. Клітинна культура може бути отримана механічною диспергацією тканини або ферментативно як окремі поодинокі клітини чи їх кластери, які культивуються у середовищі як суспензійна або моношарова культури.

Вибір типу культури враховує, що *органна* культура зберігає міжклітинні взаємодії, підтримує гістологічну і біохімічну диференціацію клітин впродовж тривалого періоду часу і впродовж кількох днів може залишатися у зрівноваженому стані без видимої зміни проліферативного росту.

Культура клітин, навпаки, позбавлена структурної організації, не має характерної гістологічної архітекτονіки, а, пов'язані з нею, біохімічні ознаки не досягають зрівноваженого стану за відсутності оптимальних умов культивування. Однак, клітини у культурі добре розмножуються, швидко утворюючи моношар, що забезпечує отримання більшої кількості клітин та розподіл їх на ідентичні паралелі, які можуть бути збережені кріоконсервуванням. Клітинні культури можуть бути нормальними (отримані від клітин, тканин, органів організму) і пухлинними (отримані від пухлин).

Одна з головних властивостей нормальних клітинних культур тварин – обмежена тривалість їхнього існування. Це обмеження, на відміну від бактерій, зберігається навіть за умови постійного перенесення їх на свіже живильне середовище. Як правило, клітини тваринних ліній гинуть після 50-100 поділів. Зрозуміло, що чим молодший вік тканини, з якої отримано клітини для культивування в культурі, тим більшу кількість разів вони здатні ділитися до моменту загибелі. Отже, існує межа або ліміт Хейфліка (англ. *Hayflick limit*) – межа поділу соматичних клітин. Такий ліміт виявлено у культурах усіх цілком диференційованих клітин як людини, так й інших багатоклітинних організмів. Максимальне число подвоєнь залежить від типу клітин і ще більше від функціонального стану організму. Для більшості клітин людини межа Хейфліка дорівнює 52-ом подвоєнням. Межа Хейфліка пов'язана зі вкороченням теломер, ділянок ДНК на кінцях хромосом. Переважна більшість соматичних клітин не мають активної теломерази, тому при кожному подвоєнні клітини теломери вкорочуються, оскільки ДНК-полімераза не здатна реплікувати кінці молекули ДНК. Після певного числа подвоєнь теломери зникають зовсім, клітина зазвичай стає заблокованою на певній стадії клітинного циклу або запускає програму апоптозу – запрограмованої загибелі.

Перелік типів клітин, що вже введені в культуру, досить великий. Це елементи сполучної тканини людини (фіброласти), скелетні тканини (кістка й хрящі), скелетні, серцеві і гладенькі м'язи, епітеліальні тканини (печінка, легені, нирки й ін.), клітини нервової системи ендокринні

клітини (наднирники, гіпофіз, клітини острівців Лангерганса), меланоцити й різні пухлинні клітини. Нормальні тканини дають початок культурам з обмеженим часом життя, в той час як культури, отримані з пухлин, здатні проліферувати необмежено довгий час. Диференціація нормальних клітин у культурі звичайно супроводжується повним припиненням проліферації (збільшення кількості клітин шляхом мітозу). Диференціація – здатність набути ознак спеціалізованої клітини. У культурах пухлинних клітин можлива часткова диференціація зі збереженням здатності до проліферації.

2. 2. Класифікація культур клітин за способом культивування

Ріст клітин у вигляді моношару залежить від білків, які забезпечують прикріплення клітин до субстрату (наприклад, дна культурального флакона) та вказують напрямок їхнього переміщення. Таку культуру називають моношаровою чи **субстратзалежною**. **Суспензійна культура** – культура, в якій окремі клітини культивуються у завислому стані у рідкому середовищі.

Більшість нетрансформованих (нормальних) клітин ссавців можуть рости лише, утворюючи моношар на дні посудини або прикріплюючись до інших клітин чи носіїв. **Трансформація клітин у культурі** – незворотна (успадковується) зміна властивостей культивованих клітин внаслідок дії певного фактора (генетичний матеріал, хімічні агенти, опромінення). Зміна ростових властивостей у трансформованих клітин є однією з адаптивних особливостей, що дозволяє клітинам проліферувати в умовах, несприятливих для нетрансформованих клітин. У такий спосіб в умовах, які обмежують ріст нормальних клітин, трансформовані клітини будуть рости до більш високої щільності популяції, що, очевидно, буде пов'язано з їхньою зниженою потребою у факторах росту. **Моношар** – клітинний шар товщиною в одну клітину, що росте на поверхні субстрату. Клітини володіють значною адгезивною властивістю, вони швидко прикріплюються до дна чашок Петрі зі спеціальним адгезивним покриттям або у культуральних флаконах. Для нетрансформованих субстратзалежних клітин характерне явище контактного гальмування руху і поділу. **Контактне гальмування поділу клітин** –

пригнічення поділу клітин у моношаровій культурі після контакту між собою. Втрата здатності до контактного інгібування поділу клітин може бути пов'язана з їхньою злякисною трансформацією. **Контактне гальмування руху клітин** – зниження локомоторної активності клітин та затримка просування однією клітиною по поверхні іншої після контакту між собою. Втрата здатності до контактного інгібування руху клітин може бути пов'язана з їхньою злякисною трансформацією. Коли дві клітинни наближаються одна до одної, у зоні контакту припиняються специфічні рухи клітинної мембрани. Такі клітини не можуть рости одна над іншою. Деякий час клітини, що досягли моношару, зберігають життєздатність, перебуваючи у стані спокою. Якщо їх не пересіяти, вони загинуть.

Клітини, трансформовані вірусами, менш залежні від явища контактного гальмування, тому вони здатні досягати більш високої щільності. **Щільність клітин** – кількість клітин моношарової культури у розрахунку на одиницю площі дна культурального посуду (на 1 см²). Максимальна щільність клітин, доступна для нормальних клітин у культурі, сягає 10⁴/см²; щільність злякисних клітин на два порядки вища (10⁶/см²). Нормальні субстратзалежні клітини здатні до утворення моношару, ріст пухлинних клітин характеризується «безладдям», у результаті чого виникають багат шарові утворення. Трансформовані клітини ростуть до остаточного виснаження живильного середовища.

За інтенсивного зростання кількості клітин на одиницю об'єму середовища, відбувається швидке використання ними поживних речовин і накопичення метаболітів, внаслідок чого середовище виснажується, проліферація клітин припиняється і настає можливий некроз клітин. Тому середовище для культивування необхідно періодично змінювати, зазвичай на 3-4-й день, тобто приблизно 2 рази на тиждень залежно від темпів проліферативного росту. Однак, якщо культура росте слабо, краще залишити її на довший час без зміни середовища. Це пояснюється тим, що клітини синтезують і виділяють у середовище специфічні низькомолекулярні білки

цитокіни/ростові фактори, які здатні підтримувати проліферативний ріст клітин на високому рівні.

Переваги моношарових культур, що обумовлюють їх широке застосування:

- 1) секреція цільового екзогенного продукту субстратзалежними культурами є ефективнішою;
- 2) досить легко і швидко замінюється живильне середовище, легше співставити час і кількість середовища з періодом росту клітин та часом синтезу цільового продукту;
- 3) субстратзалежним може бути будь-який тип клітин.

Для проліферативного росту клітин **несприятливими умовам** є низька або надзвичайно висока щільність клітин на одиницю об'єму середовища для культивування, висока концентрація йонів Ca^{2+} , присутність у ньому індукторів диференціювання, а саме гормонів, каротиноїдів, деяких розчинників, таких як диметилсульфоксид. **Сприятливими умовами** для проліферації клітин є достатня концентрація клітин, оптимальне *pH* середовища, наявність у ньому ростових факторів, низька концентрація йонів Ca^{2+} і Mg^{2+} .

2.3. Типи культур тваринних клітин

Розрізняють основні 3 типи культур тваринних клітин:

Первинна культура (первинно-трипсинізована) – культура, джерелом клітин якої є органи, експлантати чи клітини, отримані безпосередньо з організму. Первинною називатиметься культура до першого пасажу. **Пасажування (субкультивування, пересів)** – перенесення культивованих ембріонів, органів, експлантів чи клітин з однієї посудини в іншу. **Кількість пасажів** – кількість перенесень культивованих ембріонів, органів, експлантів чи клітин з однієї посудини в іншу. Клітини первинної культури зазвичай гетерогенні й характеризуються низькою проліферацією. У них найбільш повно представлені типи клітин тієї тканини, від якої вони були отримані. Пасажування забезпечує можливість продовження існування культури, можливість клонування, дослідження й збереження властивостей клітин. При

цьому утворюються більш однорідні популяції, а також втрачаються спеціалізовані клітини. Після декількох пасажів лінія клітин або гине, або *трансформується* й стає *постійною клітинною лінією*. **Клітинна лінія** – клітинна культура, яка виникає з первинної культури після першого пасажу.

Диплоїдна культура – це культура, яку найчастіше отримують з ембріональних тканин, диплоїдний набір хромосом зберігається до 50-ти пасажів. Після цього диплоїдні культури здатні трансформуватись у перещеплювані, гетероплоїдні клітинні лінії. **Диплоїдна клітинна лінія** – лінія, у якої не менше 75% клітин з каріотипом, що характеризує нормальні клітини організму. Переваги диплоїдних клітин у стабільності їхніх біологічних і генетичних ознак, можливості створення банку клітин та попередньої атестації безпеки клітин, що робить їх перспективним субстратом для діагностики вірусних інфекцій і створення імунобіологічних препаратів.

Постійні клітинні культури (перещеплювані) – культури, які здатні витримати необмежену кількість пасажів (використовують також термін «безсмертна» клітинна культура). Перещеплювані культури – це трансформовані нормальні клітини або отримані з пухлини.

Виникнення постійної лінії клітин констатується за:

- ✓ морфологічними змінами (зменшення розміру клітин, зниження їх адгезивності, округлення, збільшення ядерно-цитоплазматичного відношення),
- ✓ збільшенням швидкості росту (час подвоєння клітин у культурі знижується з 36-48 до 12-36 годин),
- ✓ зниженням залежності від сироватки,
- ✓ збільшенням ефективності клонування,
- ✓ зниженням залежності від субстрату,
- ✓ збільшенням гетероплоїдності (хромосомні різниці між клітинами) і анеуплоїдності.

Нормальні клітини можуть трансформуватися в постійну лінію, не набуваючи можливості спричиняти пухлини у організмі.

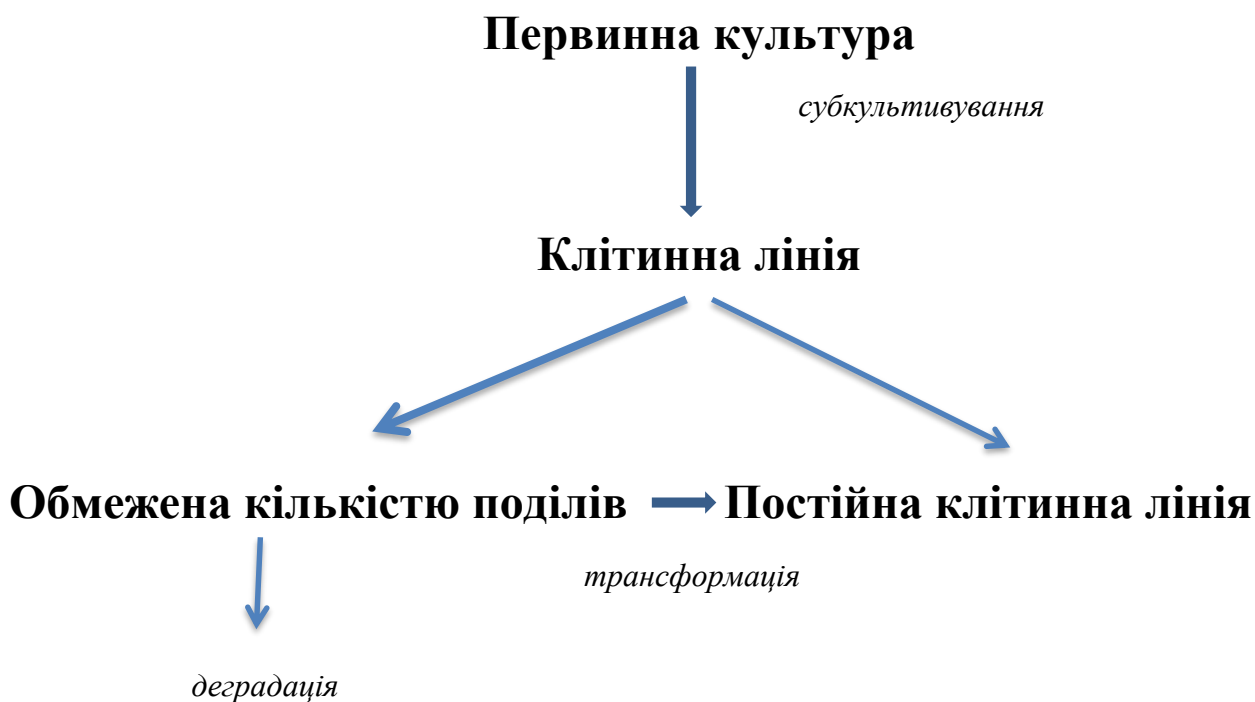


Рис. 13. Схема взаємозв'язку між лініями клітин

Таблиця 2

Класифікація культур тваринних клітин

Ознаки	Первинно-трипсинізовані культури клітин	Перещеплювані культури клітин	Диплоїдні культури клітин
Морфологія клітин порівняно з вихідною тканиною	Не відрізняється	Відрізняється	Відрізняється
Набір хромосом	Диплоїдний	Гетероплоїдний	Диплоїдний
Тривалість життя	1-3 пасажі	Необмежена	Обмежена 20-100 пасажами
Ріст в суспензії	Неможливий	Можливий	Неможливий
Ознаки малігнізації	Відсутні	Завжди є	Відсутні
Період генерації	3-7 днів	1-2 дні	1-15 днів
Контактне гальмування при вирощуванні субстратзалежних культур	Характерне	Нехарактерне	Характерне
Приклади	Культура клітин шкірно-м'язевого мішка курячих ембріонів	<i>Vero, MDA-MB-231, Jurkat, MCF</i>	Ембріональні лінії клітин, наприклад, <i>NIH 3T3, 293-T</i>

Обмежені за тривалістю життя клітинні лінії, наприклад, лінії диплоїдних клітин фібробластів, не є ідеальними об'єктами для промислового

виробництва. Трансформовані ж клітини не мають обмеженої тривалості життя, крім того, характеризуються більш високою щільністю популяції клітин, значними швидкостями росту й здатністю рости в суспензіях. Усе це обумовлює їхню перевагу в біотехнології для одержання різних продуктів.

Таблиця 3

Найбільш розповсюджені лінії клітин

Лінія клітин	Організм	Тканина	Морфологія
<i>NIH 3T3</i> <i>National Institutes of Health</i>	миша	сполучна	ембріональні фібробласти
<i>Hela</i> <i>Henrietta Lacks</i>	людина	рак шийки матки	епітелій
<i>Jurkat</i>	людина	T-клітинна лейкемія	білі клітини крові
<i>MCF-7</i> <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>	людина	молочна залоза, аденокарцинома	епітелій
<i>MDA-MB-231</i> <i>M.D. Anderson — Metastatic Breast</i>	людина	молочна залоза, аденокарцинома	епітелій
<i>Vero</i> <i>Vera Reno' / 'Vero'</i> (істина')	африканська зелена мавпочка	нирки,	епітелій
<i>293-T</i>	людина	нирка	ембріональна тканина
<i>Hepal1c7</i> <i>clone 7 of clone 1 hepatoma line 1</i>	миша	печінка	гепатома
<i>4T1</i>	миша	молочна залоза, аденокарцинома	епітелій

Культури **ембріональних тканин** характеризуються вищим рівнем виживання та активним проліферативним ростом порівняно з культурами відповідних постембріональних тканин. Ембріональні тканини характеризуються низьким рівнем спеціалізації та наявністю реплікуючих клітин-попередників або стовбурових клітин. Ще одною особливістю є те, що під час довготривалого культивування деяких клітин, наприклад, фетальних (ембріональних) фібробластів відбуваються кілька стадій диференціації, однак,

остання фаза дорослих фіброцитів, коли клітина припиняє мітотично ділитись і гине, відсутня. Таким чином, за ідеальних умов культивування, культура фетальних фібробластів може бути безсмертною.

Постембріональні тканини мають не такий швидкий проліферативний ріст через високий відсоток спеціалізованих клітин. Тому, наприклад, епітеліальні клітини потребують додаткового клітинного або синтетичного субстрату для активного мітотичного поділу. У разі відсутності такого вони швидко піддаються апоптозу і здатні утворювати лише суспензійні культури з коротким періодом життя.

В Україні існує Клітинний банк ліній тканин людини та тварин. Це найбільш вагома офіційна колекція клітинних матеріалів, призначена для зібрання, кріозбереження та розповсюдження культур клітин. Цей унікальний Банк налічує більше 30000 зразків типових та оригінальних ліній клітин з нормальних та пухлинних тканин людини та різних видів тварин: щур, миш, хом'як, мавпа, свиня, собака, бик, вівця, летюча миш, норка, риба, комахи та інших. Колекція клітинних ліній містить більше 200 найменувань, колекція трансплантованих пухлин налічує більше 30 штамів. Клітинний банк ліній тканин людини та тварин занесено до Державного реєстру об'єктів, що становлять національне надбання України. *ATCC American Type Culture Collection* – це американський банк біоматеріалів, який активно у Лейбніцькому інституті міститься німецька колекція мікроорганізмів і клітинних культур, заснована у 1969р. як національна колекція клітинних культур Німеччини.

Культури клітин клітинних банків, колекцій повинні бути паспортизованими, охарактеризованими, дослідженими за наступними ознаками.

ПАСПОРТ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

1. Назва клітинної культури.
2. Колекційний шифр.
3. Походження.
4. Запас таких ліній клітин.
5. Номер пасажу і дата кріоконсервації.
6. Умови кріоконсервації, режим збереження і життєздатність клітин після розморожування.
7. Особливості росту (спосіб культивування, культуральне середовище, концентрація під час висівання, метод зняття клітин з субстрату, температура культивування, інтервал пасажування).
8. Біологічні особливості (морфологія, каріологічна характеристика, молекулярно-генетичні методи дослідження).
9. Стерильність (відсутність контамінування).
10. Наявність вірусів.
11. Туморогенність.
12. Онкогенність.
13. Стабільність культури (кількість рекомендованих для виробництва пасажів).
14. Сфера застосування, чутливість до вірусів.

Лабораторна робота №3

Тема: Отримання первинної культури мишачих ембріональних фібробластів *MEF* (*Mouse Embryonic Fibroblast*)

(з навчально-методичного посібника Отримання клітинних культур і можливість їх використання в ембріональній біотехнології / Мадіч А.В., Шеремета В.І., Гевкан І.І., Сливчук Ю.І., Штапенко О.В., Федорова С.В.)

Мета: отримання первинної культури MEF.

Завдання:

1. Використовуючи теоретичний матеріал даного розділу, пригадайте визначення «первинна культура», виокремити ознаки первинних культур;
2. Вивчити та опрацювати метод отримання первинної культури мишачих ембріональних фібробластів *MEF* (*Mouse Embryonic Fibroblast*);
3. У висновку відтворити основні моменти виконаної роботи.

Фібробласти (від лат. *fibra* – волокно, *blastos* – зачаток) – це клітини мезенхімального походження, у суспензії вони округлої форми. Після швидкого прикріплення до адгезивних поверхонь клітини змінюють морфологію і набувають подовженої веретеноподібної форми з відростками та плоским й округлим ядром. Фібробласти синтезують та виділяють значну кількість біологічно активних речовин, серед яких активатор плазміногену, простагландини Е і Р, цитокіни, фактори росту фібробластів. Ці процеси відбуваються безперервно, продукти клітинного метаболізму накопичуються у міжклітинній речовині. Завдяки синтезу факторів росту фібробласти використовуються у клітинній інженерії як фідерні клітини під час культивування ембріонів. Такий спосіб культивування запобігає блокуванню розвитку ембріонів.

Обладнання, матеріали та реактиви

Вагітна самка миші; 70%-ий спирт (етанол), *DMEM* (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) – модифіковане середовище Ігла, *PBS* або *DPBS* (*Phosphate*

Buffer Saline) - фосфатно-сольовий буфер (Дюльбекко), *FCS (Fetal Calf Serum)* – фетальна сироватка теляти, стрептоміцин (1000мкг/мл) та пеніцилін (1000 од./мл), 0,05% трипсину з 0,02% *EDTA*; чашки Петрі – 3шт., культуральний флакон 25мл – 1шт.; CO₂-інкубатор, шейкер, центрифуга, скальпель, конічні центрифужні пробірки 50мл – 5шт., лід, серветки.

Завдання 1. Використовуючи теоретичний матеріал даного розділу, пригадайте визначення «первинна культура», виокремити ознаки первинних культур

Завдання 2. Вивчити та опрацювати метод отримання первинної культури мишачих ембріональних фібробластів *MEF (Mouse Embryonic Fibroblast)*

Хід роботи

1. Умертвіть самку миші шляхом декапітації, протріть 70%-им спиртом поверхню розрізу черевної частини тіла і стерильно видаліть спочатку матку, а потім ембріони. Вагітність миші триває 19–21 добу, а оптимальний термін для одержання клітинних культур ембріона миші 13-та доба. У цей час ембріон вже є достатньо великих розмірів і містить значну кількість недиференційованої мезенхіми. Саме з цієї тканини отримано більшість клітинних культур.

Усі операції з тваринами і ембріонами здійснюються поза межами боксу!!!

