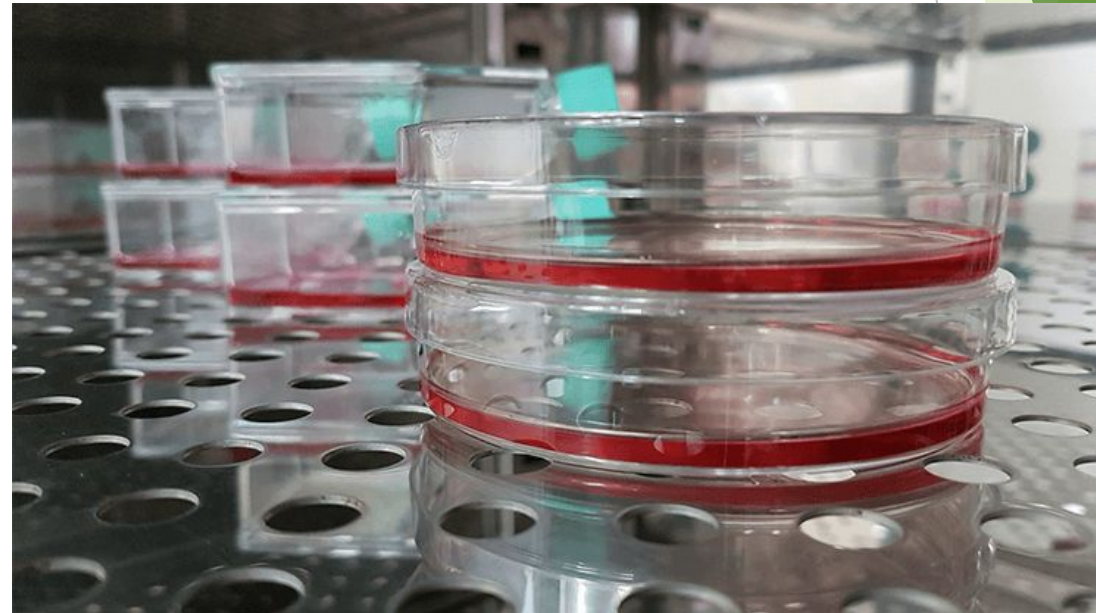


Культивирование клеточных культур (растений и животных).
Методы, виды и типы сред для культивирования.

Большая часть медико-биологических исследований проводится на клетках *in vitro* (то есть, не на живом организме, а на клетках «в пробирке»). Клетки используют в качестве модельного биологического объекта в научных исследованиях, при тестировании и производстве лекарств. Кроме этого, ученые научились исправлять генетические ошибки в клетках и наделять их способностью противостоять некоторым заболеваниям, что служит основой для медицинских технологий будущего – генной и клеточной терапий.

Клеточная культура – это клетки (как правило, клетки животных или человека, принадлежащие одной ткани), выращиваемые обычно в пластиковых флаконах, планшетах или чашках Петри в специальной питательной среде при контролируемых температуре, влажности и уровне углекислого газа.



1665

1683

1839

1925

1929

1948

1951

1961

1968

1975

1981

1996

1997

2006

2017



1665

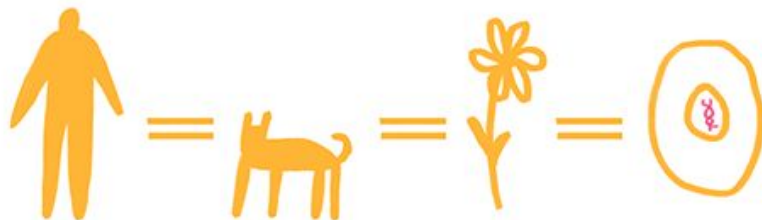
Р. Гук впервые наблюдает ячеистое клеточное строение растений.

1683



А. Левенгук открывает одноклеточные организмы.