2. Розташуйте ембріони у великій, діаметром 10см, чашці Петрі, наповненій стерильним *PBS*. Скальпелем видаліть кінцівки, голову, внутрішні органи. Шкірно-м'язевий мішок ембріона відмийте у чистому середовищі від крові. Перенесіть одержаний матеріал у конічні (центрифужні) пробірки (50мл), що закорковуються, зі стерильним *PBS*. Відмийте біологічний матеріал, обережно злийте рідину, внесіть до колби стерильне *DMEM* без сироватки. Відмийте 3 або більше разів, злийте. Так Ви позбудетесь еритроцитів крові.
3. Відмитий матеріал помістіть у стерильний, охолоджений *PBS*. Посудину з ембріонами підтримуйте у холоді (на льоді). До розчину внесіть стрептоміцин (1000мкг/мл) та пеніцилін (1000од./мл).

Час зберігання матеріалу у такому стані повинен бути мінімальним.

4. Перенесіть ембріони у велику чашку Петрі без середовища. Використовуючи хірургічне лезо або тонкий стерильний скальпель, поріжте матеріал на максимально дрібні шматочки і перенесіть одержану масу у конічну пробірку на 50мл з кришкою, яка містить 10мл теплого (37°C) 0,05% трипсину з 0,02% *EDTA*.
Для цього заздалегідь приготуйте розчин трипсину потрібної концентрації. Зазвичай у лабораторіях використовують фабричний 0,25% розчин трипсину/*EDTA* у середовищі *DMEM*. Для одержання розчину потрібної концентрації розведіть цей розчин у 5 разів *PBS* (1 частина 0,25% трипсину/*EDTA* до 4-ох частин *PBS*) і нагрійте в інкубаторі до 37°C.
5. Інкубуйте пробірки впродовж 30хв, за 37°C, постійно струшуючи їх.
6. Внесіть ще 10мл такого ж теплого розчину трипсину з *EDTA* до пробірки і продовжуйте інкубацію наступні 30хв. Внесіть ще 10мл, до кінцевого об'єму 30мл, інкубуйте наступні 30 хвилин.

7. Перелийте одержану клітинну суспензію у конічну (50мл) пробірку з корком, до якої попередньо внесіть 3мл фетальної сироватки (*FBS*). Таким чином блокуєте дію трипсину.
- Промийте попередню пробірку від залишків клітин 2 рази 1мл *DMEM* з 10% *FBS* і внесіть це до пробірки з клітинною суспензією.
8. Центрифугуйте пробірку за 250об./хв впродовж 5хв, осад клітин ресуспендуйте у 50мл свіжого *DMEM* з 10% *FBS*.
9. Злийте осад.
- 10.Внесіть суспензію клітин у 25мл культуральний флакон з 5мл *DMEM* + 10% *FBS*. Кількість висіяних клітин повинна бути $2,5 \times 10^6$, з розрахунку концентрації $0,5 \times 10^6$ клітин в 1мл середовища. Інкубуйте у CO_2 -інкубаторі за 37°C .
- 11.Наступного дня замініть середовище на свіже і дозвольте клітинам рости, доки вони не утворять моношар. Ви зможете виявити багато клітинних типів, однак, лише фібробласти будуть живою субкультурою.

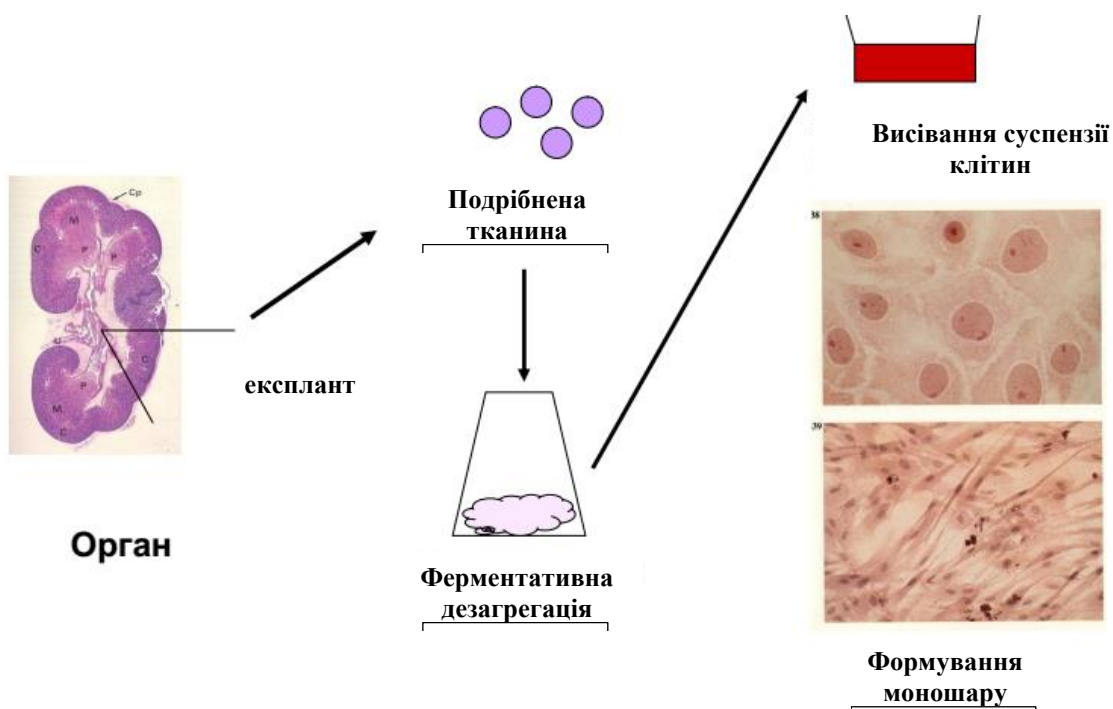


Рис. 14. Схема одержання первинної культури

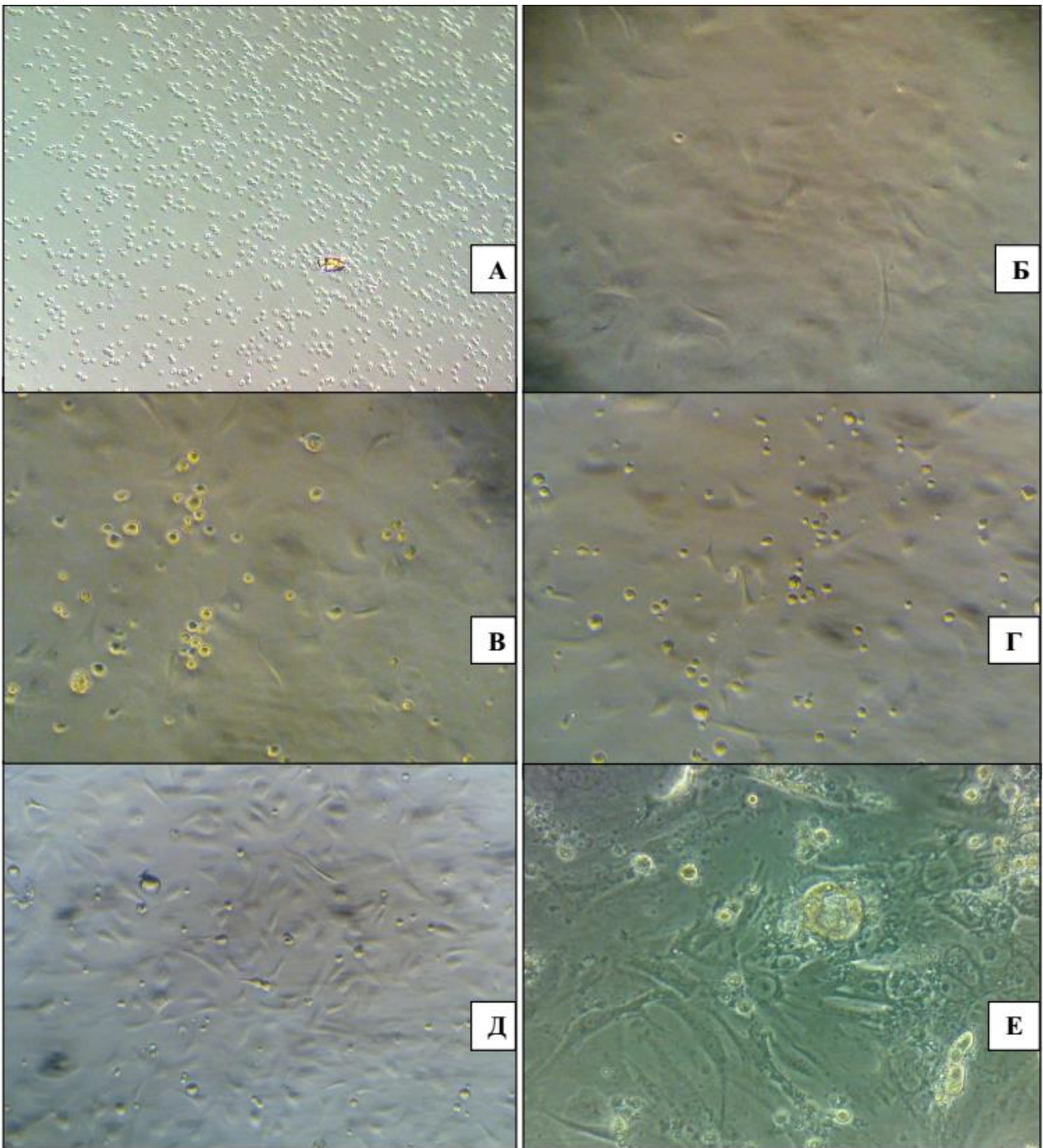


Рис. 15. Візуалізація процесу одержання первинної культури фібробластів. А. Клітини ембріональних фібробластів миші у суспензії. Б. Фібробластні клітини починають прикріплюватися до поверхні пластикового флакону завдяки властивим їм високим адгезивним особливостям. В, Г. Внаслідок прикріплення клітин фібробластів до дна вони набувають веретеновидної форми, ядро стає плескатим. Д. Через 48 годин культивування первинна культура клітин стає більш багаточисельною, а клітини добре видимими у контрастному світлі мікроскопа (10x10). Е. Субкультура ембріональних фібробластів швидко утворює моношар, який може бути використаний для росту інших клітинних популяцій, тому клітини ембріональних фібробластів ще називають фідерними клітинами (*feeder cells* – клітини-годовниці). (Авторські фото)

Висновок

Контрольні питання:

1. Що лежить в основі різноманітності фенотипів соматичних спеціалізованих клітин?
2. Чим відрізняються органна і суспензійна культури клітин?
3. Які тканини можуть бути джерелом клітинної культури та їх відмінності?
4. Класифікація культур клітин, характеристика різних типів культур.
5. Які клітинні культури називають суспензійними?
6. Які клітинні культури називають субстратзалежними?
7. Які клітинні культури називають постійними, перещеплюваними?
8. Трансформація та диференціація клітин.
9. Клітинні банки.
10. Паспорт культури.

РОЗДІЛ 3. КУЛЬТУРАЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ

3.1 Загальна характеристика культурального середовища

Всі живі клітини потребують екзогенних поживних речовин. Такі речовини містяться у культуральному середовищі. Важливим компонентом середовища є вода, у ній поживні речовини утворюють істинні (мінеральні солі, цукри, амінокислоти, карбонові кислоти, спирти, альдегіди) чи колоїдні (білки, ліпіди, неорганічні сполуки) розчини. У великих концентраціях клітині необхідні: Карбон, Нітроген, Оксиген, Гідроген, Фосфор; макроелементи: Сульфур, Калій, Кальцій, Натрій, Хлор, Магній. Необхідні мікроелементи: Манган, Нікель, Кобальт, Цинк, Купрум, Силіцій, Молібден, Бор, Ванадій. Суміш амінокислот у середовищі – джерело Нітрогену, пурини та піримідини – для синтезу білків і нуклеїнових кислот, глюкоза – джерело Карбону та енергії, вітаміни і мінеральні солі – для підтримання необхідного осмотичного тиску та *pH*. Середовище повинне містити антибіотики для пригнічення росту бактерій та 5–10% сироватки. Остання відіграє роль фізіологічного буферу, є джерелом поживних речовин, бере участь у процесах адгезії, росту та розмноження клітин, сприяє зв'язуванню та детоксикації пірогенів, токсинів, а також продуктів метаболізму клітини.

Культуральне середовище забезпечує життєздатність, ріст, розвиток біооб'єктів. Перш, ніж розпочати роботу з культурою клітини, необхідно підібрати живильне середовище. Живильні середовища, які використовують у роботі з культурами клітин, повинні забезпечувати їх необхідними енергетичними та пластичними речовинами і бути максимально наближеними до природного клітинного оточення. Колись для культивування клітин використовували природні середовища на основі тканинних екстрактів та природних рідин організму, таких як екстракт курячого ембріону, сироватка, лімфа. Метод культивування все більше отримує широкого застосування, збільшується потреба у середовищах. Це призвело до впровадження серійного виробництва середовищ з чітко встановленим хімічним складом, заснованим на біохімічному аналізі природних рідин організму. Культуральне середовище

повинно забезпечувати відтворення умов *in vivo*, забезпечувати клітини поживними і гормональними факторами, що сприяє виживанню клітин, проліферації й диференціації.

Основою поживних середовищ є **сольові розчини**. Мінеральні компоненти у цих розчинах підібрані так, що розчин виконує буферні функції, підтримуючи постійний кислотно-лужний баланс середовища під час культивування. Сталість *pH* середовища є одною з головних умов культивування. Для роботи з клітинами зовні CO₂-інкубатора, де *pH* підтримувати важче, використовують альтернативні буферні системи. Найбільш розповсюдженим буфером є *HEPES* 4-(2-оксиетил)1-піперазинетансульфонова кислота. *HEPES* легко розчиняється у воді, не зв'язує двовалентні катіони, не цитотоксичний до концентрації 0,05 М. Застосовується у концентраціях 0,01–0,03М. Для визначення *pH* середовища використовують *pH*-метр або звичайний кольоровий індиктор. Як індикатор *pH* середовища слугує барвник **феноловий червоний**, який забарвлює рідину у червоно-оранжевий колір. При зміні *pH* (окиснення метаболітами клітини) змінюється колір від червоно-оранжевого до оранжевого – ознака потреби змінити середовище. **Оптимум *pH* для більшості культур ссавців у межах 7,2–7,4.**

Мінімальне середовище *Ігла (MEM)* – одне з перших розроблених середовищ, потребує додаткового внесення сироватки, білкових гідролізатів та ембріональних екстрактів. Це середовище використовується для культивування більшості культур, зокрема *L929*, *HeLa*. На його основі незамінними для росту клітин визначено 27 хімічних сполук. Розроблено ряд модифікованих середовищ (наприклад, для лімфобластних ліній клітин було розроблено середовище *RPMI 1640*), або модифікація середовищ для специфічних умов культивування (середовище Лейбовиця *L15* було розроблено для культивування клітин за відсутності CO₂ та NaHCO₃. Нормальні клітини із специфічними функціями не розмножуються на стандартних середовищах.



Рис. 16. Рідкі середовища для культивування клітин (Sigma, США)

На сьогодні для культивування клітин використовують комерційні рідкі середовища.

3.2. Різновиди середовищ

Середовища *Ігла MEM* (*minimal essential medium*) і *BME* (*basal medium, Eagle*). Частіше використовується *MEM*. Воно містить мінімальний набір компонентів: мінеральні речовини, амінокислоти (13 незамінних), 6 водорозчинних вітамінів, холін й інозит. *MEM* використовують для культивування різних типів моношарового культивування клітин у присутності сироватки. *MEM* використовується тільки із сироваткою, тому що у ньому відсутні біотин, вітамін B₁₂, йони Феруму та мікроелементи. Основою є розчин Ерла. У репродуктивній біотехнології *MEM* використовують на початкових етапах отримання первинних культур, вимивання ембріонів та промивання тканин. *MEM* не для довготривалого культивування, оскільки не містить потрібних компонентів, які сприяють адгезії клітин.

Найчастіше використовують *модифіковане середовище Ігла (DMEM)*. Перед використанням до середовища вносять антибіотики, наприклад, гентаміцин і сироватку. *DMEM* використовується для культивування клітин різних типів, трансформованих, нетрансформованих клітин і гібридом. Це середовище, як і багато інших, можна придбати рідким або порошкоподібним. Розчинником для порошкоподібної форми є тридистильована вода, вільна від ендотоксинів. Ендотоксини – це ліпополісахаридні складники клітинної стінки грам-негативних бактерій, які навіть у дуже незначних концентраціях впливають на проліферативний ріст клітин, особливо ембріональних. Для одержання і культивування ембріональних стовбурових клітин у середовище вносять α -глутамін, незамінні амінокислоти та β -меркаптоетанол.

Середовище 199 розроблено у 1950 році для культивування фрагментів серця з ембріона курчати. Для середовища характерний

широкий спектр поживних речовин і їх невисока концентрація.

Таблиця 4

Вміст компонентів (мМ) в середовищах культивування MEM, DMEM, RPMI-1640, F-12

Компоненти (1)	MEM (2)	DMEM (3)	RPMI-1640 (4)	F-12 (5)
Амінокислоти				
L-аргінін				1,0 x10 ⁻⁴
L-аспарагін	6,0x10 ⁻⁴	4,0 x10 ⁻⁴	1,1 x10 ⁻³	1,0 x10 ⁻³
L-аспарагінова кислота			1,5 x10 ⁻⁴	1,0 x10 ⁻⁴
L-цистеїн				2,0 x10 ⁻⁴
L-цистин	1,0 x10 ⁻⁴	2,0 x10 ⁻⁴	1,1 x10 ⁻⁴	
L-глутамінова кислота			1,4 x10 ⁻⁴	1,0 x10 ⁻⁴
L-глутамін	2,0 x10 ⁻³	4,0 x10 ⁻³	2,1 x10 ⁻³	1,0 x10 ⁻³
Гліцин		4,0 x10 ⁻⁴	1,3 x10 ⁻⁴	1,0 x10 ⁻⁴
L-гістидин	2,0 x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻⁴	9,7 x10 ⁻⁵	1,0 x10 ⁻⁴
L-оксіпролін			1,5 x10 ⁻⁴	
L-ізолейцин	4,0 x10 ⁻⁴	8,0 x10 ⁻⁴	3,8 x10 ⁻⁴	1,0 x10 ⁻⁵
L-лейцин	4,0 x10 ⁻⁴	8,0 x10 ⁻⁴	3,8 x10 ⁻⁴	1,0 x10 ⁻⁴
L-лізин HCl	4,0 x10 ⁻⁴	8,0 x10 ⁻⁴	2,2 x10 ⁻⁴	2,0 x10 ⁻⁴
L-метіонін	1,0 x10 ⁻⁴	2,0 x10 ⁻⁴	1,0 x10 ⁻⁴	3,0 x10 ⁻⁵
L-фенілаланін	2,0 x10 ⁻⁴	4,0 x10 ⁻⁴	9,1 x10 ⁻⁵	3,0 x10 ⁻⁵
L-пролін			1,7 x10 ⁻⁴	3,0 x10 ⁻⁴
L-серин		4,0 x10 ⁻⁴	2,9 x10 ⁻⁴	1,0 x10 ⁻⁴
L-треонин	4,0 x10 ⁻⁴	8,0 x10 ⁻⁴	1,7 x10 ⁻⁴	1,0 x10 ⁻⁵
L-триптофан	4,9 x10 ⁻⁵	7,8 x10 ⁻⁵	2,5 x10 ⁻⁵	1,0 x10 ⁻⁵
L-тирозин	2,0 x10 ⁻⁴	4,0 x10 ⁻⁴	1,1 x10 ⁻⁴	3,0 x10 ⁻⁵
L-валін	4,0 x10 ⁻⁴	8,0 x10 ⁻⁴	1,7 x10 ⁻⁴	1,0 x10 ⁻⁵
Вітаміни				
P-амінобензойна кислота			7,3 x10 ⁻⁶	

Продовження таблиці 4.

1	2	3	4	5
Біотин			$8,2 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-8}$
Холін хлорид	$7,1 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$
Фолієва кислота	$2,3 \times 10^{-6}$	$9,1 \times 10^{-6}$	$2,3 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-6}$
Міо-інозитол	$1,1 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$
Нікотинамід	$8,2 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-5}$	$8,2 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-7}$
D-пантотенат Са	$4,2 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$
Пиридоксаль НСl	$4,9 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-5}$		$3,0 \times 10^{-7}$
Пиридоксін НСl			$4,9 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-7}$
Рибофлавін	$2,7 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$5,3 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-7}$
Тіамін	$3,0 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$		$1,0 \times 10^{-6}$
Вітамін В12			$3,7 \times 10^{-9}$	$1,0 \times 10^{-6}$
Антиоксиданти				
Глутатіон			$3,0 \times 10^{-6}$	
Неорганічні солі				
CaCl ₂	$1,8 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$		$3,0 \times 10^{-4}$
KCl	$5,3 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-4}$
MgSO ₄	$8,1 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-4}$	
NaCl	$1,2 \times 10^{-1}$	$1,1 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,3 \times 10^{-1}$
NaHCO ₃	$2,6 \times 10^{-2}$	$4,4 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$
NaH ₂ PO ₄	$1,0 \times 10^{-3}$	$9,1 \times 10^{-4}$		
Na ₂ HPO ₄			$5,6 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$
Мікроелементи				
CuSO ₄ • 5H ₂ O				$1,6 \times 10^{-8}$
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O		$2,5 \times 10^{-7}$		
FeSO ₄ • 7H ₂ O				$3,0 \times 10^{-6}$
ZnSO ₄ • 7H ₂ O				$3,0 \times 10^{-6}$

Продовження таблиці 4.