1839



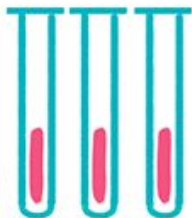
М. Шлейден и Т. Шванн создают клеточную теорию.

1925



А. Максимов находит стволовые клетки.

1929



Создается коллекция клеток ATCC.

1948



Показана возможность производства вакцин в культуре клеток.

1951



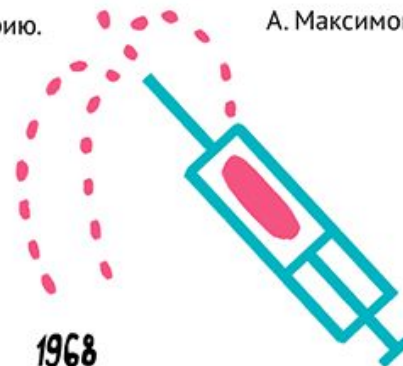
Получена линия клеток HeLa.

1961



Л. Хейфлик обнаруживает предел числа делений человеческих клеток in vitro.

1968



А. Фриденштейн находит мезенхимальные стволовые клетки.

1975



Разрабатывается технология гибридом и производства моноклональных антител. Авторы открытия – Мильштейн, Кёлер и Эрне – в 1984 г. получают Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

1981



Получены эмбриональные стволовые клетки мыши.

1996



Клонирована овечка Долли путем переноса ядра между клетками (В. Рослин).

1997



Получены эмбриональные стволовые клетки человека.

2006

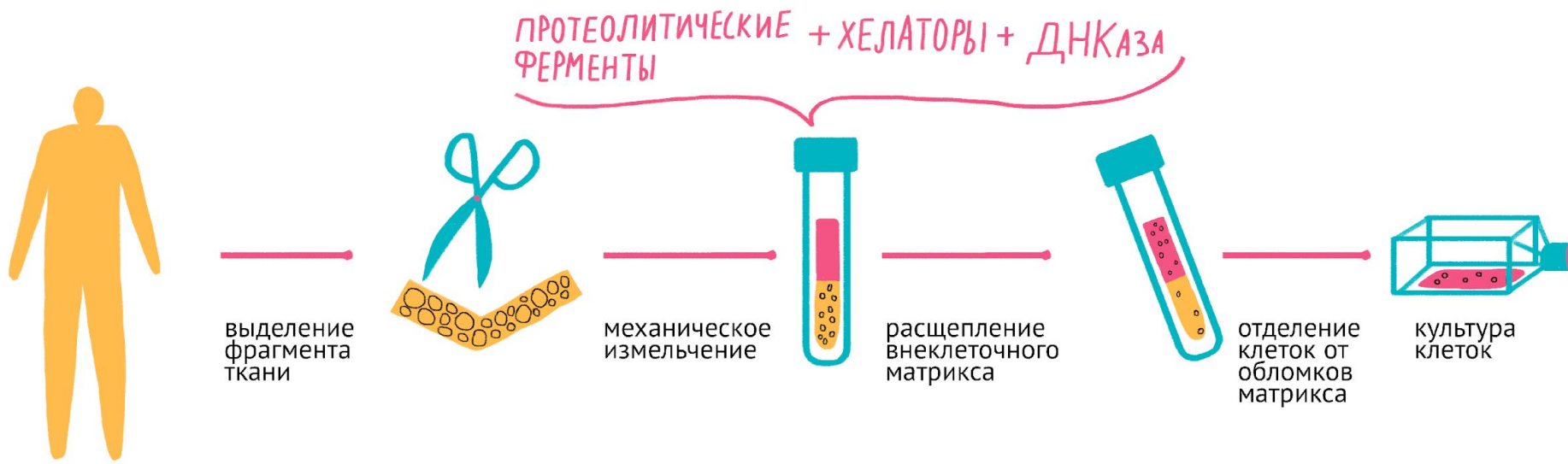


Получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, за что Ш. Яманака в 2012 г. получает Нобелевскую премию (вместе с Дж. Гордоном, который за несколько десятков лет до этого провел клонирование лягушки, заложив основу для последующих исследований).

2017

В России принят закон "о биомедицинских клеточных продуктах", регулирующий применение клеток для терапии.

Выделение клеток из тканей



Основное оборудование для культуральных работ



▶ Ламинарный шкаф

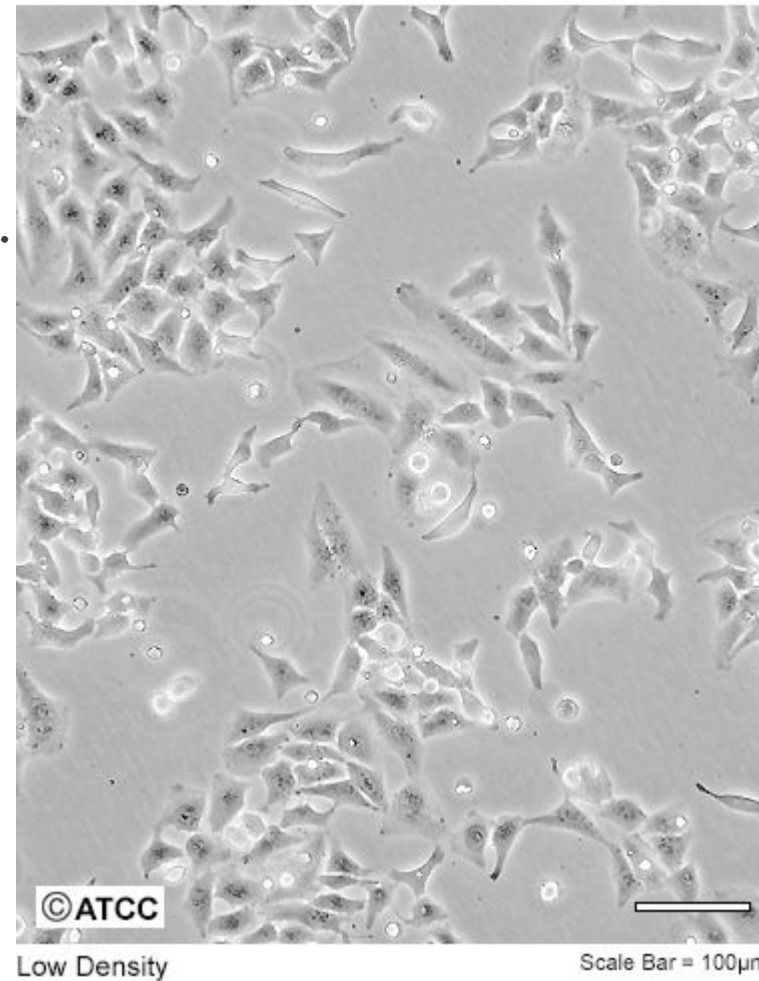


▶ CO₂-инкубатор

Разновидности клеточных культур

В лабораторной практике наиболее распространены *раковые клетки*. Они не имеют предела числа делений, будучи фактически бессмертными, что позволяет наращивать их в неограниченном количестве. Поскольку при постоянном росте клеток место в чашке Петри (или в объеме культуры) периодически кончается, время от времени их нужно пересевать: откреплять от поверхности, разбивать клеточные скопления с помощью ферментов и ЭДТА (хелатор кальция), а потом заново сеять в меньшей плотности, что позволяет им размножаться дальше. Эта процедура называется пассированием, а возраст культуры часто считают по числу таких пассажей.