1	2	3	4	5
Антиоксиданти				
Глутатіон			$3,0 \times 10^{-6}$	
Неорганічні солі				
CaCl ₂	$1,8 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$		$3,0 \times 10^{-4}$
KCl	$5,3 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-4}$
MgSO ₄	$8,1 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-4}$	
NaCl	$1,2 \times 10^{-1}$	$1,1 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,3 \times 10^{-1}$
NaHCO ₃	$2,6 \times 10^{-2}$	$4,4 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$
NaH ₂ PO ₄	$1,0 \times 10^{-3}$	$9,1 \times 10^{-4}$		
Na ₂ HPO ₄			$5,6 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$
Мікроелементи				
CuSO ₄ • 5H ₂ O				$1,6 \times 10^{-8}$
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O		$2,5 \times 10^{-7}$		
FeSO ₄ • 7H ₂ O				$3,0 \times 10^{-6}$
ZnSO ₄ • 7H ₂ O				$3,0 \times 10^{-6}$
Основи, нуклеозиди та ін.				
Гіпоксантин				$3,0 \times 10^{-5}$
Тимідин				$3,0 \times 10^{-6}$
D-глюкоза	$5,6 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$
Піруват натрію	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$		$1,0 \times 10^{-3}$
Лінолева кислота		$3,0 \times 10^{-7}$		
Ліпоева кислота				$1,0 \times 10^{-6}$
Феноловий червоний	$2,7 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-5}$
Путресцин				$1,0 \times 10^{-6}$
CO ₂	5%	10%	5%	2%

Узагальнена характеристика деяких культуральних середовищ

Назва	Характеристика та застосування
Середовище 199	Містить понад 60 компонентів, серед них: 20 амінокислот, 16 вітамінів, коферментів, азотисті основи, мінеральні солі, глюкоза.
Середовище Ігла MEM	Містить амінокислоти, вітаміни, мінеральні солі, глюкозу та інші компоненти. Не для довготривалого культивування, оскільки не містить потрібних компонентів, які сприяють адгезії клітин.
Гідролізат лактоальбуміну 0,5%	Природне середовище, яке містить продукти ферментації лактальбуміну і стимулятори росту.
Примітка	Середовище 199, Ігла, гідролізат лактальбуміну готуються на збалансованих сольових розчинах. Названі середовища можуть бути використані як середовища росту (СР) та як середовища підтримки (СП). Для одержання СР слід внести антибіотики (до концентрації 100 ОД пеніциліну та 100 мкг стрептоміцину на 1 мл) та 5-15% сироватки, що забезпечує ріст та розмноження клітин, запобігає бактеріальній контамінації. Для одержання СП вносять антибіотики та не більше 2% сироватки, що забезпечує лише виживання клітин в сформованому моношарі.

З певною метою створено середовища, у яких відсутні деякі важливі компоненти. Наприклад, вивчаючи біосинтез білків, можна використати середовища, позбавлені метіоніну чи лейцину з метою застосування радіоактивної мітки (помітити ту чи іншу сполуку), яка входить до складу клітинних білків.

3.3. Сироватка як компонент культурального середовища

Сироватка – надзвичайно важливий компонент поживного середовища, рістстимулюючий чинник. Використовують фетальну (ембріональну) (*FCS* або *FBS*) сироватку великої рогатої худоби у кількості від 5 до 20%. Аналогом сироватки є сироватковий альбумін великої рогатої худоби (*BSA*). Сироватка є складною сумішшю дрібних і великих молекул, здатних індукувати або гальмувати ріст клітин. Основні функції сироватки: забезпечення культури гормональними факторами, що стимулюють ріст клітин і їхні функції; забезпечення факторами прикріплення й розпластування клітин; забезпечення транспортними білками, що переносять гормони, мінеральні речовини, ліпіди. Білки сироватки, які безпосередньо і специфічно беруть участь у стимуляції клітинного поділу, називаються **факторами росту**. Більшість факторів росту присутні у сироватці у концентрації нг/мл і менше. Деякі з цих чинників специфічні для клітин на певній стадії

диференціювання, дія інших не обмежується типом клітин. Один тип клітин може бути стимульований різними ростовими факторами. Наприклад, фібробласти проліферують у відповідь на фактори росту фібробластів, епідермісу, тромбоцитів й соматомедину. Всі ці речовини є мітогенами (стимулюють мітоз). Важливим фактором росту для всіх типів клітин є гормон інсулін. З інших гормонів найчастіше застосовують глюкокортикоїди (гідрокортизон, дексаметазон), стероїди (естрадіол, тестостерон, прогестерон) і гормони щитовидної залози (трийодтиронін). Гормони стимулюють або пригнічують ріст залежно від типу клітин і їх щільності. Глюкокортикоїди, наприклад, впливають на проліферацію клітин, змінюючи їх чутливість до інших факторів росту. Сироватковий альбумін є транспортним білком для вітамінів, амінокислот, ліпідів. Транспортування Феруму забезпечує трансферин. До факторів прикріплення й розпластування клітин належать колаген і фібронектин. Останніми роками розроблено середовища без сироватки. Найчастіше ці середовища вузько спеціалізовані, тобто призначені для певного типу клітин. У такому випадку до базового середовища вносять інсулін, трансферин, гідрокортизон або його аналог дексаметазон.

Безсироваткові середовища мають певні переваги:

- відтворюваність результатів досліду краща внаслідок більшої стабільності складу середовища;
- зниження ризику контамінації культури вірусами, грибами, мікоплазмами;
- легше очистити продукти клітинного метаболізму;
- знижується вплив додаткових білків на результати біологічних досліджень;
- відсутність цитотоксичності сироватки.

Сироватка крові є найдорожчим компонентом середовища. Вона потребує особливого зберігання та контролю. Зберігають її у замороженому стані за -20°C . Перед використанням варто переконатись у її здатності підтримувати ріст клітин та відсутності цитотоксичності.

Компоненти ембріональної телячої сироватки

Компоненти (1)	Діапазон концентрацій (2)
Білки та поліпептиди	40-80 мг/мл
Альбумін	20-50 мг/мл
Фетуїн	10-20 мг/мл
Фібронектин	1-10 мг/мл
Глобуліни	1-15 мг/мл
Інгібітор протеаз: α_1 -antitrypsin, α_2 -macroglobulin	0,5-2,5 мг/мл
Трансферин	2-4 мг/мл
Фактори росту	
EGF, PDGF, IGF-I, IGF -II, FGF, IL-1, IL-6	1-100 нг/мл
Амінокислоти	0,01-1,0 мкМ
Ліпіди	2,0-10,0 мг/мл
Холестерол	10 мкМ
Жирні кислоти	0,1-1,0 мкМ
Лінолева кислота	0,01-0,1 мкМ
Фосфоліпіди	0,7-3,0 мг/мл
Цукориди	1,0-2,0 мг/мл
Глюкоза	0,6-1,2 мг/мл
Гексозамін	0,6 – 1,2 мг/мл
Лактат	0,5 -2,0 мг/мл
Піровиноградна кислота	2,0-10,0 мкг/мл
Поліаміни:	
Путресцин, спермідин	0,1-1,0 мкМ
Сечовина	170-300 мкг/мл
Неорганічні сполуки:	0,14-0,16 мМ

Продовження таблиці 6.

1	2
Кальцій	4-7 мМ
Хлориди	100 мкМ
Залізо	10-50 мкМ
Калій	5-15 мМ
Фосфати	2-5 мМ
Селен	0,01 мкМ
Натрій	135-155 мМ
Цинк	0,1-1,0 мкМ
Гормони:	0,1-200 нМ
Гідрокортизон	10-200 нМ
Інсулін	1-100 нг/мл
Трийодтиронін	20 нМ
Тироксин	100 нМ
Вітаміни:	10 нг–10 мкг/мл
Вітамін А	10-100 нг/мл
Фолат	5-10 нг/мл

Таблиця 7

Функції компонентів сироватки крові

Компонент	Функції
Альбумін	Транспортує ліпіди, гормони, мінеральні речовини. Забезпечує осмотичний тиск та буферну ємність сироватки
Фетуїн, фібронектин	Прикріплення клітин до субстрату
α -2 макроглобулін	Пригнічує активність трипсину
Трансферин	Зв'язує та транспортує йони Феруму
Кортизол	Індукує проліферацію, прикріплення клітин до субстрату
Естрогени, андрогени, поліаміни	Впливають на проліферацію клітин
Тироксин, трийодтиронін	Вплив на дихання, енергетичний метаболізм, ріст, диференціацію
Інсулін	Накопичення глюкози
Фактори росту тромбоцитів, фібробластів, ендотеліальних клітин, епідермальний фактор росту	Мітогени – стимулюють ріст, проліферацію
Глутатіон	Індукує окисно-відновні реакції
Лінолева кислота, холестерин	Участь у біосинтезі клітинних мембран
Простогландини	Участь у мембранних процесах
Амінокислоти, пірвіноградна кислота	Різноманітні клітинні функції
Йони Феруму, Цинку Купруму, Мангану, Кобальту, Селену, Ванадію	Впливають на різні клітинні функції, активізують ензими

Лабораторна робота №4

Тема: Приготування культурального середовища *DMEM* у модифікації Дюльбекко для культивування пухлинних клітин

Мета: ознайомитись з формами випуску розчинів, які використовуються для культивування клітин, способом приготування середовищ.

Завдання:

1. Приготувати розчин середовища *DMEM* без сироватки.
2. Приготувати розчин аптечного гентаміцину.
3. Приготувати фетальну сироватку.

Не всі необхідні для культивування клітин компоненти присутні у живильному середовищі одразу. Наприклад, глютамін, Натрію бікарбонат, глюкоза та сироватка, розчини антибіотиків, інші рістстимулюючі чинники вносять за потреби. Оскільки термін зберігання готових рідких середовищ є обмеженим, вартість більшою, частіше використовують сухі середовища. Для приготування середовища наважку порошку розчиняють у тридистильованій воді, стерилізують, за потреби вносять інші стерильні розчини.

Слід запам'ятати, що стерилізація середовищ, сироваток та розчинів протеаз проводиться лише ультрафільтрацією через нітроцелюлозні мембранні, шприцеві фільтри.

Обладнання, матеріали та реактиви

Середовище *DMEM* (*Sigma-Alorich*) у модифікації Дюльбекко, тридистильована та бідистильована вода, Натрію бікарбонат, 1н Натрію гідроксид, 1н хлоридна кислота, гентаміцин, фетальна сироватка; магнітна мішалка, ваги, шприцевий фільтр, водяна баня, *pH*-метр; колба (1000мл), мірні пробірки (3шт.) мікродозатори з наконечниками, мірний циліндр.

Завдання 1. Приготувати розчин середовища *DMEM*

Хід роботи

1. Зважте 13,6г порошкоподібного середовища *DMEM* (*Sigma-Alorich*) у модифікації Дюльбекко;

Лабораторна робота №5

Тема: Приготування розчинів, які використовуються під час методу культивування клітин

Мета: проготувати розчини, які використовуватимуться при культивуванні клітин у наступних роботах.

Завдання:

1. Приготування фосфатно-сольового розчину Дюльбекко.
2. Приготування збалансованого сольового розчину Ерла.
3. Приготування збалансованого сольового розчину Хенкса.
4. Приготування розчину трипсину/ *EDTA*.

Обладнання, матеріали та реактиви

1. KCl, KH_2PO_4 , NaCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, дистильована вода, 1н NaOH, 1н HCl.
2. CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, NaHCO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, D-глюкоза, феноловий червоний; 1н NaOH, 1н HCl.
3. CaCl_2 , KCl, KH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, NaHCO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, D-глюкоза, феноловий червоний; 1н NaOH, 1н HCl.
4. Трипсин, *EDTA*, *PBS*.

Ваги, магнітна мішалка, *pH*-метр, автоклав; колби (1000мл, 5шт.), мембранний, шприцевий фільтри.

Під час роботи з клітинними культурами завжди варто мати у розпорядженні кілька сольових середовищ, які використовуються для промивання клітин. Найпоширенішим є розчин Хенкса, розчин трипсин/*EDTA*, фосфатно-сольовий розчин Дюльбекко (*PBS*).

Завдання 1. Приготування фосфатно-сольового розчину Дюльбекко

Хід роботи

1. Розгляньте *таблицю 8*, відважте зазначені кількості реактивів

Таблиця 8.

**Склад збалансованого фосфатно-сольового розчину Дюльбекко (PBS
Дюльбекко, рН 7,2) без Ca²⁺ та Mg²⁺**

Компоненти	М.м.	г/л	мМ
KCl	74,55	0,2	2,68
KH ₂ PO ₄	136,1	0,2	1,47
NaCl	58,44	8	136,9
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	138	2,2	8,06

2. Відважені кількості речовин розчиніть у 1000мл води, скориставшись магнітною мішалкою;
3. Доведіть рН до 7,2–7,5 1н Натрію гідроксидом і 1н хлоридною кислотою. рН контролюйте рН-метром;
4. Стерилізуйте автоклавуванням (1атм, 20хв).

Завдання 2. Приготування збалансованого сольового розчину Ерла

Хід роботи

1. Розгляньте *таблицю 9*, відважте зазначені кількості реактивів

Таблиця 9

Склад збалансованого сольового розчину Ерла (BBS Ерла)

Компоненти	М.м.	г/л	мМ
CaCl ₂ (безводний)	111	0,02	0,18
KCl	74,55	0,4	5,37
MgSO ₄ • 7H ₂ O	246,5	0,2	0,81
NaCl	58,44	6,68	114,3
NaHCO ₃	84,01	2,2	26,19
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	138	0,14	1,01
D-глюкоза	180,2	1	5,55
Феноловий червоний	354,4	0,01	0,03
Газове середовище	5% CO ₂		

2. Відважені кількості речовин розчиніть у 1000мл води, скориставшись магнітною мішалкою;
3. Доведіть рН до 7,2–7,5 1н Натрію гідроксидом і 1н хлоридною кислотою. рН контролюйте рН-метром;
4. Стерилізуйте за допомогою шприцевого фільтра.

Завдання 3. Приготування збалансованого сольового розчину Хенкса

Хід роботи

1. Розгляньте *таблицю 10*, відважте зазначені кількості реактивів

Таблиця 10

Склад збалансованого сольового розчину Хенкса (BBS Хенкса)

Компоненти	М.м.	г/л	мМ
CaCl ₂ (безводний)	111	0,14	1,3
KCl	74,55	0,4	5,37
KH ₂ PO ₄	136,1	0,06	0,4
MgCl ₂ • 6H ₂ O	203,3	0,1	0,5
MgSO ₄ • 7H ₂ O	246,5	0,1	0,4
NaCl	58,44	8	136,9
NaHCO ₃	84,01	0,35	4,2
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	268,1	0,09	0,3
D-глюкоза	180,2	1	5,55
Феноловий червоний	354,4	0,01	0,03

2. Відважені кількості речовин розчиніть у 1000мл води, скориставшись магнітною мішалкою;
3. Доведіть *pH* до 6,5 1н гідроксидом Натрію і 1н хлоридною кислотою. *pH* контролюйте *pH*-метром;
4. Автоклавувати при *pH* 6,5 (1 атм, 20 хв). Перед використанням довести *pH* до 7,4 стерильним 1н гідроксидом Натрію.

Завдання 4. Приготування розчину трипсину/ EDTA

Стерильний забуферений фізіологічний розчин використовують також для приготування розчинів антибіотиків та трипсину, останній використовується під час пересіву, для дезінтеграції адгезивних клітин від субстрату.

Хід роботи

1. Приготуйте розчин трипсину. 2,5г трипсину (Difco, 1:250) або 0,1г тричі перекристалізованого трипсину (Sigma) розчиняють у 1000мл забуференого фізіологічного розчину, стерилізують мембранним фільтруванням, розливають на аліквоти, зручні для одноразового

використання, зберігають замороженим за -20°C . Перед використання розчин трипсину підігрівають до $20\text{--}37^{\circ}\text{C}$.

2. Приготуйте розчин *EDTA* на забуференому фізіологічному розчині: *EDTA* (динатрієва сіль етилендіамінтетраацетатної кислоти) – 0,2г; забуферений фізіологічний розчин, що не містить Ca^{2+} та Mg^{2+} – до 1000мл;
3. стерилізуйте автоклавуванням (1 атм, 20 хв).
4. розчин трипсину/ *EDTA* приготуйте у співвідношенні 1:1 (трипсин: *EDTA*).

Висновок (мета використання приготованих розчинів)

Контрольні питання:

1. Що називають культуральним середовищем, різновиди.
2. Назвіть найбільш поширені модифіковані середовища.
3. Компоненти культуральних середовищ.
4. Назвіть сольові розчини?
5. Для чого використовують трипсин, способи трипсинізації?
6. З якою метою використовують ембріональну сироватку крові?
7. Які компоненти стимулюють ріст клітинних популяцій?
8. Яким чином готують середовища із сухих наважок?
9. Методи стерилізації розчинів для культивування.
10. Вимоги до води, яка використовується під час культивування клітин?

РОЗДІЛ 4. КЛІТИННИЙ ЦИКЛ, ФАЗИ РОСТУ КЛІТИН У КУЛЬТУРІ

4.1. Клітинний цикл

Розвиток клітин відбувається у кілька фаз, які характеризуються чітко визначеними морфологічними і біохімічними процесами. Послідовність цих процесів називають **клітинним циклом**. Клітинний цикл складається з інтерфази і мітозу. Інтерфаза складає 90% часу клітинного циклу. Розізняють гетеросинтетичну інтерфазу, у якій клітина росте, диференціюється, виконує певну функцію, а також автосинтетичну, під час якої відбувається підготовка клітини до наступного поділу. Кожен клітинний цикл розпочинається фазою G_1 інтерфази, у яку клітини входять відразу після мітозу. У G_1 відбуваються підготовчі процеси до біосинтезу ДНК, синтез РНК, білків, транспорт глюкози та амінокислот у клітину. Після G_1 клітина входить у фазу S інтерфази. Основний процес цієї фази – синтез (реплікація) ДНК. Наступна фаза інтерфази – G_2 , у якій відбуваються процеси підготовки клітини до мітозу, синтезуються РНК, білки. Після інтерфази клітина готова до мітотичного поділу. Припиняються усі біосинтетичні процеси. Для індукції дочірних клітин до наступного клітинного циклу у середовищі існують фактори росту – стимулятори проліферації.

4.2. Фази росту клітин у культурі

Ріст клітин у культурі характеризується циклічністю. Цикл росту культури – це період від моменту висівання клітин у свіже культуральне середовище до наступного субкультивування. Ріст клітинних культур описується S -подібною кривою. Розрізняють фази ростового циклу: *lag*-фаза, *log*-фаза, стаціонарна фаза, фаза зменшення кількості клітин і їх загибель.

Після пересіву клітин у культуральний флакон, вони знаходяться у ***lag*-фазі** (латентній фазі), яка триває 2–24 год. У цей період клітини не розмножуються, не ростуть, активно поглинають воду, поживні речовини, прикріплюються до субстрату.

***log*-фаза** (логарифмічна фаза, фаза експоненціального росту) триває 5–6 діб. Клітини ростуть, проліферують. Спостерігається активація клітинного

метаболізму: збільшується вміст РНК, білка, ДНК. У кінці цієї фази вони досягають моношару і переходять у період сповільненого росту, спокою (**стаціонарна фаза** або фаза плато). У другій половині *log*-фази культуру ватро субкультивувати. Фаза плато характеризується накопиченням у культуральному середовищі продуктів метаболізму клітин, які пригнічують ріст культури. Культуральне середовище виснажується, у ньому зменшується кількість життєво необхідних речовин. Після фази плато наступає **фаза зменшення кількості клітин і їх загибелі**.

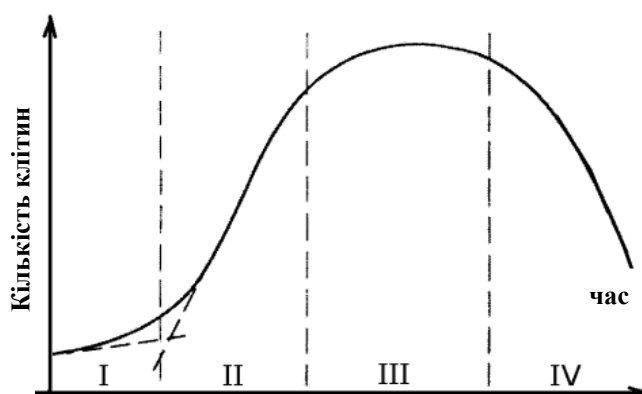


Рис. 17. Фази росту клітин у культурі:
 I - *lag*-фаза;
 II - *log*-фаза;
 III - стаціонарна фаза;
 IV - фаза зменшення кількості клітин і їх загибелі

Ці фази характерні для усіх клітинних ліній, за допомогою них можна отримати ознаки відтворювання культури, які присутні у описі усіх паспортизованих культур.

Такими ознаками є:

- ✓ тривалість *lag*-фази,
- ✓ час подвоєння популяції у *log*-фазі,
- ✓ щільність клітин моношару фази плато.
- ✓ інтервал пасажування.

Ці ознаки відтворюються за сталих і відповідних опису у паспорті культури умов культивування.

Власне у *log*-фазі відбуваються життєво важливі процеси: проліферація, синтез ДНК. Вони можуть бути маркерами клітинного циклу. На початку мітозу клітина округлюється. У метафазі вони слабо прикріплені до субстрату,

їх легко відділити звичайним струшуванням (легким постукуванням флакона об твердий предмет) чи трипсинізацією. Такі фізіологічні особливості клітин лежать в основі методу синхронізації шляхом відбору мітотичних клітин.

Зазвичай поділ клітин відбувається кожні 24 год. Якщо кількість клітин пропорційно збільшується в часі, зазначають, що культура знаходиться у фазі експоненціального росту. Після короткого періоду експоненціального росту фактор чи частина факторів стають лімітуючими, наприклад, компонент культурального середовища чи вільний субстрат – культура переходить до наступної фази. Якщо лімітуючий фактор відновити (субкультивуванням), клітини повертаються у фазу G_1 , далі – фазу S, G_2 і мітоз.

4.3. Синхронізація клітин

Під час вивчення механізмів регуляції поділу клітин важливо, щоб усі досліджувані клітини перебували в одній фазі клітинного циклу. Приведення усіх клітин популяції до одної фази клітинного циклу називають **синхронізацією клітин**.