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**



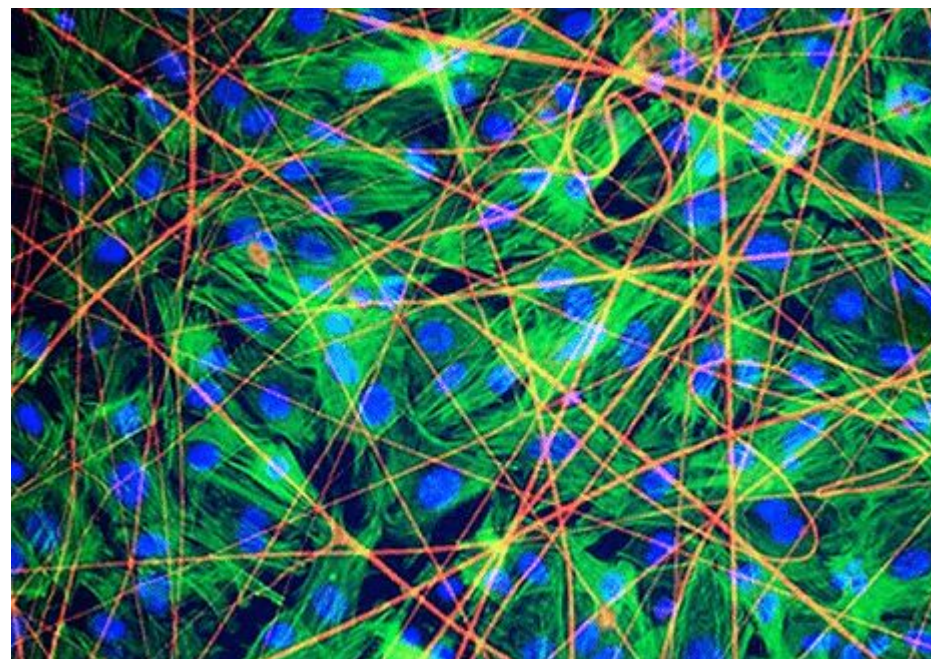
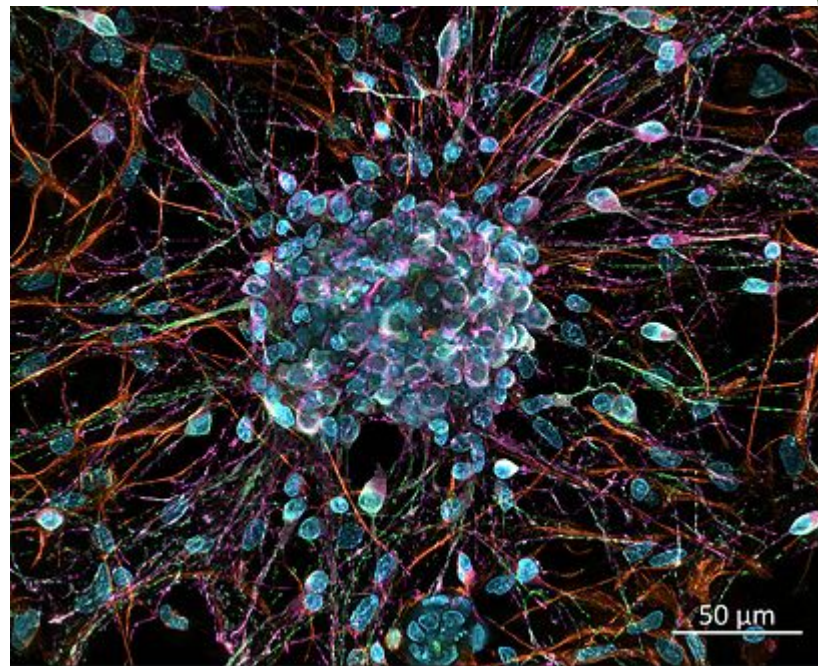
Для получения культуры «нормальных» клеток Леонард Хейфлик выделял клетки из абортивного материала и обнаружил наличие предела числа делений клеток в культуре, получившего название предела Хейфлика. Для человеческих клеток этот предел составляет 50-70 делений и обусловлен укорочением теломер — фундаментальным механизмом старения клеток.