За необхідності отримання популяції, у якій клітини знаходяться у одній фазі клітинного циклу, існують селективний та індуктивний методи:

1. **Селективний.** Відбір клітин за їх фізичними особливостями, наприклад, слабого прикріплення до субстрату (округлення клітин під час мітозу) під час легкого струшування культурального флакона.
2. **Індуктивний.** Метод селективного виживання клітин у певній фазі клітинного циклу (фазі-мішені). Клітини, які знаходяться на інших фазах клітинного циклу, гинуть.

а) індуктивний метод з використанням інгібіторів.

Інгібіторами можуть бути тимідин, гідроксисечовина, цитозин, арабінозид, аміноптерин (кінцева концентрація мкг/мл). Вони інгібують клітини, що перебувають на різних стадіях клітинного циклу, за винятком G_1 . Через кілька годин після внесення інгібіторів у культурі виявляють

- ✓ мертві клітини;
- ✓ живі клітини, заблоковані у фазі S;

✓ клітини, що уникли інгібування (у фазі G_1).

Отже, всі клітини, які здатні далі розвиватися, стартуватимуть з фази G_1 .

Недоліком цього методу є вплив синхронізуючого чинника, який може бути токсичним або впливати на результати досліджень.

б) індуктивний метод з застосуванням «голодування клітин».

Принцип цього методу у заміні культурального середовища на безсироваткове. Через 24–48 год за звичних умов культивування і відсутності мітогенів у середовищі всі клітини культури зупиняться на початку фази G_1 .

Лабораторна робота № 6

Тема: Основні принципи методу культивування тваринних клітин

Мета: Навчитись основних принципів роботи з культурою тваринних клітин: визначення концентрації клітин; визначення співвідношення живих та мертвих клітин у культурі; виготовлення мазка клітин.

Завдання:

1. Ознайомитись з найбільш розповсюдженими лініями клітин. Зробити коротку характеристику ліній клітин *Jurkat, MDA-MB-231*.
2. Підрахуйте кількість клітин у флаконах, запропонованих для дослідження.
3. Дослідити життєздатність клітин субстратзалежної та суспензійної культури, використовуючи вітальний барвник трипановий синій.
4. Виготовити мазок клітин.
5. Висіяти клітини, запропоновані на лабораторному занятті, у 10 лунок 96-лункового планшету для короткотривалих експериментів.
6. Пасажувати клітини з метою збереження популяції та нарощування біомаси.

Працюючи з культурою клітин, дослідник повинен вміти виконувати ряд рутинних методів, пов'язаних зі збереженням життєздатності клітин та їх оцінкою. Застосовуючи, запропоновані методи студент оволодіє навиками фарбування клітин, приготування барвників, зуміє візуально відрізнити живі і мертві клітини, кількісно подати ці показники. Опрацювання методу висівання і пасажування клітин є основою для майбутнього планування наукових, експериментальних досліджень.

Завдання 1. Ознайомитись з найбільш розповсюдженими лініями клітин. Зробити коротку характеристику ліній клітин *Jurkat, MDA-MB-231*

Виконуючи це завдання, користуйтеся мережею Інтернет, базою даних клітинних банків, наприклад АТСС, і паспортами клітинних ліній.

наконечниками (1000мкл, 10мкл), камера для підрахунку клітин.

Дослідження субстратзалежних клітин

Хід роботи

1. Злийте поживне середовище;
2. Внесіть до культури 2мл розчину трипсин/*EDTA*. Трипсинізуйте за 37°C до 5 хвилин. Огляд культури під мікроскопом допоможе встановити час трипсинізації. Відкріплені клітини будуть сферичної форми, вільно плавати у розчині;
3. Інактивуйте трипсин/*EDTA* середовищем (5мл);
4. Центрифугуйте за 1000об./хв впродовж 10 хвилин;
5. Осад ресуспендуйте в 1мл середовища;
6. Відіберіть аліквоту (10мкл) суспензії клітин та внесіть мікродозатором у камеру для підрахунку клітин (користування камерою див. нижче). Надлишок розчину видаліть фільтрувальним папером;
7. Підрахуйте кількість клітин.

Дослідження суспензійних клітин

Хід роботи

1. Суспензію клітин перенесіть у центрифужну пробірку;
2. Центрифугуйте за 1000об./хв впродовж 10 хвилин;
3. Осад ресуспендуйте в 1 мл середовища;
4. Відіберіть аліквоту (10мкл) суспензії клітин та внесіть мікродозатором у камеру для підрахунку клітин (користування камерою див. нижче). Надлишок розчину видаліть фільтрувальним папером;
5. Підрахуйте кількість клітин.

Використання камери для підрахунку клітин

Існує кілька типів гемоцитометрів для підрахування концентрації клітин. Камера Горяєва – найбільш розповсюджена.

1. Промийте скляний слайд камери і покривне скло 70% розчином етанолу і висушіть.

2. Розташуйте покривне скло так, щоб воно щільно притиснулося до скляного слайду з утворенням інтерферентних (райдужних) кілець.
3. Наповніть 4 камери, що утворилася між слайдом і покривним склом, краплею клітинної суспензії, не більше 10мкл.
4. Під мікроскопом підрахуйте кількість клітин у квадратах кожної камери. Якщо середня кількість клітин у квадратах перевищуватиме 200, – концентрація значна – клітинну суспензію необхідно розвести середовищем у 10 разів для вірного підрахунку. Після розведення підрахуйте кількість клітин знову. Знайдіть середнє значення між чотирма квадратами (n);
5. Розрахуйте концентрацію клітин в 1 мл середовища, що дорівнюватиме кількості клітин у флаконі.

Глибина камери 0,1мм, V камери = 0,0001мл = 0,1мкл = 0,1мм³

Наприклад, якщо n=30, то 30 кл. – в 0,1мкл

X кл. – в 1000мкл

$X = 30 \times 1000 / 0,1 = 300000$ клітин/мл середовища

Як розвести суспензію у 10 разів?

- Із суспензії відберіть 10 мкл у епендорф, внесіть 90 мкл середовища;
- Суспендуйте, по 10 мкл заповніть камери гемоцитометра, підрахуйте кількість клітин.

Наприклад, 20 кл. – у 0,1мкл (глибина камери)

X кл. – у 1000мкл

$X = 20 \times 1000 \times 10 / 0,1 = 20000$ клітин/мл середовища

10 - розведення

Завдання 3. Дослідити життєздатність клітин субстратзалежної та суспензійної культури, використовуючи вітальний барвник трипановий синій

Обладнання, матеріали та реактиви

Трипановий синій;

Суспензія клітин (з попередньої роботи), мікропробірка епендорф, фільтрувальний папір, серветки, мікроскоп, мікродозатори з наконечниками (1000 мкл, 10 мкл), камера для підрахунку клітин.

Принцип методу базується на тому факті, що живі клітини володіють вибірковою проникністю для різних речовин і, зокрема, вони непроникні для трипанового синього (3,3'-{[3,3'-диметил-(1,1'-біфеніл)]-4,4'-диіл]біс(азо)}-біс(5-аміно-4-гідрокси-2,7-нафталендисульфонова кислота), еритрозину та деяких інших барвників.

Хід роботи

1. Приготуйте клітинну суспензію для дослідження (завдання 2);
2. Приготуйте чистий гемоцитометр та зафіксуйте покривне скельце (правила користування у завданні 2);
3. Відберіть від ресуспендованої суспензії 100мкл у мікропробірку епендорф;
4. Внесіть до суспензії трипанового синього (1:10);
5. Залишіть на 1-2 хв для фарбування клітин (впродовж більш тривалого часу клітини почнуть гинути);
6. Перенесіть суміш (по 10мкл) до краю покривного скельця, даючи можливість суспензії проникнути в камери гемоцитометра;

фіксуючої рідини нанесіть на поверхню мазка і залишіть до повного висихання.

4. Зафіксований препарат ретельно промийте дистильованою водою і висушіть.

Завдання 5. Висіяти клітини, запропоновані на лабораторному занятті, у 10 лунок 96-лункового планшету для короткотривалих експериментів

Обладнання, матеріали та реактиви

DMEM;

1 мл суспензії життєздатних клітин з визначеною їх кількістю, центрифужна пробірка, мікродозатори з наконечниками (1000мкл, 10мкл), мікропробірки епандорф, 96-лунковий планшет.

Хід роботи

Робота проводиться у стерильних умовах!

1. Розрахуйте кількість необхідного середовища на 10 лунок 96-лункового планшету (таблиця 1, лабораторна робота №2);
2. Розрахуйте кількість потрібних для висіву клітин (таблиця 1, лабораторна робота №2);
3. Ресуспендуйте суспензію;
4. Знаючи кількість клітин у 1мл, відберіть, визначену за таблицею кількість потрібних для висіву клітин (наприклад, 60000).

Припустимо, що концентрація запропонованої Вам суспензії 300000 клітин/мл.

$$300000 \text{ кл.} - \text{у } 1000\text{мкл}$$

$$6000 \text{ кл} - \text{у } x \text{ мкл}$$

$$X = 6000 \times 1000 / 300000 = 20\text{мкл.}$$

5. Ретельно суспендуйте суспензію;
6. Відберіть 20мкл суспензії;
7. Внесіть суспензію до приготованої кількості середовища, попередньо відібравши рівний об'єм середовища (20мкл);

3000000 кл. – у 1000мкл

480000 кл – у x мкл

$$X = 480000 \times 1000 / 3000000 = 160 \text{ мкл.}$$

4. Ретельно суспендуйте суспензію;
5. Відберіть 160мкл суспензії;
6. Внесіть суспензію до приготованої кількості середовища у культуральний флакон, попередньо відібравши рівний об'єм середовища (160мкл);
7. Інкубуйте за 37°C, 5% CO₂.

Висновок

Лабораторна робота № 7

Тема: Дослідження метаболічної активності клітин з використанням МТТ

Мета: оцінка метаболічної активності клітин як основного показника проліферації клітин

Завдання:

1. Протестуйте дію різних концентрацій доксорубіцину на культурі суспензійних клітин, оцінивши метаболічну активність клітин як основний показник проліферації клітин.

МТТ – це водорозчинний тетразолієвий барвник (тіазоліл синій), жовтого кольору, який відновлюється за допомогою реакцій, що каталізуються клітинними ензимами – дегідрогеназами. Тому у живих клітинах утворюється водонерозчинний продукт – формазан пурпурового забарвлення. Цей продукт можна екстрагувати з клітин і визначити його вміст спектрофотометрично. Цей метод також використовують для визначення цитотоксичності сполук.

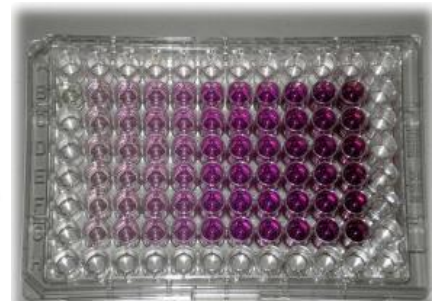
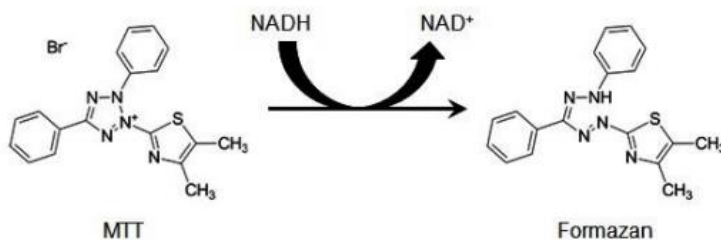


Рис. 18. Утворення забарвленої сполуки формазану

Обладнання, матеріали та реактиви

DMEM, доксорубіцин (60мкл/мл середовища, 30мкл і 10мкл), МТТ, гліциновий буфер.

1 мл суспензії життєздатних клітин з визначеною їх кількістю, скляні піпетки (5 мл) – 2 шт, мікродозатори з наконечниками (1000мкл, 10мкл), культуральний планшет, алюмінієва фольга, CO₂-інкубатор, мультилунковий спектрофотометр.

Хід роботи

Висівання і внесення тестованих речовин відбувається за стерильних умов!

1. Висівайте однакові кількості клітин у 24-лункові планшети;
2. Через 24 год внесіть тестовану речовину у різних концентраціях з використанням паралельних дослідів: 60мкл/мл середовища розчину доксорубіцину, 30мкл і 10мкл;
3. Паралельно з дослідною концентрацією клітин, відведіть частину лунок для посіву різної кількості клітин без внесення тестованих речовин. Для можливості побудови калібрувальної кривої за концентрацією клітинної популяції.

Схема досліду виглядатиме так:

Контроль (інтактна культура)	60мкл/мл середовища	30мкл/мл середовища	10мкл/мл середовища	1000 кл/лунку (інтактна культура)	1000 кл/лунку (інтактна культура)
Контроль (інтактна культура)	60мкл/мл середовища	30мкл/мл середовища	10мкл/мл середовища	2000 кл/лунку (інтактна культура)	2000 кл/лунку (інтактна культура)
Контроль (інтактна культура)	60мкл/мл середовища	30мкл/мл середовища	10мкл/мл середовища	3000 кл/лунку (інтактна культура)	3000 кл/лунку (інтактна культура)
Контроль (інтактна культура)	60мкл/мл середовища	30мкл/мл середовища	10мкл/мл середовища	4000 кл/лунку (інтактна культура)	4000 кл/лунку (інтактна культура)

4. Через 48 год промийте клітини свіжим культуральним середовищем і внесіть по 50мкл МТТ (50мг/мл);
5. Планшет захистіть алюмінієвою фольгою і інкубуйте впродовж 4–8 год;
6. Злийте поживне середовище, що містить МТТ, і розчиніть МТТ-формазан, накопичений у живих клітинах, вносячи 200мкл диметилсульфоксиду, потім внесіть ще по 25мкл гліцинового буферу (0,1М гліцин, 0,1М NaCl, довести *pH* до 10,5 за допомогою 1М NaOH);
7. Визначіть оптичну густину розчинів за 570нм. ***Продукт нестабільний, дії проводити швидко.***

8. Побудуйте калібрувальну криву. За нею визначіть показник метаболічної активності клітин для кожної дослідної і контрольної проби.

Висновок_____

Лабораторна робота № 8

Тема: Синхронізація клітин у культурі

Мета: вивчити метод селективної синхронізації клітин.

Завдання:

1. Синхронізувати клітини субстратзалежної культури.

З метою отримання достовірних результатів досліду, варто, щоб усі клітини досліду перебували у одній фазі клітинного циклу. Виконання методу дозволить набути навичок селективної синхронізації клітин. Під час мітозу клітини округлені, слабо прикріплені до субстрату, легко відокремлюються від нього за легкого струшування флакону. Така особливість дозволить відокремити мітотичні клітини від решти у популяції.

Обладнання, матеріали та реактиви

DMEM (10% сироватки); субстратзалежна культура клітин; центрифуга, холодильник, центрифужна пробірка, флакон для культивування, скляні піпетки (5мл) – 2 шт., мікродозатори з наконечниками (1000мкл, 10мкл).

Хід роботи

1. Помістити флакон з клітинами на 30–60 хв у холодильник за температури 4°C (таке охолодження підвищує ефективність струшування клітин, які слабо прикріплені до субстрату);
2. Кілька разів інтенсивно струсити флакон з клітинами у горизонтальній площині;
3. Злити культуральну рідину у стерильну пластикову центрифужну пробірку, центрифугувати 5хв за 500g;
4. Осад мітотичних клітин суспендувати у свіжому культуральному середовищі, яке містить 10% сироватки крові і перенести у флакон для культивування клітин.

Висновок _____

Контрольні питання:

1. Клітинний цикл, характеристика клітинного циклу, фази клітинного циклу.
2. Фази росту клітин у культурі, їх коротка характеристика.
3. Синхронізація, методи синхронізації клітин.
4. Індуктори та інгібітори синхронізації клітин.
5. Як провести підрахунок клітин у культурі?
6. Якими методами можна дослідити життєздатність клітин?
7. Спосіб відбору потрібної кількості суспензії для висівання клітин у лунки планшета.
8. Як відбувається пасажування клітин у культурі?
9. Яку сполуку називають формазаном?
10. У чому суть МТТ тесту?

РОЗДІЛ 5. СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ

5.1. Стовбурові клітини, етапи ембріогенезу

Термін «стовбурава клітина» вперше запропонував відомий російський гістолог А. А. Максимов у 1908р. на з'їзді товариства гематологів у Берліні. Найбільший поштовх у розвитку вчення про стовбурові клітини виник у другій половині ХХ ст. завдяки ученим: І. Л. Чертков, А. Я. Фріденштейн, М. Owen, М. Tavassoli, які у 60–80-их роках минулого століття детально описали морфологію та функцію мультипотентних стовбурових клітин строми кісткового мозку.

У 1998р. уперше отримано ембріональні стовбурові клітини із внутрішньоклітинної маси чотириденного людського ембріона. Ця подія була у 1999р. визнана журналом «Science» третьою за значимістю у ХХ ст. після розшифрування ДНК і програми «Геном людини».

Нобелівську премію з фізіології та медицини у 2012 році присуджено Джону Гедону (*John Gurdon*) з Кембриджського університету Великої Британії та Шиньї Яманаці (*Shinya Yamanaka*) з університету Кіото в Японії за роботи з перепрограмування зрілих клітин багатоклітинних організмів до плюрипотентного стану.

У сучасному розумінні **стовбурові клітини** – це клітини, в яких відсутні тканинноспецифічні структури і які здатні до проліферації, тобто тривалого самовідновлення та диференціювання в різні типи спеціалізованих клітин. Це первинні клітини багатоклітинних організмів. Усі багатоклітинні організми, зокрема й людина, розвиваються з однієї заплідненої яйцеклітини – зиготи, яка утворюється шляхом злиття жіночої та чоловічої гамет. Кожна гамета містить половину розподіленого випадковим способом генетичного матеріалу тих особин, від яких вона походить.

На ранніх стадіях свого розвитку зародок повністю складається із стовбурових клітин.

Зигота в сприятливих умовах починає швидко ділитися: спочатку навпіл, утворюючи 2 бластомери, потім 4, 8 і так далі. Інколи на початкових етапах клітини, що поділилися, розходяться. Кожна з них може дати початок новому окремому організму, який за генотипом є ідентичним такому ж, що походить із цієї зиготи. Так виникають, наприклад, **однотайцеві близнюки**.

Таке явище (тотипотентність) спостерігається до етапу 8-ми бластомерів. За подальшого поділу тотипотентність зникає, а клітини стають більш спеціалізованими, утворюючи спочатку три специфічні тканинні листки – зовнішній (ектодерму), середній (мезодерму) та внутрішній (ендодерму). На цьому етапі клітини називаються плюрипотентними. Отже, з розвитком

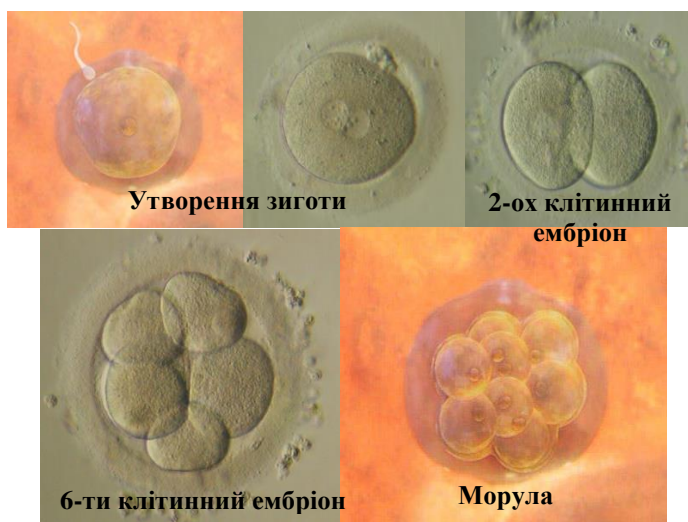


Рис. 19. Етапи ембріогенезу

організму проліферативний потенціал клітин стає дедалі обмеженішим, а клітини спеціалізованими, проходячи стадії мультипотентності, бі- та уніпотентності. Згодом вони стають диференційованими, високоспеціалізованими, кожній властива своя морфологія і функції. Усі вони походять з

однієї зиготи, мають один набір генетичного матеріалу, який по-різному експресується, забезпечуючи синтез речовин, необхідних для виконання специфічної функції кожної клітини.

5.2. Класифікація стовбурових клітин

Стовбурові клітини класифікують за кількістю типів різноманітних спеціалізованих клітин, початок яким можуть дати:

- **тотипотентні** (від *лат. всемогутні*) – перші клітини, що утворюються після поділу заплідненої яйцеклітини, які при трансплантації можуть дати початок росту та формуванню повноцінного зародка;

- **плюрипотентні** – клітини внутрішньоклітинної маси бластоцисти, які у процесі ембріонального розвитку дають початок усім типам соматичних клітин ссавців, у тому числі й людини;

- **мультипотентні** (мезенхімальні стовбурові клітини) – клітини, що можуть утворювати клітини в межах однієї спеціалізованої тканини та є попередниками клітинних елементів сполучної тканини і джерелом усіх клітин крові;

- **уніпотентні та біпотентні** – клітини, що диференціюються відповідно в один та два типи клітин.

За джерелом отримання матеріалу та його локалізації стовбурові клітини розрізняють:

ембріональні стовбурові клітини:

- **власне ембріональні стовбурові клітини** – клітини внутрішньоклітинної маси бластоцисти ембріона на ранніх стадіях розвитку (4-7-ма доба), які характеризуються плюрипотентністю;

- **фетальні стовбурові клітини** – клітини абортівного матеріалу зародка ембріона 9-12-ти тижнів. Це суміш мультипотентних та уніпотентних стовбурових клітин;

постнатальні стовбурові клітини дорослої людини:

- **гемопоетичні стовбурові клітини**, джерелом яких є кістковий мозок, дають початок різним типам клітин крові, ендотеліоцитам, овальним клітинам печінки, міоцитам;

- **нервові стовбурові клітини**, які містить кістковий мозок, можуть бути джерелом нейронів, клітин нейроглії (астроцити, олігодендроцити) та клітинних елементів крові;

- **епітеліальні стовбурові клітини кишечника та епідермісу** є джерелом усіх клітинних типів епітеліальних крипт та епідермальних шарів;

- **мезенхімальні стовбурові клітини**, або, за новою класифікацією, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, джерелом яких є кістковий

мозок, жирова тканина тощо, дають початок остеобластам, остеоцитам, хондроцитам, фібробластам, адипоцитам, міоцитам.