Некоторым компромиссом между раковыми и нормальными являются *иммортиализованные клетки*: полученные из нормальной ткани, они приобрели способность к неограниченному числу делений. Такой переход к бессмертию может происходить либо спонтанно, либо в результате искусственного введения определенных генов или слияния с раковыми клетками, как в случае гибридом. «Бессмертие» клеткам могут придать онкогены: большой Т-антиген вируса SV40, H-Ras, c-myc, E1A. Эти гены по сути вызывают опухолевую трансформацию клеток со всеми вытекающими недостатками (нестабильность генома, потеря физиологических функций и т.д.). Наиболее деликатный и получающий все большее распространение способ иммортализации — это введение в клетку гена теломеразной обратной транскриптазы (TERT), которая достраивает теломеры и предотвращает их укорачивание при делении.

Дифференцированные клетки (которые приобрели свою конечную специализацию) составляют большую часть клеток организма и практически не делятся. Будучи основными составляющими и «рабочими лошадками» во всех органах и тканях, они служат мишенью действия большинства лекарств, что делает их весьма востребованными для исследований. В культуре их можно получить путем направленной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нужный тип клеток, однако этот путь имеет существенные технические и, в случае человеческих клеток, еще и этические сложности.

Наиболее распространенными культурами дифференцированных клеток являются **первичные клеточные культуры** – клетки, выделенные из зрелой ткани и не пассированные *in vitro*. Число делений таких клеток критически зависит от условий культивирования, но редко составляет более 5-10 раз. Исключением являются стволовые, прогениторные и некоторые специализированные клетки, например, активированные Т- и В-лимфоциты. Кроме того, при длительном культивировании первичная культура склонна к замещению фибробластами.