У дорослому організмі людини і тварини поряд зі спеціалізованими клітинами містяться і молодиференційовані дорослі стовбурові клітини. Відомі тканинні стовбурові клітини, які при пошкодженні тканин певного органа мігрують до зони пошкодження. Ці клітини діляться і диференціюються, таким чином утворюють нову тканину в місці пошкодження. Окрім тканин стовбурових клітин, існують стромальні стовбурові клітини кісткового мозку. Якщо перші (тканинні стовбурові клітини) використовуються для відновлення пошкодження ділянок тільки в даному місці і для даних тканин, то стромальні клітини є універсальними. Вони з током крові мігрують до пошкодженого органа або тканини і під дією різних сигнальних речовин починають диференціацію, внаслідок якої утворюються потрібні спеціалізовані клітини.

Джерелами постнатальних стовбурових клітин є кістковий мозок, пуповинна кров, плацента, тканина пуповинного канатика, жирова тканина, пульпа молочних зубів. Найширше у клітинній терапії застосовується кістковий мозок. Перша публікація про трансплантацію кісткового мозку датована 1957р., а вже до 2010р. цей метод лікування врятував тисячі хворих на лейкоз. Майже у всіх країнах світу створені спеціалізовані центри трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

Постнатальні стовбурові клітини є джерелом «будівельного матеріалу» для оновлення структури тканин. Саме завдяки цьому явищу в організмі забезпечується стабільний рівень процесів самовідновлення.

5.3. Особливість поділу стовбурової клітини

Особливість поділу стовбурової клітини полягає в тому, що вона здатна до симетричного і асиметричного поділу (рис. 20). Внаслідок асиметричного поділу виникають не дві дочірні клітини, а лише одна дочірня та одна стовбура. Завдяки такому асиметричному поділу кожна стовбура клітина повертається до стану спокою, а дочірня проліферує, продовжуючи ділитись симетрично певну кількість разів, тим самим забезпечуючи клітинний

гомеостаз спеціальних клітин у тканинах і органах. Кожна тканина організму має у своєму складі певну кількість стовбурових клітин, які необхідні їй для підтримання постійного клітинного складу тканин.

Доведено наявність так званих регіональних (або тканинспецифічних) стовбурових клітин, які здатні відтворювати клітини не тільки тканин свого типу, а й диференціюватись у клітини інших видів тканин завдяки своїй пластичності.

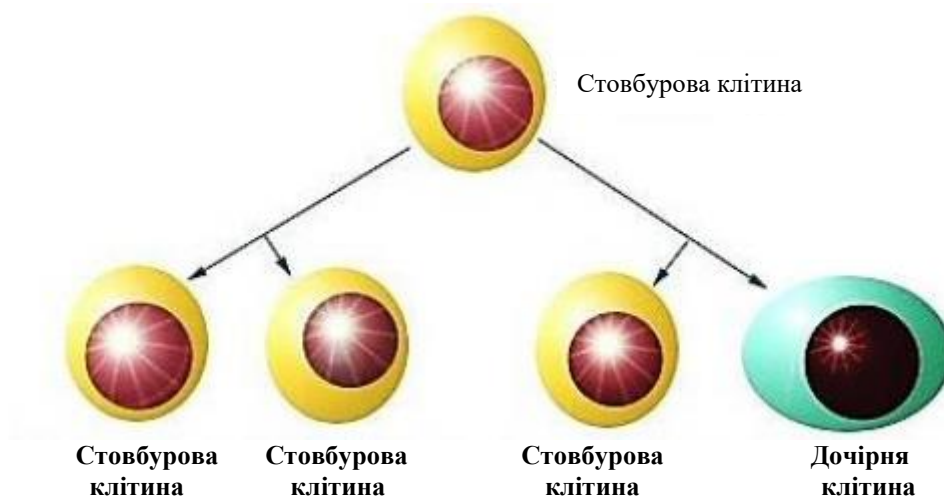


Рис. 20. Асиметричний поділ стовбурових клітин

У культурі ембріональні стовбурові клітини мають практично необмежений потенціал проліферації. Ця властивість ембріональних стовбурових клітин дала поштовх до інтенсивного їх вивчення й відкрила широкі перспективи практичного їх використання в біології та медицині, у першу чергу в трансплантології, імунології, геронтології.

5.4. Особливості ембріональних стовбурових клітин

Особливості ембріональних стовбурових клітин:

- підвищена активність теломерази;
- нормальний каріотип;
- здатність до інтенсивної проліферації;
- мінімальна кількість рецепторів;
- тотипотентність, можливість диференціації у будь-яку клітинну лінію;
- ріст клонами.

Ембріональні стовбурові клітини відрізняються від інших (дорослих) клітин тим, що теоретично для них кількість поділів їх невичерпна й клітини можуть ділитися безперервно, причому без переродження у



злюкисні пухлини. Таким чином, друга важлива властивість ембріональних стовбурових клітин – фактичне безсмертя (імортальність).

Одержання ембріональних стовбурових клітин. Основним джерелом сировини для отримання

лабораторних соматичних клітин є клони ембріональних стовбурових клітин, виділені з ембріона людини на стадії бластоцисти. Бластоциста складається із зовнішнього шару клітин і внутрішньої порожнини, заповненої рідиною і стовбуровими клітинами. Стовбурові клітини отримують із внутрішньої маси, руйнуючи бластоцисту. У складі бластоцисти міститься приблизно 150 клітин, з яких лише 30 є стовбуровими. Під час розвитку ембріона стовбурові клітини зникають після 7-го дня вагітності.

Ембріональні стовбурові клітини людини можна отримати із внутрішньої клітинної маси бластоцисти шляхом посіву у культуральний флакон, з фідерними клітинами (фібробласти миші). Ембріональні стовбурові клітини, які розмножуються в культурі клітин, впродовж шести або більше місяців без диференціювання є плюрипотентними та виглядають генетично нормальними, називаються **ембріональною стовбуровою клітинною лінією**. Після формування клітинної лінії частини клітин заморожують.

Іншим джерелом ембріональних стовбурових клітин є статеві клітини. Ембріональні стовбурові клітини одержують з яйцеклітин, запліднених *in vitro* (штучне запліднення). Ембріональні стовбурові клітини легко культивувати, оскільки вони здатні до необмеженого поділу. Деякі клітини людини можуть

ділитися 300–400 разів, а ембріональні стовбурові клітини мишей можуть існувати в культурі впродовж кількох десятків років.

Ідентифікація і виділення стовбурових клітин відбувається за допомогою маркерів (специфічні білки мембрани), наприклад, ембріональних антигенів *SSEA-3* і *SSEA-4*.

Отримано постійні лінії стовбурових клітин, які підтримуються в культурах і можуть бути використані з метою вивчення і практичного застосування. Завдяки цьому визначено особливості експресії генів стовбурових клітин. Досліджено гени, які визначають особливі ознаки стовбурових клітин і є заблокованими в диференційованих клітинах.

5.5. Перепрограмування диференційованих клітин та генна терапія стовбурових клітин

Доведено можливість перепрограмування диференційованих клітин у плюрипотентні із застосуванням генноінженерних маніпуляцій. Такі маніпуляції призводять до експресії генів стовбурової клітини і вимкнення генів диференційованої. Широкому застосуванню розроблених технологій перешкоджало те, що у складі генів, які вводяться, є вірусний вектор, котрий призводить до нестабільності геному, тому клітини можуть трансформуватись у злякисні. Окрім того, не завжди відбувається повне повернення клітин до недиференційованого стану, залишаються окремі риси вихідної тканини і меншою є прогнозована здатність до диференціювання у запланований тип. Репрограмування плюрипотентності засноване на трансфекції соматичних клітин ретровірусами, які несуть набір із 4 генів *Oct4*, *Sox2*, *c-myc*, *Klf4*, або *Oct4*, *Sox2*, *Lin 28*, *Nanog*.

Передбачається застосовувати щодо стовбурових клітин методи генної терапії. У генетично дефектні клітини певного пацієнта в умовах *in vitro* вводитимуть недефектні гени, які після повернення клітини в організм, компенсують генетичний дефект. Такі ж клітини можуть бути використані для поглибленого вивчення причин і механізмів багатьох захворювань, для

розшифрування механізмів розвитку організму, а також для пошуку і випробування лікарських засобів.

Таблиця 11

Порівняння бластомерів та клітин внутрішньоклітинної маси бластоцисти як джерела отримання ембріональних стовбурових клітин (ЕСК).

№	Показник	Бластомери	Клітини ВКМ бластоцисти
1.	Потентність	Тотипотентність	Плюрипотентність
2.	Профіль експресії генів	Основна частина активованих генів пов'язана із метаболізмом ліпідів та жирних кислот	Зниження рівня експресії регуляторів транскрипційних факторів та метаболізму нуклеїнових кислот
3.	Метилування промоторів	Повністю деметильовані	З'являються мітки метилування
4.	Теломераза	Низька теломеразна активність та коротша середня довжина теломери	Вища теломеразна активність
5.	ЕСК, що від них походять	Більш примітивний фенотип	Морфологічні характеристики типові для більш пізньої стадії розвитку

У випадках важких пошкоджень організмові не досить своїх власних стромальних клітин. Йому можна допомогти, вводячи стромальні клітини

зовні. Так, зокрема, показано, що введення стромальних клітин кісткового мозку у зону пошкодження серцевого м'язу (зону інфаркту) практично повністю знімає явища післяінфарктної серцевої недостатності у експериментальних тварин. Подібна клітинна терапія для відновлення пошкоджень серцевого м'язу надзвичайно перспективна, оскільки для неї використовують власні стовбурові стромальні клітини організму. Вони не сприймаються організмом як чужорідні; крім того, при введенні дорослих стовбурових клітин виключено ймовірність їх злоякісної трансформації.

Стромальні клітини під впливом певних факторів можуть диференціюватись у нервові клітини (нейрони). Ці, поки що лабораторні дослідження, дають надію на лікування хворих з важкими ураженнями спинного й головного мозку. Досліджено, що при введенні власних стромальних клітин кісткового мозку у спинномозковий канал людини, вони рівномірно розподіляються по всіх відділах головного мозку, не порушуючи його структури. Недавно за допомогою використання стромальних клітин кісткового мозку вдалося відновити рухову активність кінцівок мишей.

Стромальні клітини можуть диференціюватись у клітини печінки. Встановлено, що при пошкодженні печінки, нові печінкові клітини (гепатоцити) та їхні попередники формуються, головним чином, з стромальних клітин кісткового мозку донора.

Лабораторна робота №9

Тема: Одержання культури ембріональних стовбурових клітин

(з навчально-методичного посібника Отримання клітинних культур і можливість їх використання в ембріональній біотехнології / Мадіч А.В., Шеремета В.І., Гевкан І.І., Сливчук Ю.І., Штапенко О.В., Федорова С.В.)

Мета: опрацювати запропонований, стандартизований багатьма провідними лабораторіями світу, метод одержання ембріональних стовбурових клітин з експандованих бластоцист мишей.

Завдання:

1. Приготування культурального середовища для культивування ембріональних стовбурових клітин.
2. Одержання культури ембріональних стовбурових клітин.

Обладнання, реактиви, матеріали

20 бластоцист, ембріональні фібробласти миші, 4-лункові планшети з діаметром лунки 1см (6шт.), середовище для культивування ембріональних стовбурових клітин, пастерівська ротова піпетка, *PBS*, мінеральна олія для запобігання випаровуванню рідини, CO_2 -інкубатор, трипсин/*EDTA*, велика чашка Петрі, мікродозатори з наконечниками.

Завдання 1. Приготування культурального середовища для культивування ембріональних стовбурових клітин

Ембріональні стовбурові клітини ростуть у модифікованому Глазго середовищі Ігла (*Glasgows Modified Eagles Medium-GMEM*), альтернативно відомому як *BHK21 (Invitrogen)*. Однак, для виготовлення робочого середовища необхідно внести кілька компонентів перед його використанням.

Хід роботи

До 500 мл фабричного флакону *BHK21 (Invitrogen)* внесіть:

- 100 мМ розчину пірувата соди (*Invitrogen*) – 5мл;
- 100 мМ розчину незамінних амінокислот (*NEAA, Invitrogen*), 1% – 5мл;
- Стерильний розчин гідрокарбонату соди, 7,5% – 16,5мл;
- Фетальну сироватку теляти (10%) – 50мл;

1М розчин β -меркаптоетанолу, 0,1мМ – 0,5мл;

Розчин α -глутаміну, 1мМ – 5мл;

1М розчин β -меркаптоетанолу готується розчиненням 28мкл β -меркаптоетанолу у 4мл стерильної води і зберігається за -20°C .

Завдання 2. Одержання культури ембріональних стовбурових клітин

Хід роботи

Робота проводиться у стерильних умовах!

Для експерименту потрібно 20 бластоцист одної стадії розвитку.

8. Розташуйте бластоцисти по 2 або 3 у кожній лунці планшету, наповненій середовищем для культивування ембріональних стовбурових клітин (по 800 мкл у лунку). Після 1-2 днів культивування за 37°C і $5\%\text{CO}_2$ ембріони вилупляються з оболонок і прикріпляються до дна завдяки міграції трофобластичних клітин. Після прикріплення ембріонів внутрішню клітинну масу ембріона, тобто ембріобласт, можна вирізати на фоні розпластаних клітин трофобласта. Внутрішньоклітинна маса швидко формується у вигляді горбика впродовж наступних 2-х днів.
9. На 4-5-й день внутрішньоклітинна маса розпластаних бластоцист виглядає як кластер клітин, що тримається «на ніжці». Важливо вчасно його відокремити, використовуючи відтягнутий і запаятий, як скляна кулька, кінчик Пастерівської ротової піпетки, і перенести у заздалегідь приготовану краплю *PBS*. Те саме зробіть з рештою бластоцист, заповнюючи краплі індивідуально.
10. Приготуйте мікрокраплі трипсину, об'ємом 20мкл, з розрахунку одна крапля на кластер. Розташуйте ці краплі на кришці великої чашки Петрі. Залейте краплі трипсину мінеральною олією для запобігання випаровуванню рідини. Перенесіть кластери по одному у краплю і інкубуйте за 37°C в інкубаторі впродовж 3-4хв. Виконуйте такі маніпуляції не більше, ніж з 3-ма кластерами одночасно.
11. Мікродозатором наберіть середовище для ембріональних стовбурових клітин з 20% фетальної сироватки. Об'єм трипсинової краплі і

сироваткового середовища у дозаторі повинен бути однаковим. Випустіть середовище з мікродозатора у трипсинову краплю, уникаючи піноутворення. Ресуспендуйте краплю і клітинний кластер на маленькі клітинні агрегати з 3-5-ти клітин. Таким чином, Ви інактивуєте дію трипсину.

12. Візьміть мікродозатором кожен мікрокраплю окремо і перенесіть у лунку 4-лункового планшета з ембріональними фібробластами мишей. Щодня слідкуйте за культурою, через 2 дні слід очікувати ріст первинних колоній клітин. Оскільки одночасно з ростом відбувається диференціація частини ембріональних клітин, ці колонії різнитимуться морфологічно. На 7-8-ий день після початку культивування колонії формують маленькі горбки, які слід виштовхнути з фідерного шару ембріональних фібробластів мишей запаяним кінчиком Пастерівської піпетки. Повторіть процедуру дисоціації таких колоній у краплях трипсину/*EDTA* за вище наведеною схемою.
13. Вміст крапель перенесіть на новий фідерний шар з максимальною щільністю, по 5-6 трипсинових крапель у 1 лунку 4-лункового планшета. Для підвищення життєздатності клітин фідерна культура ембріональних фібробластів миші готується за 2-3 год до пасажування на ній клітин. Через 2-3 дні у культурі можна виявити утворення маленьких клітинних гнізд стовбурових клітин. Залежно від швидкості росту (3-5 днів) ці колонії потрібно трипсинізувати. Отримавши ізольовані клітини, висіяти у культуральний флакон з фідерними клітинами. Кожні 2-3 дні, залежно від проліферативного росту клітин, здійснюйте їх субкультивування (пасажування). Важливо проводити щоденний моніторинг. Несвоєчасне субкультивування призводить до диференціації стовбурових клітин у клітини ендодерми.

Висновок

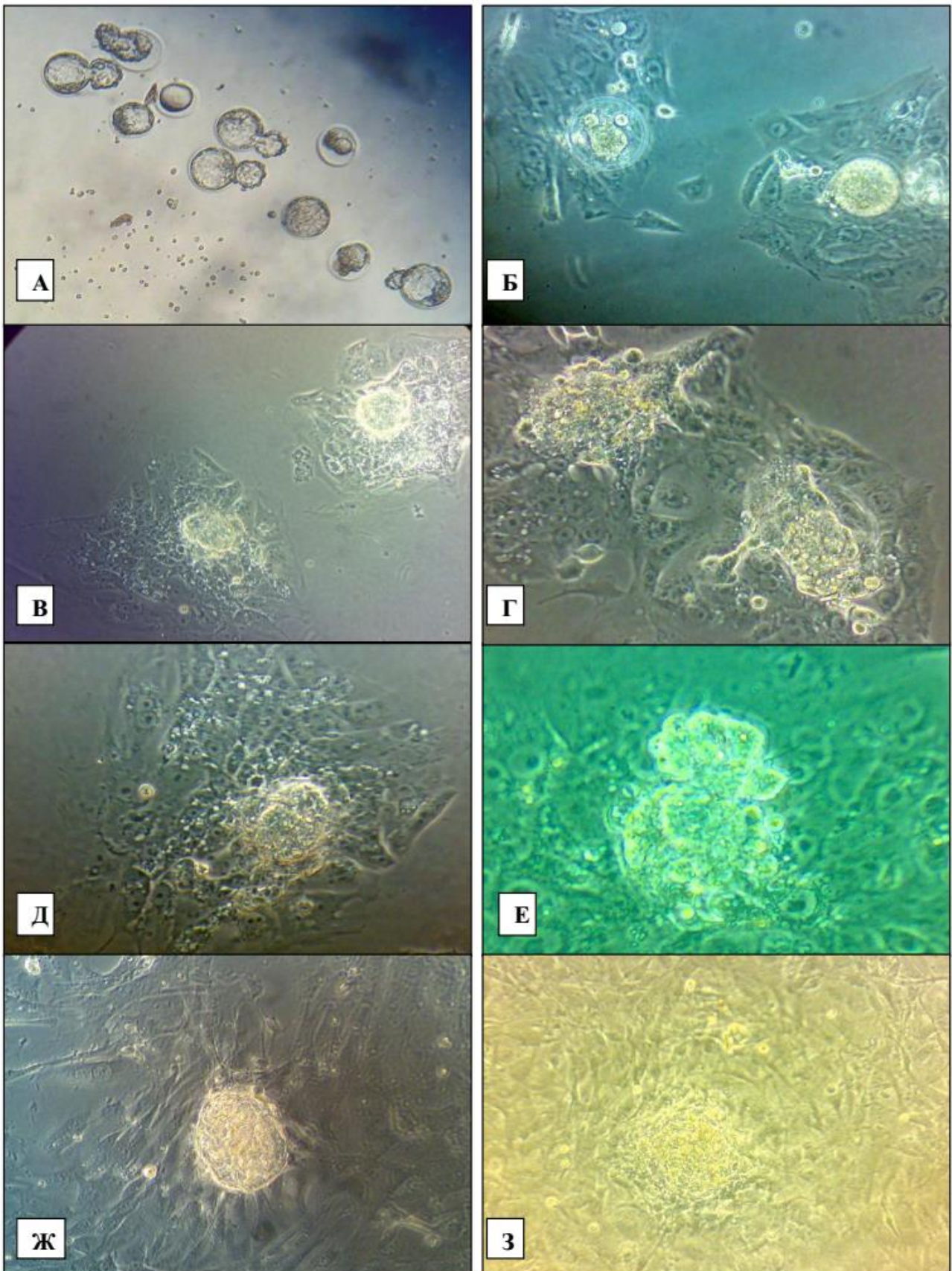


Рис. 21. Одержання первинної культури ембріональних стовбурових клітин миші: А. Вилуплення бластоцист. Б. Прикріпленні бластоцисти. В. Ембріобласт на фоні розпластаних клітин трофобласта. Г. Горбик стовбуровоподібних клітин. Д. Кластери клітин внутрішньоклітинної маси, що тримаються «на ніжці». Е. Колонії формують маленькі горбики. Ж. Маленькі клітинні гнізда стовбурових клітин на фідерному шарі. З. Колонія стовбуровоподібних клітин.

Лабораторна робота № 10

Тема: Кріоконсервування і розморожування клітин

Мета: опрацювати методи збереження живих об'єктів та відновлення життєздатності після кріоконсервування.

Завдання:

1. Кріоконсервація клітин.
2. Відновлення життєздатності після кріоконсервування.

Термін «*криозбереження*» (анг. *cryopreservation*) застосовується для позначення складного багатоетапного процесу, метою якого є тривале зберігання життєздатних клітин в стані холодового анабіозу. Єдиним надійним засобом для вирішення цієї проблеми є глибокий холод (нижче -140°C), який забезпечує використання рідкого Нітрогену (-196°C) або його випарів (-150°C). Перевага глибокого заморожування полягає в тому, що за температур, близьких до -196°C повністю зупиняються процеси метаболізму клітин і тим самим зберігається їх генетична і епігенетична характеристика. Це дозволяє зберігати і потенційно використати навіть через сотні років необхідний генотип, який буде знаходитись у кріогенному банку.

Принцип кріоконсервації клітин полягає у забезпеченні умов, які б перешкождали утворенню кришталіків льоду вільної внутрішньоклітинної води. Для захисту клітин від такого пошкодження використовують кріопротектори. **Кріопротектори** – це речовини, які зв'язують вільну воду як в міжклітинниках, так і в клітинах; ускладнюють її кристалізацію за рахунок утворення з нею водневих зв'язків; зменшують ущільнення протопластів клітин при заморожуванні, розчиняють деякі ліпідні компоненти цитоплазматичної мембрани. Використовують різноманітні речовини-кріопротектори: диметилсульфоксид (DMSO), поліетиленгліколь (ПЕГ), поліетиленоксид, етеленгліколь, гліцерин, сахарозу, сорбіт, маніт, лактозу. Крім цього, для кріоконсервації використовують повільне охолодження клітин, коли зниження температур становить $0,5-1,0^{\circ}\text{C}$ за хвилину. За таких умов клітини можна

охолодити до температури рідкого Нітрогену -196°C зі збереженням їх життєздатності.

Найдешевший спосіб виконання таких умов кріоконсервації – пінопластовий брусок з порожнинами для пробірок. Товщина бруска і кришки – 1-2 см. Якщо помістити такий брусок у низькотемпературний холодильник (від -70°C до -90°C), то швидкість охолодження пробірок $\approx 1^{\circ}\text{C}$ за хвилину. Через 3 години пробірки можна переносити до посудини з рідким Нітрогеном.

Для заморожування використовують культури, що перебувають у пізній логарифмічній фазі росту.

Завдання 1. Кріоконсервація клітин

Обладнання, реактиви, матеріали

диметилсульфоксид (*DMSO*) + сироватка крові ВРХ;
культуральний флакон з успензією клітин, мікродозатори з наконечниками (1000 мкл, 10 мкл), пробірки для кріоконсервації, пінопластовий брусок з порожнинами для пробірок, морозильна камера, посудина Дьюара з рідким Нітрогеном.

Хід роботи

Робота проводиться у стерильних умовах!

1. Відіберіть 500мкл клітинної суспензії (концентрація 10^6 - 10^7 клітин/мл середовища) у пробірку для кріоконсервування;
2. По краплинах внесіть 500мкл розчину. Розчин містить диметилсульфоксиду (*DMSO*) – кріопротектор (400мкл), сироватку крові ВРХ (100мкл). Всі маніпуляції з використанням кріопротектора здійснюйте швидко, він здатний зруйнувати клітини впродовж короткого терміну;
3. Закоркуйте і швидко внесіть до морозильної камери (-80°C);
4. Надалі зберігайте культуру у рідкому Нітрогені.

Висновок _____

Завдання 2. Відновлення життєздатності після кріоконсервування

Для оптимального відновлення життєздатності клітин потрібні висока швидкість їх розморожування та максимально швидке усунення консерванта.

Обладнання, реактиви, матеріали

DMEM, кріоконсервована суспензія клітин (з попередньої роботи), скляні піпетки (5мл) – 2шт., мікродозатори з наконечниками (1000мкл, 10мкл), культуральний флакон, пробірка на 10мл, водяна баня, центрифуга, склянка для зливу, термостат.

Хід роботи

Робота проводиться у стерильних умовах!

1. До стерильного культурального флакону внесіть 5мл середовища;
2. До пробірки 1 (10мл) внесіть 2мл середовища;
3. З пробірки 1 відберіть 500мкл і по краплинах внесіть у протерту 70% етанолом кріопробірку з культурою (вона знаходилась у водяній бані 37°C до 1хв);
4. Ресуспендуйте, руйнуючи кришталіки льоду;
5. Повністю розтоплене середовище з культурою перенесіть до пробірки 1;
6. Центрифугуйте 5хв за 1200об./хв;
7. Злийте супернатант, до клітин внесіть 1мл середовища з флакону, ресуспендуйте;
8. Суспензію перенесіть у флакон, ресуспендуйте;
9. Інкубуйте за 37°C, 5% CO₂.

Висновок

Контрольні питання:

1. Що таке стовбурові клітини?
2. Якими властивостями вони володіють?
3. Які є стовбурові клітини?

4. Поясніть терміни: «ембріональні», «стромальні», «гематопоетичні стовбурові клітини». Які з цих клітин містяться у найбільшій кількості в організмі людини?
5. Властивості ембріональних стовбурових клітин.
6. Як отримати культуру стовбурових клітин?
7. Перепрограмування диференційованих клітин.
8. Генна терапія стовбурових клітин.
9. Кріоконсервування клітинних культур.
10. Відновлення життєздатності культури після кріоконсервування.

РОЗДІЛ 6. ГІБРИДИЗАЦІЯ КЛІТИН

13.1. Гібриди клітин, клітинна селекція

Гібридизація – процес одержання гібридів, який ґрунтується на об'єднанні генетичного матеріалу різних клітин. **Гібридизація соматичних клітин** – злиття нестатевих клітин, спосіб отримання соматичних гібридів. Важливе значення для розвитку клітинної біотехнології мали праці, які стосуються гібридизації соматичних клітин. Припущення про те, що соматичні клітини можуть гібридизуватись було висловлено ще на початку ХІХ століття у зв'язку з відкриттям багатоядерних клітин – **полікаріонів**. У 1960р. Панський зі співробітниками повідомили про виділення лінії гібридних клітин.

Перші гібриди отримано шляхом злиття клітин двох ліній мишачої саркоми. Це **внутрішньовидові гібриди**. Вихідні лінії клітин мишачої саркоми між собою відрізнялися за кількістю й морфологією хромосом, за здатністю до утворення пухлини в організмі мишей. Кількість хромосом гібридної клітини відрізняється від кількості хромосом вихідних клітинних ліній, досліджено різницю між поверхневими антигенами. Наступний крок – отримання міжвидових гібридів. **Міжвидові гібриди** – гібриди, отримані при злитті клітин тварин різних видів (наприклад, миша-людина, хом'як-курка, комар-людина), відрізняються від вихідних батьківських клітин генотипом.

Спонтанне злиття клітин у культурі тканини відбувається досить рідко. Ймовірність гібридизації соматичних клітин підвищується при внесенні в культуру клітин РНК-вмісного вірусу парагрипу Сендай, який, як і взагалі всі віруси, змінює властивості клітинних мембран і робить можливим злиття клітин. Вірус Сендай попередньо опромінювали ультрафіолетом. Він втрачав свої вірулентні властивості, але зберігав здатність індукувати злиття клітин. У змішаній культурі двох типів виникають клітини, які містять у спільній цитоплазмі ядра обох батьківських клітин – **гетерокаріони**. Більшість гетерокаріонів гине, але ті, які містять тільки два ядра, часто продовжують свій розвиток, проліферуючи. У результаті мітозу двоядерного гетерокаріону утворюються дві одноядерні клітини, кожна з яких є **синкаріоном** – справжня

гібридна клітина, яка містить генетичну інформацію обох батьківських клітин. Гібридні клітини людини і миші мають 43 пари хромосом: 23 – від людини і 20 – від миші. Згодом, при розмноженні цих клітин, частка вихідних геномів різна. Відбувається поступова елімінація хромосом того організму, клітини якого мають повільніший темп розмноження. За допомогою цього методу

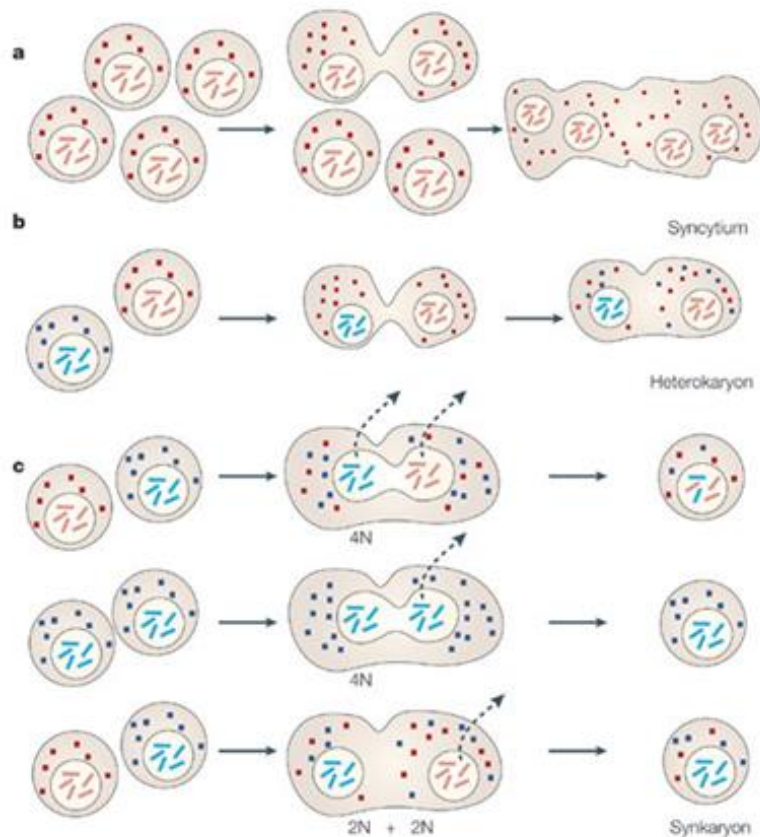


Рис. 22. Утворення синцитію (а), гетерокаріону (б), різних комбінацій синкаріону (с)

проводиться картування хромосом людини.

Отже, під час вивчення міжвидових гібридних клітин, здатних до проліферації, було зроблено два дуже важливих спостереження:

- гібриди можуть бути поєднанням обидвох геномів;
- у довгоіснуючих міжвидових гібридах елімуються хромосоми одного виду.

Крім синкаріонів, під час індукованого злиття клітин, у середовищі заходяться гомокаріони (гібридизовані однакові клітини, умовно позначимо AA і BB) і клітини, що не злились (A, B). Для того, щоб відібрати синкаріони (AB),

існують методи **клітинної селекції** – сукупність методів відбору клітинних ліній з новими успадкованими знаками в умовах *in vitro*. Методом клітинної селекції є культивування клітин на **селективних середовищах**. Селективні середовища дають змогу відібрати клітини стійкі до конкретного селективного фактора. Для гібридизації використовують, як правило, *клітини-ауксотрофи*, тобто клітини, що позбавлені можливості синтезувати одну з життєвоважливих речовин. Лише за наявності цієї речовини у середовищі такі клітини можуть рости і розвиватися. У наведеному прикладі клітина А є ауксотрофом за речовиною β , але при цьому здатна синтезувати речовину α , в той час як клітина В є ауксотрофом за речовиною α і при цьому синтезує речовину β . У разі, коли в середовищі відсутні речовини α і β (селективні фактори), гомокаріони АА і ВВ, клітини А і В гинуть у зв'язку з відсутністю необхідних компонентів, а синкаріони АВ виживуть, оскільки кожна зі складових гібридної клітини забезпечує іншу необхідними компонентами.

6. 2. Основні методи злиття клітин

1. Використання інактивованого вірусу Сендай, який відноситься до групи вірусів парагрипу, інактивованій УФ-випромінюванням. Цей метод вже майже не використовується (лише у тих випадках, коли клітини іншими методами не зливаються – для роботи з ядерними еритроцитами птахів). Це біологічний метод.

2. Використання поліетиленгліколю (ПЕГ). Це стандартний спосіб, який використовується для злиття клітин тварин та рослин. Широко застосовується для одержання гібридом. Це хімічний метод.

3. Злиття клітин з використанням лазерного та нейтронного опромінення. Фізичний метод.

4. Електрозлиття. Для цього способу використовують суспензію клітин високої концентрації. Її поміщають у електричне поле (між двома різнойменними зарядами). Вздовж силових ліній височастотного

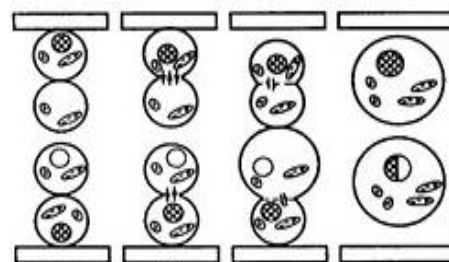


Рис. 23. Електрозлиття клітин

електричного поля клітини розташовуються ланцюжками. Спочатку відбувається утворення пор у мембрані, об'єднання мембран, потім об'єднуються цитоплазми і формується гібридна клітина. Фізичний метод.

5. Авдин – біотиновий метод. Клітини одного типу (міелома) з'єднують з авдином, клітини іншого типу (імунні лімфоцити) безпосередньо або через антитіла з'єднують з біотином (вітамін Н). Такі мічені клітини у суспензії поєднуються попарно і в результаті дії електричного поля, в яке їх поміщають, утворюються гібридні клітини.

6. Метод проточної цитометрії. Цей метод застосовують для виділення клітин, що знаходяться на певній стадії клітинного циклу та їх синхронізації. Отримані таким шляхом клони життєздатні і дають початок клітинним клонам;

Для індукції злиття клітин використовуються речовини різної природи. Йони Ca^{2+} , поліетиленгліколь, лізолецитин, моноолеат гліцерину, вірус Сендай. Лізолецитин – поверхнево-активна речовина ліпідної природи, продукт деградації лецитину шляхом обробки останнього фосфоліпазою А. Лізолецитин пошкоджує мембрани і токсичний для живих систем. Цитотоксичний ефект цієї речовини можна зменшити, знижуючи його концентрацію або додаючи під час обробки альбумін. Моноолеат гліцерину також сполука ліпідної природи, але його пошкоджуюча дія менш виражена, а ймовірність злиття клітин при застосуванні цієї речовини зростає в 4-7 разів порівняно зі спонтанним процесом. Інші аглютинуючі агенти: лектини рослин та антитіла. Перевага вірусу Сендай – відсутність цитотоксичного ефекту. Вірус інактивують, опромінюючи ультрафіолетовою лампою впродовж 5-ти хвилин. За таких умов він втрачає здатність до розмноження, але зберігає можливість сприяти гібридизації клітин. Застосування вірусу Сендай має два недоліки:

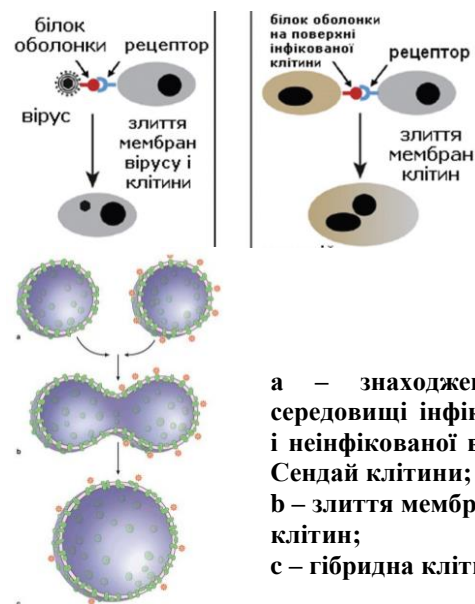
- вірус потрібно культивувати, титрувати, концентрувати й інактивувати, що є досить затратною і тривалою у часі процедурою;
- клітини рослин і грибів не мають рецепторів до цього вірусу, тому він не придатний для їхньої гібридизації.

Вірусні рецептори – унікальні структури, які можна побачити за допомогою електронної мікроскопії (хвостові структури Т-фагів, грибоподібні вирости оболонки вірусу імунодефіциту людини) або морфологічно менш виражені структури, що складаються з глікопротеїдів на поверхні вірусних оболонок (гемаглютинін в ортоміксовірусів). Рецепторні ділянки зазвичай розташовуються на дні

заглибин і щілин поверхні віріону, що захищає їх від дії специфічних противірусних блокуючих антитіл, діаметр яких більший, ніж діаметр щілини. На ефективність адсорбції вірусу на клітинній мембрані впливає концентрація вірусів, температура і стан клітини, наявність у середовищі електролітів (катионів) і вільних амінокислот – кофакторів адсорбції, видова специфічність. Зазвичай тваринна клітина містить близько 500000 рецепторів, тому на ній можуть сорбуватися безліч віріонів.

Вірусінфікована клітина набуває здатності зливатися з неінфікованою за рахунок присутності на мембранах білків злиття.

Поліетиленгліколь також спричиняє агрегацію клітин, хоча механізм його дії до кінця невідомий. У водному розчині ПЕГ несе невеликий негативний заряд. Досліджено посилення аглютинації клітин, спричиненої ПЕГ: двовалентні йони, очевидно, утворюють містки між ПЕГ і негативно зарядженими цукоридами на клітинній поверхні.



а – знаходження у середовищі інфікованої і неінфікованої вірусом Сендай клітини;
 б – злиття мембран клітин;
 в – гібридна клітина.

Рис. 25. Отримання гетерокаріону у результаті гібридизації клітин з використанням вірусу Сендай

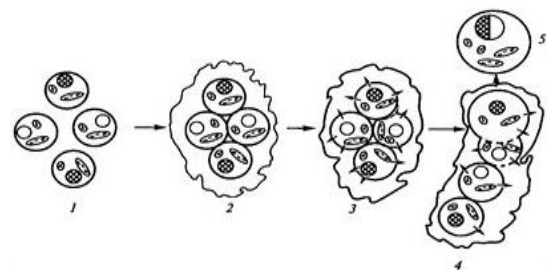


Рис. 26. Використання ПЕГ для гібридизації клітин:

- 1 – ізольовані клітини;
- 2 – агрегація клітин за дії ПЕГ;
- 3 – утворення пор;
- 4 – злиття мембран;
- 5 – утворення гібридної клітини

Відповідно до іншої гіпотези, протопласти зливаються внаслідок дегідратації. Поглинання води індукує утворення пор на поверхні мембрани і відбувається перетікання внутрішньоклітинного матеріалу. Після злиття пори певний час зберігаються. Існує два припущення, що пояснюють виникнення пор:

1. За високої концентрації ПЕГ (20-30%) поглинає усю вільну воду з клітини, призводячи до пошкодження мембрани;
2. ПЕГ перерозподіляє полярні і гідрофобні компоненти мембрани, що стабілізують ліпідні шари.

Лектини й антитіла – дво- або полівалентні сполуки; їхня аглютинуюча функція пов'язана зі здатністю однієї молекули якоїсь із цих сполук взаємодіяти з рецепторами, що є на поверхні двох клітин, що й призводить до утворення зв'язку між клітинами. Достатня кількість таких молекулярних зв'язків може утримувати клітини разом.

5. 3. Біотехнологія одержання особливих типів гібридних клітин

Особливі типи гібридних клітин: а) гібридна клітина, вихідними елементами якої є **каріопласт** (ядро, оточене тонким шаром цитоплазми) однієї клітини і **цитопласт** (без'ядерна цитоплазма) іншої;

б) **цибрид** – гібридна клітина, вихідними елементами якої є ціла клітина і цитопласт іншої клітини;

в) **каріобрид** – гібридна клітина, вихідними елементами якої є ціла клітина і каріопласт іншої клітини.

Каріопласти можна отримати за допомогою цитохалазинів – речовин, синтезованих грибами. Цитохалазин В, руйнуючи структуру мікрофіламентів, сприяє

унікальному розташуванню ядра, коли воно залишається з'єднаним із клітиною

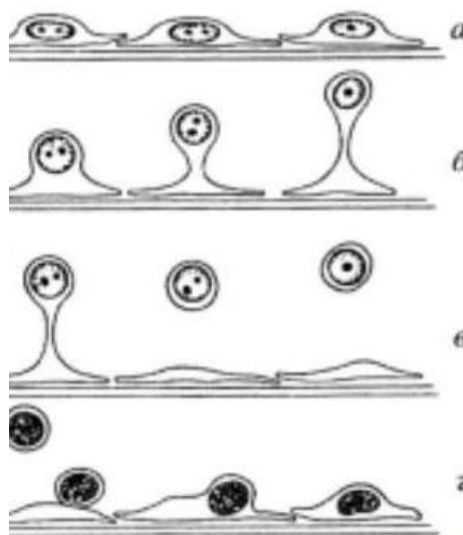


Рис. 27. Одержання каріо- і цитопластів.

А – клітини культури, оброблені цитохалазином;

Б – центрифугування клітин;

В – відокремлення каріопласту;

Г – трансплантація у цитопласт чужорідного ядра

тонкою стебелинкою цитоплазми. Під час центрифугування у більшості клітин такий зв'язок руйнується й утворюються еноклейовані (без'ядерні) клітини (цитопласти); ядра, що відокремилися при центрифугуванні (каріопласти, чи мініклітини), оточені тонким шаром цитоплазми і плазматичною мембраною.

Наступна операція, спрямована на одержання популяції цитопластів, - відокремлення їх від цілих клітин, що залишилися, позаяк у деяких випадках (лінія клітин мишачої гепатоми *Hepa2*) ефективність еноклеації не перевищує 50 %. З цією метою, еноклейовані (цитопласти) і цілі клітини, що містяться на поверхні пластикових чашок і скляних дисків, знімали, обробляли трипсином, внаслідок чого в 1 мл сольового розчину з фосфатним буфером містилося 10^6 цілих клітин і цитопластів. Клітинно-цитопластичну суміш нашаровували на 14 мл лінійного градієнта ренографіну 76, який знаходився у центрифужній пробірці, об'ємна концентрація його змінювалася від 15 до 30%, і центрифугували за $1000g$ і $25^\circ C$ впродовж 5-ти хв. Чітко розмежовані шари цілих клітин і цитопластів видаляли з центрифужної пробірки і використовували за призначенням.