Биобанки



Методы трансфекции и трансдукции

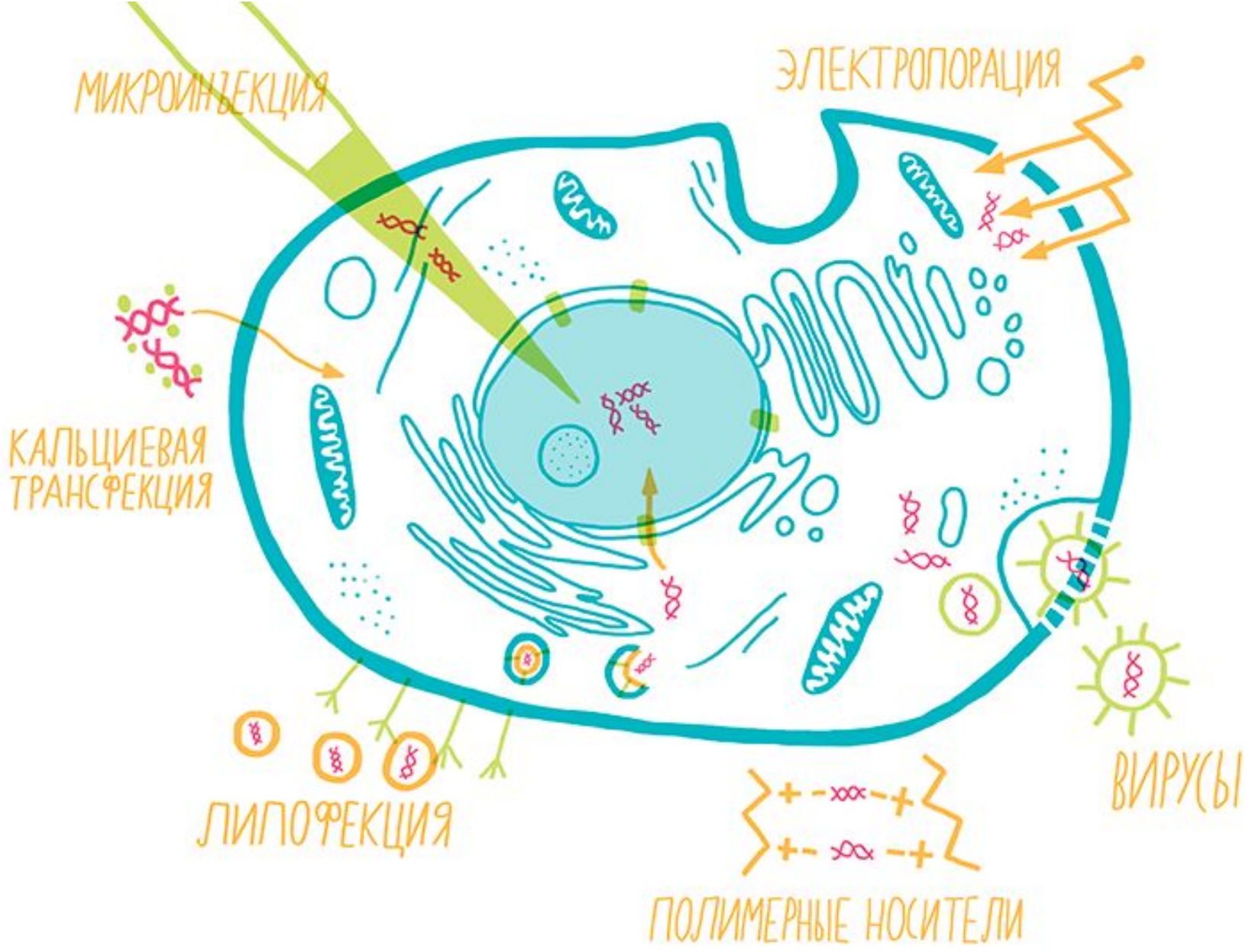
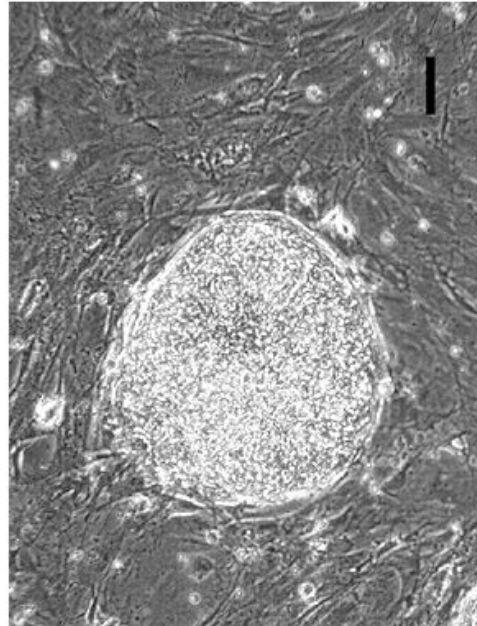
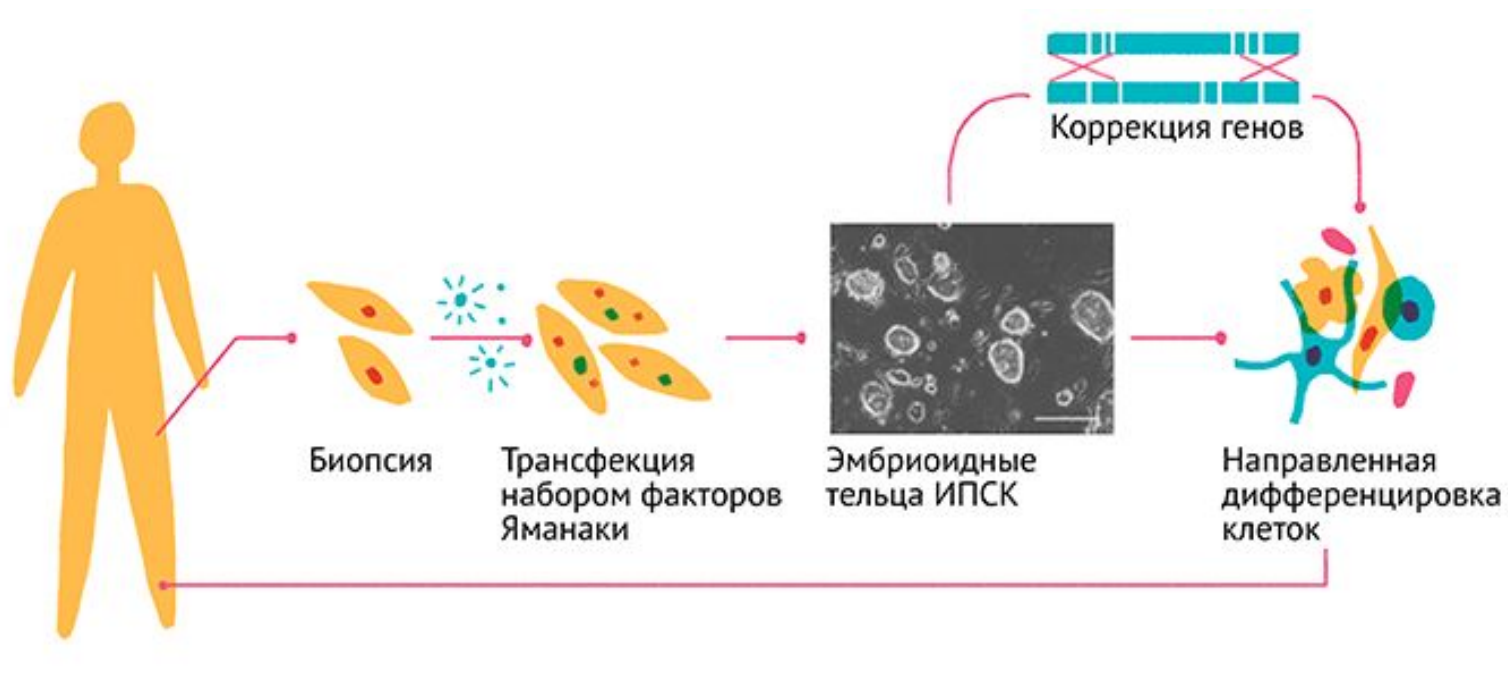