Цитопласти містять усі види органел, властиві нормальній клітині, зберігають характерну для цілих клітин здатність прикріплюватися до субстрату й утворювати складчасту мембрану, пересуватися і здійснювати піноцитоз. Навколо каріопластів знаходиться шар, на частку якого припадає близько 10% клітинної цитоплазми, що містить компоненти ендоплазматичного ретикулуму, деяка кількість мітохондрій і рибосом; центріолі в каріопластів, на відміну від цитопластів, відсутні. Близько 10 % каріопластів деяких клітинних ліній здатні відновлювати весь обсяг утраченої при еноклеації цитоплазми і знову перетворюватися на життєздатні клітини.

Після еноклеації клітин моношар цитопластів у пластикових чашках діаметром 60 мм чи скляних дисках діаметром 14мм інкубують у поживному середовищі за $37^\circ C$ впродовж 1-2 годин, а потім – 20хв і охолоджують до $4^\circ C$. За цієї температури моношар двічі відмивають розчином Ерла (pH 8,0), 20хв. обробляють 0,5мл охолодженого розчину Ерла з інактивованим вірусом

Сендай. Каріопласти, суспендовані в сольовому розчині на фосфатному буфері, вносять до моношарової культури цитопластів з таким розрахунком, щоб на один цитопласт припадало 100 каріопластів. Для адсорбування каріопластів на цитопластах, покритих вірусними частинками, інкубують за 4°C впродовж 45хв; через кожні 3–5хв чашки злегка погойдують. Для злиття каріопластів і цитопластів чашки чи скляні диски переносять у термостат і витримують там за 37°C впродовж 45хв. Після закінчення цього часу моношар на чашках кілька разів інтенсивно відмивають розчином Ерла чи живильним середовищем без сироватки, щоб видалити каріопласти, які не злилися. Потім чашки заповнюють живильним середовищем, придатним для культивування того типу клітин, що були використані як донори каріопластів. Цитопласти, що не злилися з ядрами, гинуть і приблизно через 2 дні відокремлюються від поверхні чашки. Для одержання незабруднених цитопластами культур рекомендується центрифугування гібридних клітин у градієнті щільності ренографіну.

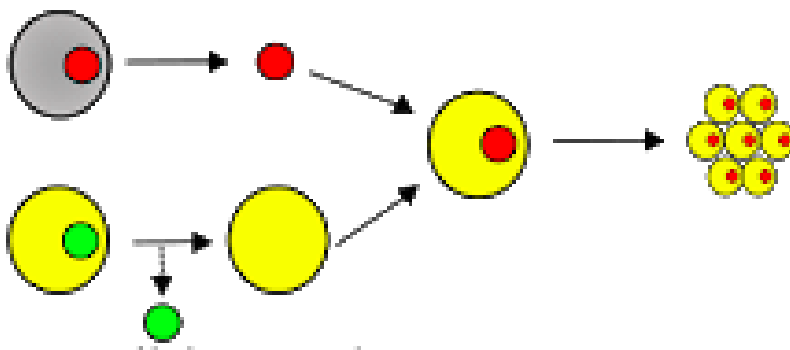


Рис. 28. Схема трансплантації ядра в енуклеювану клітину

Використання методу гібридизації соматичних клітин дає можливість вивчати механізми первинної дії і взаємодію генів. Культури соматичних клітин використовуються для визначення мутагенної дії факторів навколишнього середовища. Розширюються можливості точної діагностики захворювань на біохімічному рівні у дорослих і до народження плодів (пренатальна діагностика). Для удосконалення цих методів необхідно нагромаджувати лінії клітин з генними і хромосомними мутаціями. Існують банки клітинних ліній гібридів.

Контрольні питання:

1. Що таке гібридизація, міжвидові, внутрішньовидові клітинні гібриди?
2. Одержання гетерокаріону, синкаріону.
3. Селекція гібридних клітин.
4. Методи злиття клітин.
5. Застосування вірусу Сендай і ПЕГ.
6. Особливі типи гібридних клітин.
7. Одержання протопласту.
8. Одержання каріопласту.
9. Трансплантація ядер.
10. Використання гібридів клітин.

РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ГІБРИДОМ, МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ

7. 1. Антитіла та антигени

Під час введення в організм тварини чи людини чужорідних макромолекулярних речовин (*антигенів*) у крові з'являються захисні білки – *антитіла*.

Антигени – це біополімери, природні або синтетичні сполуки, які розпізнаються лімфоїдними клітинами і здатні спричиняти імунну відповідь – синтез антитіл.

Природа антигенів:

- ✓ Білки;
- ✓ Поліцукориди, ліпіди, нуклеїнові кислоти;
- ✓ Гаптени – низькомолекулярні речовини + білок



Рис. 29. Антитіло-антиген

Для антитіл характерна особлива специфічність. Кожне антитіло впізнає тільки свій антиген, а точніше лише одну його детермінантну групу (*епітоп*)

Детермінантна група складається з декількох амінокислот (зазвичай з 6-8), що утворюють просторову структуру, характерну для даного білка. В одному білку, що складається з декількох сотень амінокислот, є кілька (5-15) різних детермінант, тому до одного білка формується родина різних за своєю специфічністю антитіл – *поліклональних антитіл*. Навіть до одної детермінанти утворюється цілий спектр антитіл, які різняться структурою, ступенем специфічності і міцності зв'язування с нею. Те ж саме

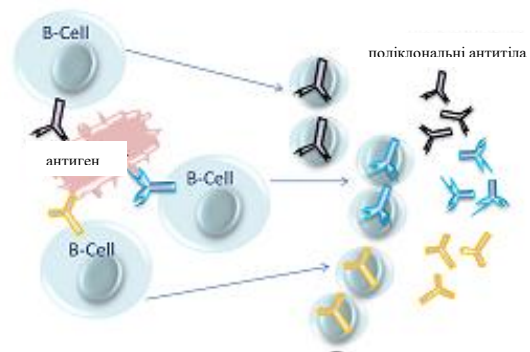


Рис. 30. Синтез поліклональних антитіл до одного антигена

стосується поліцукоридів, детермінантні групи яких утворюються залишками 3-6-ти моноцукоридів.

На мембранах ***B- лімфоцитів*** розміщуються молекули антитіл (імуноглобулінів). Антитіла можна виділити із сироватки крові Амонію сульфатом, спиртом, ПЕГ у складі фракції γ -глобулінів. Виділена фракція буде сукупністю поліклональних антитіл. Синтезувати *in vitro* антитіла звичними способами неможливо. Одержати антитіла одного типу важливо, позаяк вони застосовуються у сучасних методах дослідження, зокрема імуноферментному аналізі. У даному випадку важливою характеристикою антитіл має бути вузька специфічність.

7.2. Шлях до одержання гібридом

Завдання: стимулювати синтез одного типу антитіл – моноклональних антитіл.

Для вирішення цього завдання випробувано різні методи і шляхи, серед яких:

1. намагання виростити окремі клони антитілоутворюючих клітин *in vitro*, де вони продукуватимуть антитіла до однієї детермінанти антигену. **Неможливо:** клітини ***B-лімфоцити*** смертні. Після переведення у культуру гинуть, не утворивши клонів антитіл. Внесення до культури В-лімфоцитів чинників росту дещо подовжує їхнє життя, але теж не вирішує проблеми.
2. трансформування лінії В-лімфоцитів вірусом Епштейна-Барр (ВЕБ) для отримання ними властивості «безсмертя». ВЕБ, виділений з клітин африканської лімфоми, трансформує В-лімфоцити у лімфобластоїдні клітинні лінії, але синтезовані цими клітинами препарати антитіл містять вірус, тому їх не використовують для лікування, лише для діагностики.
3. Створення гібридом для одержання специфічних антитіл (**моноклональних антитіл**). **Вірний шлях у вирішенні завдання.**

Жорж –Жан-Франц Келлер у 70-их роках досліджував частоту мутацій

В-лімфоців (працював над дисертацією). З цікавості гібридизував їх з клітинами мієломи за допомогою ПЕГ. В результаті утворилась **гібридома**, яка успадкувала від нормальної клітини здатність синтезувати специфічні антитіла, а від пухлинної – безсмертність.

Цезар Мільштейн дозволив **Келеру** продовжити роботу в лабораторії молекулярної біології Медичної науково-дослідної ради Кембріджського університету. Вони першими запропонували **спосіб одержання гібридом**. В 1984р. Жоржу-Жан-Францу Келлеру та Цезару Мільштейну було присуджено Нобелівську премію з фізіології як авторам розробки гібридом, що синтезували моноклональні антитіла (МКА).

Отже, **гібридоми** – клітини, одержані у результаті злиття **В-лімфоцитів** з пухлинною клітиною. Гібридами здатні нескінченно проліферувати і продукувати специфічні антитіла. Антитіла, що синтезуються одним клоном гібридом, одержали назву **моноклональних**.

З цього моменту розпочався бурхливий розвиток біотехнології у даному напрямку, який призвів до широкого застосування МКА в діагностиці, лікуванні.

У США, станом на 2005р., дозволено використовувати для лікування 18 препаратів МКА. Особливо важливе значення для онкології має група МКА, що реагують з пухлинними клітинами.

7.3. Етапи одержання моноклональних антитіл

1. Імунізація тварин і отримання В-лімфоцитів.
2. Гібридизація клітин.
3. Селекція гібридних клітин і вирощування гібридом.
4. Тестування гібридом на продукцію антитіл.
5. Клонування гібридом.
6. Масове продукування гібридомних антитіл.
7. Виділення і очищення МКА.

1. Імунізація тварин і отримання В-лімфоцитів.

Технологію одержання МКА розпочинають з імунізації тварини. Через три-чотири дні після імунізації з організму мишей із селезінки виділяють субпопуляції В-лімфоцитів, які реагують антитілоутворенням (рис. 1, 2).



Рис. 31. Імунізація тварин



Рис. 32. Розтин тварин з метою відбору субпопуляції В-лімфоцитів

2. Гібридизація клітин.

В-лімфоцити суспендують із клітинами мієломи мишей *BALB/c* за наявності ПЕГ молекулярною масою 1000–4000 у концентрації 35–50% або присутності вірусу Сендай, що призводить до появи гібридів пухлинних клітин.

Існує два шляхи синтезу попередників нуклеїнових кислот у клітині: основний та обхідний. Основний – це шлях синтезу нуклеотидів *de novo* за участю дигідрофолатредуктази, який можна заблокувати аміноптерином (А). Якщо блоковано основний шлях синтезу, активується обхідний – синтез нуклеотидів та нуклеїнових кислот за рахунок реутилізації продуктів розпаду нуклеїнових кислот, попередників гіпоксантину (Г), тимідину (Т), за участю **гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази (ГГФРТ)**.

Лімфоцити мають ензим ГГФРТ, який додатково обхідним шляхом забезпечує синтез пуринових нуклеотидів, що необхідні для синтезу ДНК та РНК. **Пухлинні клітини** дефектні за наявністю ГГФРТ (рис. 33).

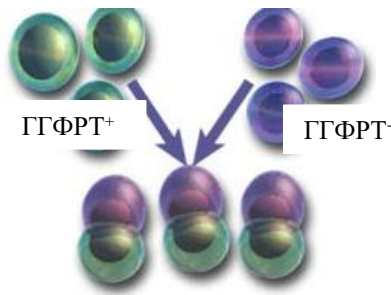


Рис. 33. Гібридизація клітин

3. Селекція гібридних клітин і вирощування гібридом.

Суміш клітин відмивають та інкубують у **селективному середовищі**, яке містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (ГАТ). При цьому виживають тільки гібридні клітини.

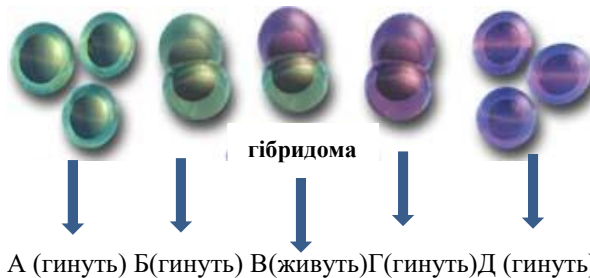


Рис. 34. Різноманітність типів клітин у середовищі ГАТ. А, Б – В-лімфоцити, гібридизовані В-лімфоцити між собою; В – гібридоми; Г, Д – клітини мієломи, гібридизовані клітини мієломи між собою

- ✓ Клітини лімфоцитів і клітини лімфоцитів селезінки, що злились (лімфоцит-лімфоцит) або не ростуть у культуральному середовищі, або термін їх життя кілька днів. **Гинуть!!!!** (рис. 34)
- ✓ Мієломні клітини і клітини мієломи, що злились (мієлома-мієлома) не можуть синтезувати пуринові основи (Г, А), а отже, й нуклеїнові кислоти обхідним шляхом, бо дефектні за ГГФРТ. Синтез пуринів за участі дигідрофолатредуктази для них теж неможливий, оскільки у середовищі є аміноптерин, який інгібує активність цього ензиму, тому вони теж **гинуть!!!** (рис. 34)

Гібридоми, ростуть в середовищі ГАТ (рис. 34) оскільки:

- ✓ 1. Від батьківських клітин лімфоцитів успадкували ГГФРТ.
- ✓ 2. Від клітин мієломи успадкували «безсмертя».

Гібридоми культивують у середовищі ГАТ з фідерними клітинами

(клітини перитонеального ескудату) та клітинами селезінки і тимусу, які продукують у середовище фактори росту і здійснюють фагоцитоз загиблих клітин.

4. Тестування гібридом на продукцію антитіл.

Контролюють синтез антитіл за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА).

5. Клонування гібридом.

Через 3-4 тижні ГАТ замінюють на ГТ, а через кілька днів після цього на середовище без селективних добавок.

Клонування гібридом – розділення клітин і нарощування окремих клонів з однієї клітини (рис. 35, 36).

Клітинну суспензію розводять культуральним середовищем і висівають у лунки (рис. 37). Після культивування середовище

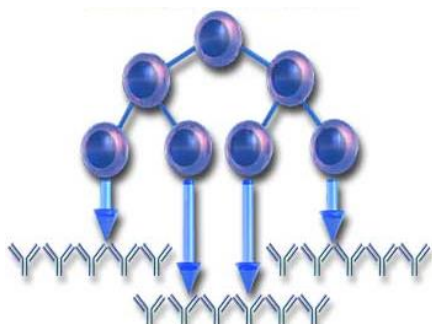


Рис 36. Походження клонової популяції клітин і синтез МКА

тестують на наявність антитіл. При отриманні більше однієї специфічної гібридом, проводять дослідження на виявлення факту: чи направлені антитіла, синтезовані різними гібридомами проти однієї й тої ж детермінанти.

Кожен клон, що продукує моноклональне антитіло, можна підтримувати у культурі безкінечно. Взірці можна заморозити у рідкому Нітрогені.

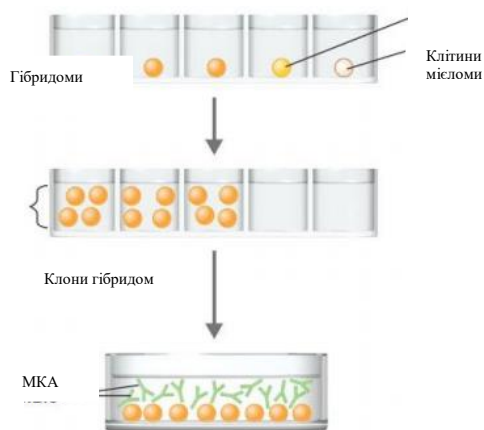


Рис. 35. Клонування гібридом

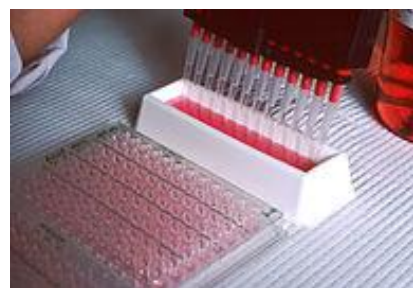


Рис. 37. Висівання суспензії гібридом

6. Масове продукування гібридомних антитіл.

МКА отримані, вирощуючи гібридами *in vitro* (рис. 38), синтезують 5–10мкг антитіл на 1мл середовища. За допомогою спеціальних носіїв цю кількість можна збільшити до 100мкг/мл.



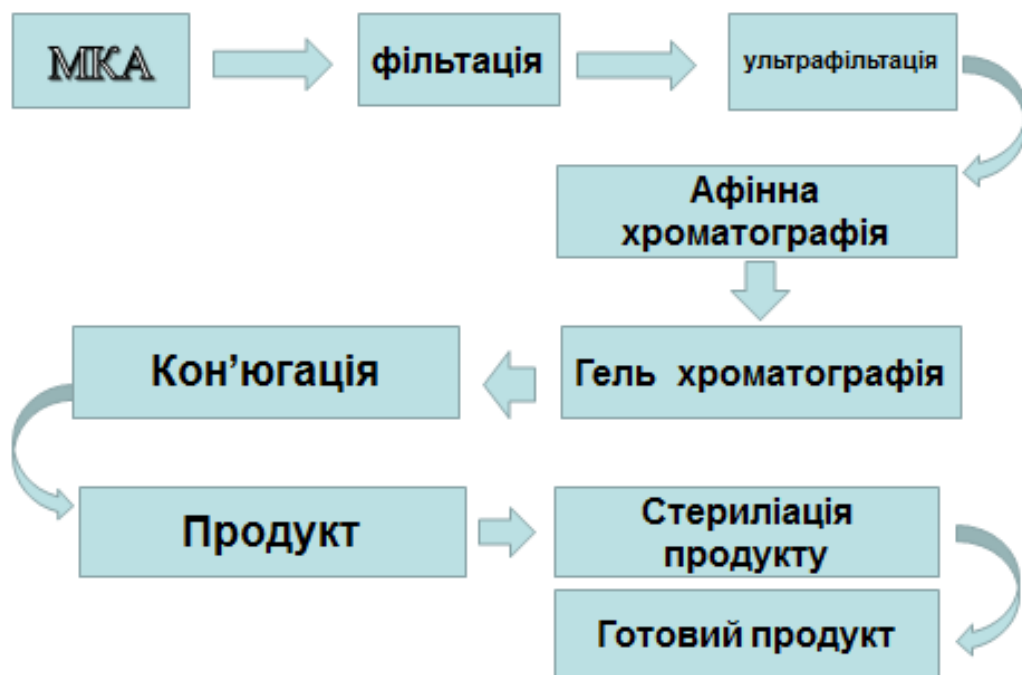
Рис. 38. Нарощування біомаси гібридом і синтез МКА *in vitro*

Другий спосіб отримання МКА – синтез *in vivo*. Гібридами можна ввести мишам, вони утворюють в організмі миші асцитні пухлини (рис. 39). При цьому отримують від 15мг антитіл із 1мл асцитної рідини.



Рис. 39. Синтез МКА *in vivo*

7. Виділення і очищення МКА.



7. 4. Застосування МКА у ІФА

Метод імуноферментного аналізу (ІФА) чи ELISA-тест (*enzyme linked immunoabsorbent assay* – визначення за допомогою імуносорбентів, пов'язаних з ензимами) запропоновано у 1971 році Е. Енгвалл та Р

Метод ІФА базується на двох наукових відкриттях:

1. Здатність ензимів та антитіл зв'язуватись з твердою основою;
2. Створення комплексу антитіло-ензим (Ab-F) – кон'югату.

Будь-яку речовину у біоматеріалі, яка володіє властивостями антигену, можна кількісно визначити ІФА. Для проведення цього методу необхідно мати очищений антиген, специфічне антитіло, ензим як мітку для антигена чи антитіла і засіб реєстрації активності ензиму (спектрофотометр). Усі компоненти є складовими тест-систем (діагностикумів). Основою ІФА є специфічна взаємодія антитіла з антигеном, при цьому один з компонентів кон'югованих з ензимом (кон'югат), в результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом, утворює забарвлений продукт, концентрацію якого можна визначити спектрофотометрично.

Імуноферментні кон'югати – це ковалентно зшиті молекули антигенів або антитіл з ензимом-міткою. Одним із біологічних феноменів, на якому базується ІФА, є висока каталітична активність ензимів-індикаторів в ІФА.

Основними ензимами-мітками є:

- ✓ *пероксидаза хрому* – ензим, що найчастіше використовується;
- ✓ *лужна фосфатаза* – дуже стабільний, але дорогий ензим;
- ✓ *β -D-галактозидаза* – рідко використовується;
- ✓ *глюкооксидаза* – рідко використовується.

За допомогою ІФА можна визначити токсичні речовини у продуктах харчування навіть за їх незначної концентрації. ІФА складається з двох компонентів – імунної реакції та ферментної. Під час імунної власне відбувається зв'язування антигена з антитілом. Після цього цей створений комплекс мітять ензимом для можливості виявити його кольоровою реакцією. Тобто ферментна реакція допомагає побачити і виміряти результат імунної реакції.

Застосування ІФА



для визначення

- гормонів,
- онкомаркерів,
- ліків у крові хворого,
- наркотиків,
- бактерій, вірусів та антитіл проти них

За низьких концентрацій речовин у зразку:
 10^{-9} – 10^{-12} М

Весь процес твердофазового ІФА можна уявити так:

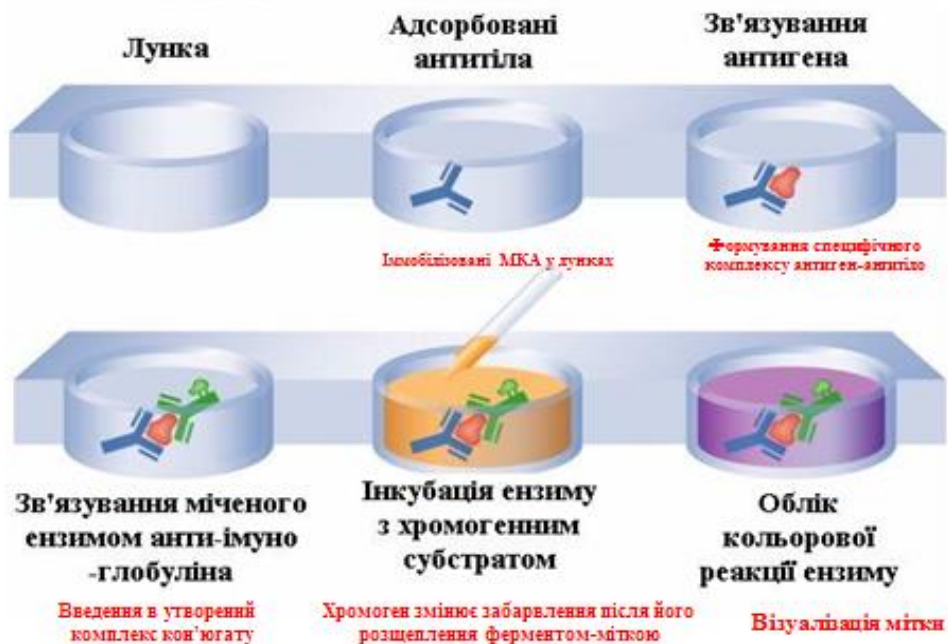


Рис. 40. Схема ІФА

Основними перевагами ІФА є:

1. висока чутливість і специфічність
2. відтворюваність результатів
3. простота виконання
4. доступність та стабільність реагентів
5. експресивність та можливість автоматизації для проведення масових аналізів.

Лабораторна робота №11

Тема: Визначення антитіл до тиреопероксидази (АТ ТПО) у сироватці крові ІФА

Мета: опрацювання методу ІФА.

Завдання:

1. Визначити антитіла до тиреопероксидази (АТ ТПО) у сироватці крові ІФА.

Розроблено тест-систему для визначення антитіл (АТ) до тиреопероксидази (ТПО) у сироватці крові. У лунку планшета з іммобілізованим антигеном (тиреопероксидази) вносять досліджуваний зразок. АТ до ТПО зразку зв'язується з антигеном на поверхні лунки, утворюючи комплекс антитіло-антиген. Незв'язаний матеріал видаляється промиванням. У лунку вносять кон'югат (антитіла проти IgG людини, мічені пероксидазою). Після чергового відмивання активність ензиму, зв'язаного на поверхні лунки планшета, візуалізується після внесення хромогенного субстрату, та вимірюється за довжини хвилі 450нм. Інтенсивність кольорової реакції прямо пропорційна кількості АТ до ТПО у зразку.

Обладнання, реактиви, матеріали

сироватка крові, одно- та багатоканальні мікродозатори фіксованого або змінного об'єму 5–1000мкл, термошейкер, аналізатор імуноферментний з довжиною хвилі 450нм.

Тест-система:

1. Планшет з іммобілізованим антигеном та мікропробірки для попереднього розведення сироватки, 8x12 лунок;
2. Стрічки для заклеювання планшетів;
3. Розчини для попереднього розведення сироваток і розведення досліджуваного зразку;
4. Набір калібраторів та контролю по 1,0мл (всього 5 калібраторів: 0, 30, 100, 300, 1000 МОд/мл; 1 контроль);
5. Відмиваючий розчин концентрат 20х, 22мл;

6. Кон'югат, 11мл;
7. Субстрат, 11мл;
8. Стоп-реагент, 11мл.

Хід роботи

1. Помістіть у рамку потрібну кількість стрипів – 12 лунок для калібраторів, контролю та зразків у 2-ох паралелях;
2. Внесіть у лунки 100мкл калібраторів, контролю та попередньо розведених досліджуваних зразків з розчином для розведення зразків згідно інструкції до тест-системи («Бест діагностик»);
3. Інкубуйте 30 хвилин за 37°C у термошейкері;
4. Відмийте стрипи 3 рази промиваючим розчином;
5. Внесіть у лунки 120мкл кон'югату;
6. Інкубуйте 30 хвилин за 37°C у термошейкері;
7. Відмийте стрипи 5 разів промиваючим розчином;
8. Внесіть у лунки 100мкл субстрату;
9. Інкубуйте 15 хвилин за 20–25°C в темному місці;
10. Внесіть у лунки 100мкл стоп-реагенту;
11. Виміряйте оптичну щільність (ОЩ) у лунках на аналізаторі імуноферментному за довжини хвилі 450 нм. Бланк фотометра виставляйте проти нульового калібратора.
12. Побудуйте калібрувальну криву і визначіть концентрацію ТПО за допомогою комп'ютерної програми.

Висновок _____

Контрольні питання:

1. Що таке антиген, природа антигена?
2. Антитіло, специфічність – основна властивість антитіл.
3. Історія відкриття гібридом.

4. Шляхи вирішення проблеми синтезу МКА.
5. Біотехнологія одержання гібридом, МКА.
6. ГГФРТ.
7. Селективне середовище ГАТ.
8. Чому у середовищі ГАТ виживають лише гібридами?
9. Імуноферментний аналіз.
10. Застосування ІФА.

ГЛОСАРІЙ

ATCC *American Type Culture Collection* – американський банк біоматеріалів, який активно використовується у всьому світі для науково-дослідних робіт.

Адгезія – контакт клітин між собою і субстратом, що пригнічує процеси росту клітин.

Антигени – це біополімери, природні або синтетичні сполуки, які розпізнаються лімфоїдними клітинами і здатні спричиняти імунну відповідь – синтез антитіл.

Антигенна детермінанта (епітоп) – ділянка білкової або поліцукоридної молекули, що володіє здатністю спричиняти утворення антитіл певної специфічності.

Антитіло – білок (імуноглобулін), утворений імунною системою організму тварин у відповідь на введення антигена і здатний вступати з ним у специфічну взаємодію.

Ауксотрофні клітини – клітини, що позбавлені можливості синтезувати певну речовину, яка необхідна для їх росту, але за наявності цієї речовини у середовищі такі клітини можуть рости і розвиватися.

Біпотентність – здатність клітини диференціюватись у два типи клітин.

Внутрішньовидові гібриди – гібриди, отримані при злитті клітин одного виду, які різняться між собою за морфологічними, біохімічними, імунологічними або функціональними властивостями.

Гетерокаріони – багатоядерні клітини, до складу яких входять ядра різних клітин.

Гібридизація – процес одержання гібридів, який ґрунтується на об'єднанні генетичного матеріалу різних клітин.

Гібридизація соматичних клітин – злиття нестатевих клітин, спосіб отримання соматичних гібридів.

Гібридома – гібридна клітина, отримана шляхом злиття пухлинної мієломної клітини з нормальними лімфоїдними клітинами імунізованих тварини або людини. Володіє здатністю до необмеженого росту і синтезу моноклональних антитіл.

Гомокаріони – багатоядерні клітини, що містять ядра тільки одного клітинного типу.

Диплоїдна клітинна лінія – лінія, у якої не менше 75% клітин з каріотипом, що характеризує нормальні клітини організму.

Диплоїдна культура – це культура клітин, яку найчастіше отримують з ембріональних тканин, диплоїдний набір хромосом яких зберігається до 50-ти пасажів.

Диференціація – здатність набути ознак спеціалізованої клітини.

Іморталізація – здатність до необмеженої проліферації, мінімальна трансформація, перший етап трансформації клітини у злоякісну, пов'язана з експресією онкогенів.

Каріобрид – гібридна клітина, вихідними елементами якої є ціла клітина і каріопласт іншої клітини.

Кількість пасажів – кількість перенесень культивованих ембріонів, органів, експлантів чи клітин з однієї посудини в іншу.

Клітинна культура (культура клітин) – культура початково роз'єднаних (дезагрегованих) клітин.

Клітинна лінія – культура однорідних клітин, яка виникає з первинної культури після першого пасажу.

Клітинна селекція – сукупність методів відбору клітинних ліній з новими успадкованими знаками в умовах *in vitro*.

Клонування клітин – розділення клітин і нарощування окремих клонів з однієї клітини.

Контактне гальмування поділу клітин – пригнічення поділу клітин у моношаровій культурі після контакту між собою.

Контактне гальмування руху клітин – зниження локомоторної активності клітин та затримка просування однією клітиною по поверхні іншої після контакту між собою.

Кріозбереження, кріоконсервування (анг. *cryopreservation*) – складний багатоетапний процес, метою якого є тривале зберігання життєздатних клітин в стані холодового анабіозу.

Кріопротектори – речовини, використання яких дозволяє запобігти утворенню кристаликів льоду і виникненню осмотичного шоку – проблем, що спостерігаються в процесі заморожування клітин.

Культивування клітин, тканин, експлантів *in vitro* – збереження життєдіяльності клітин, тканин, експлантів поза організмом.

Культура тканин тварин і людини – система підтримання впродовж більше, ніж 24 год. життєздатності ембріонів, зачатків органів, цілих органів, експлантів чи клітин, отриманих від тварин чи людини.

Ламінар – це локальне стерильне робоче місце.

Ліміт Хейфліка (англ. *Hayflick limit*) – межа поділу соматичних клітин.

Міжвидові гібриди – гібриди, отримані при злитті клітин тварин різних видів, відрізняються від вихідних батьківських клітин генотипом.

Мітогени – речовини, що стимулюють мітоз.

Моноклональні антитіла – антитіла одного типу з певною специфічністю до одного епітопа (антигенної детермінанти), синтезовані гібридомами.

Моношар – клітинний шар товщиною в одну клітину, що росте на поверхні субстрату.

Мультипотентність – здатність клітини диференціюватись у різновиди клітин одного типу спеціалізованої тканини.

Онкогенність – здатність біологічних агентів (вірусів, нуклеїнових кислот, клітинного субстрату, хімічних речовин, субклітинних елементів та ін.) спричиняти онкогенну трансформацію клітин при введенні тваринам (при цьому пухлина розвивається і складається із клітин господаря).

Органна культура – культура, в якій невеличкі фрагменти тканини або цілі ембріональні органи експлантуються зі збереженням тканинної архітекτονіки і розташовуються у поживному середовищі, куди окремі клітини спонтанно мігрують з фрагментів тканини зі збереженням мітотичних процесів у них.

Пасажування (субкультивування, пересів) – перенесення культивованих ембріонів, органів, експлантів чи клітин з однієї посудини в іншу.

Первинна культура (первинно-трипсинізована) – культура, джерелом клітин якої є органи, експланти чи клітини, отримані безпосередньо з організму.

Плюрипотентність – здатність клітини диференціюватись у будь-який тип соматичних клітин ссавців, у тому числі й людини.

Полікаріони – багатоядерні клітини.

Постійні клітинні культури (перещеплювані) – культури, які здатні до необмеженої кількості пасажів (використовують також термін «безсмертна» клітинна культура).

Проліферація – процес поділу клітин.

Селективні середовища – поживні середовища, на яких можуть рости лише клітини з певними властивостями.

Середовища поживні – субстрати, які використовують для культивування в умовах *in vitro* культур тканин.

Синкаріон – клітинний гібрид, що утворюється внаслідок злиття у гетерокаріонах ядер після злиття клітин.

Синхронізація клітин – перебування усіх клітин популяції в одній фазі клітинного циклу.

Стовбурові клітини – це клітини, в яких відсутні тканино специфічні структури і які здатні до проліферації та диференціювання.

Субстратзалежна культура – культура, в якій клітини зберігають життєдіяльність у вигляді моношару прикріпленого до субстрату.

Суспензійна культура – культура, в якій окремі клітини зберігають життєдіяльність у завислому стані у рідкому середовищі.

Тотипотентність – властивість соматичних клітин повністю реалізувати свій потенціал розвитку аж до створення цілого організму.

Трансформація – зміна спадкових властивостей клітини у результаті зміни генетичної інформації.

Трансформація клітин у культурі – незворотна (успадковується) зміна властивостей культивованих клітин внаслідок дії певного фактора (генетичний матеріал, хімічні агенти, опромінення).

Трансформація клітини – процес перетворення нормальної клітини на пухлинну.

Трансформована клітина – клітина, що набула ознак, характерних для злоякісного росту.

Туморогенність – здатність клітин тканинних культур спричиняти пухлини у чутливих тварин в місці їх введення, можливо з утворенням метастазів (пухлина розвивається і складається із інокульованих клітин).

Уніпотентність – здатність клітини диференціюватись в один тип клітин.

Фактори росту – білки, які безпосередньо і специфічно беруть участь у стимуляції клітинного поділу.

Цибрид – гібридна клітина, вихідними елементами якої є ціла клітина і цитопласт іншої клітини.

Цикл росту культури клітин – це період від моменту висівання клітин у свіже культуральне середовище до наступного субкультивування.

Щільність клітин – кількість клітин моношарової культури у розрахунку на одиницю площі дна культурального посуду (на 1 см²).

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Базова

1. Bourg H., Lisle A. Biomaterials developments and applications. USA : Nova Science Pub. Inc. 2010. 497 p.
2. Brown T. A. Gene cloning and DNA analysis. An Introduction. Chichester : Wiley-Blackwell, 2010. 320 p.
3. Clark D. P., Pazdernik N. J. Biotechnology. Amsterdam : Elsevier Inc., 2012. 767 p.
4. Glick B., Pasternak J. Molecular Biotechnology. Principles and Applications. M.: Mir, 2010. 585 p.
5. Passetto B.V. Basic processes of chemical synthesis of biologically active substances. GEOTAR-MED, 2012. 376 p.
6. Principles of Regenerative Medicine. 3rd Edition. Editors: Anthony Atala Robert Lanza Tony Mikos Robert Nerem. Academic Press, 2018. 1454 p.
7. Principles of Translational Science in Medicine. From Bench to Bedside. Second Edition. Edited by Martin Wehling. Elsevier, 2015. 332 p.
8. Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine. Editors Marek J. Łos, Andrzej Hudecki, Emilia Wiecheć. Academic Press, 2019. 230 p. DOI: 10.1016/C2016-0-03365-X
9. Tissue Engineering. Second Edition. Editors Clemens A. van Blitterswijk and Jan de Boer. Elsevier, 2015. 856 p.
10. Галкін О. Ю., Ширококов В. П., Григоренко А. А. Біотехнологічні основи створення засобів серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань: монографія. К.: НТУУ «КПІ», 2015. 204 с.
11. Дробик Н. М., Гуменюк Г. Б., Грубінко В. В. Лабораторний практикум з біотехнології. Тернопіль, 2019. 124 с.
12. Карпов О. В., Демидов С. В., Кир'яченко С. С. Клітинна та гена інженерія: підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. 208 с.

13. Лобачова І. В., Жулинська О. С., Михайлова І. Г., Войтенко С. Л. Методичні рекомендації з трансплантації ембріонів овець. Полтава : РВВ ПДАА, 2013. 32 с.
14. Мадіч А.В., Шеремета В.І., Гевкан І.І., Сливчук Ю.І., Штапенко О.В., Федорова С.В. Отримання клітинних культур і можливість їх використання в ембріональній біотехнології : Навчально-методичний посібник, 128 с.
15. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології. Лабораторний практикум. Київ: Академперіодика, 2010. 232 с.
16. Молекулярна біотехнологія [Електронний ресурс]: метод. рекомендації / уклад. О. І. Скроцька. Київ : НУХТ, 2014. 34 с.
17. Пирог Т. П., Антонюк М. М., Скроцька О. І., Кігель Н. Ф. Харчова біотехнологія : підручник. Київ : Ліра, 2016. 408 с.
18. Стойка Р. С. Методичні вказівки до навчального курсу «Методи клітинної біології». Львівський державний університет, Львів, 1996. 79 с.
19. Трохимчук І. М., Плюта Н. В., Логвиненко І. П., Сачук Р. М. Біотехнологія з основами екології : навчальний посібник. Київ : Видавничий дім «Кондор», 2019. 304 с.
20. Федоренко В. О., Осташ Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 279 с.
21. Ширококов В.П., Климнюк С.І., Понятовський В.А., Бобир В.В., Виноград Н.О., Войцеховський В.Г., Галкін О.Ю. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищих мед. навч. закладів / За ред. В.П. Ширококова. Вінниця: Нова Книга, 2021. 920 с.
<https://nk.in.ua/pdf/1790.pdf>
22. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія: навчальний посібник. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.

Допоміжна

1. Кравців Р. Й., Колотницький А. Г., Буцjak В.І. Генетична інженерія: посіб. Львів, 2008. 214 с.
2. Сиволоб А.В., Рушковський С.Р., Кир'яченко С.С. Генетика: підручник / за ред. А.В. Сиволоба. Київ: Видавничо поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 320 с.
3. Фільченков О. О., Стойка Р. С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. Тернопіль: УкрМедКнига. 2006. 524 с.
4. Шемедюк Н. П. Характеристика можливостей імуноферментного аналізу / Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького, 2016, т 18, № 2 (66). SSN 2413–5550 print ISSN 2518–1327 online.

Інформаційні ресурси

1. Мікробіологія і біотехнологія. URL : <http://mbt.onu.edu.ua>
2. Nature Biotechnology. URL : <https://www.nature.com/nbt>
3. <https://core.ac.uk/download/pdf/75998736.pdf>
4. http://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Upload/Kafedry/Biochimiya/Metody_chni_rozrobky/metodychkabth1_plr.pdf
5. <http://elib.hduht.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/1136/1/%D0%9F%D1%96%D0%B4%D1%80%D1%83%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D0%93%D0%9C%D0%9E.pdf>
6. https://library.udpu.edu.ua/library_files/428513.pdf
7. <http://eprints.cdu.edu.ua/76/1/%D0%9E%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B8%20%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8F%D1%80%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%97%20%D0%BA%D1%83%D1%80%D1%81%20%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D0%B9%20%28%D0%BA%D0%BD%D0%B8%D0%B6%D0%BA%D0%BE%D1%8E%29%20%D0%9D%D0%9E%D0%92%D0%90.pdf>

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

CO₂-інкубатор 20

HeLa 15, 48

pH 16, 21, 22, 48

pH-метр 22, 23

А

Автоклав 18, 22, 28, 29

Антигени 86, 106, 109, 112 – 115

Антитіла 15, 106, 108, 111 – 115

Антитіла моноклональні 16, 105, 107, 108, 111, 112

Антитіла поліклональні 106

Апоптоз 38

Б

Безсмертя клітин 14, 15, 36, 85, 106, 108, 110

Біобезпека 17, 22, 36

Біпотентність 82

Буфер 21, 22, 24, 27, 48

В

Вакцини 13, 15, 16

Вірус Сендай 97, 99, 100, 104

Віруси 13, 15, 16, 17, 34, 37, 40, 54, 97, 99, 100, 101, 107

Водяна баня 22, 23

Г

Гетерокаріон 97

Гібридизація 6, 97, 109

Гібридизація клітин внутрішньовидова 97

Гібридизація клітин міжвидова 97

Гібридома 49, 107, 108, 110, 111

Гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансфераза 109

Д

Диференціація 30, 32, 33, 35, 38, 53, 63, 81, 83, 86, 91

Е

Ембріональні стовбурові клітини 38, 49, 81, 82, 85, 89

Ембріональні тканини 38

Епітоп (детермінанта) 106, 111

І

Імуноферментний аналіз 112 – 116

К

Каріобрид 102

Каріопласт 102

Клітинна інженерія 6, 41

Клітинна лінія 13, 18, 36, 37, 38, 85

Клітинна селекція 98

Клітинний банк 22, 37, 38

Клітинний клон 15, 110

Клітинний цикл 32, 63

Контактне гальмування 33, 37

Кріозбереження (кріоконсервування) 22, 24, 27, 32, 40, 93

Кріопротектори 93

Культура диплоїдних клітин 14, 15, 36, 37

Культура клітинна 13, 15, 31, 32, 38, 39, 116

Культура органна 31

Культура субстратзалежна 21, 33, 35

Культура суспензійна 21, 31, 33, 34, 38

Культуральний планшет 24, 25

Культуральний посуд 20, 25, 28

Культуральний флакон 20, 21, 25, 26, 33, 65

Культури первинні 35, 37, 41, 49
Культури перещеплювані 36, 37

Л

Ламінар 18 – 20, 23, 24
Латентна фаза (*lag*-фаза) 63
Ліміт Хейфліка 32
Логарифмічна фаза (*log*-фаза) 63, 94

М

Мікродозатори 22, 23, 27
Мікроскоп 18, 19, 21
Мікроскоп інвертований 21
Міогени 54
Моношар 31, 33, 35, 49, 104
Мультипотентність 81

Н

Нормальні клітини 32, 33, 34, 36, 37, 47, 49

П

Плюрипотентність 81, 85, 86
Поліетиленгліколь 99, 101, 102, 107, 109
Проліферація 16, 31, 34, 35, 38, 39, 49, 54, 63, 64, 81
Пухлинні клітини 32, 33, 37, 103, 108

Р

Рідкий Нітроген 18, 22, 93, 111

С

Середовище (живильне, культуральне) 14, 18, 21, 24, 26, 32, 34, 35, 40, 47, 49, 57, 64, 89
Середовище селективне 99
Середовище селективне ГАТ 102, 109, 110, 111
Синкаріон 97

Синхронізація селективна 64

Синхронізація індуктивна 64

Синхронізація клітин 65

Сироватка 24, 36, 47, 49, 53, 54, 57, 104

Спектрофотометр 22, 23

Стаціонарна фаза 64

Стерильність 13, 18, 19, 25, 26, 28, 29, 57

Стовбурові клітини 6, 15, 81 – 88

Субкультура 22

Т

Тотипотентність 81, 84

Трансформація 15, 33, 34, 36, 37, 49 86, 88

Ф

Фаза загибелі клітин 64

Фактор росту 15, 16, 35, 41, 53, 55, 56, 63

Фібробласти 14, 17, 32, 37, 38, 39, 41, 54, 85, 91

Фільтр 27, 57

Ц

Центрифуга 22, 23

Цибрид 102

Цитопласт 102, 104

Цитохалазини 102

Шемедюк Наталія Петрівна

Клітинна інженерія
Навчально-методичний посібник
для здобувачів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія

Підписано до друку 15.03.2024 р. Формат 60x84
Папір офсетний. Тираж 100 прим.
Видавництво “Папірус”