Схема получения и микрофотография колонии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК)



Эмбриональные клетки (~100 шт) получают на 5-9 день после экстракорпорального оплодотворения из внутренней клеточной массы бластоцисты. Эти клетки высаживают на фидер из умерщвленных фибробластов. Примерно через неделю можно обнаружить образованные ими колонии – эмбриодные тельца (справа).

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)



Клетки взрослого организма получают путем биопсии, после чего их трансфецируют набором транскрипционных факторов (факторов Яманаки) и высаживают на фидер. Для репрограммирования клеток и формирования эмбрионных телец необходимо 16 дней. После этого из ИПСК можно получать клетки заданного типа путем направленной дифференцировки и при необходимости корректировать неисправные гены. Полученные клетки могут быть использованы для введения пациенту с целью восстановления функций ткани.

Применение



Схема технологического процесса производства вакцин. Для биореактора клетки из флакона сначала размножают, для чего обычно используют роллерные бутылки. С поверхности бутылей клетки в виде суспензии переносят в биореактор, где постоянно перемешивают, в результате чего они формируют клеточные сфероиды. Это позволяет более эффективно использовать объем и питательную среду и многократно увеличить концентрацию вируса на литр среды. При достижении максимальной плотности клетки заражают вирусом, после чего они начинают его производить в большом количестве. Вирус собирают из культуральной среды, инактивируют, очищают и в итоге получают готовую вакцину.

Биотехнологическое производство белков

Аналогично вирусам клетки могут производить и отдельные белки, но, в отличие от вирусов, белки не способны сами себя воспроизводить в клетках. Чтобы клетка начала производить нужный белок в нее необходимо внедрить ген этого белка. В этом заключается суть биотехнологического производства, при котором клетки программируются на генетическом уровне на выработку того или иного белка. Полученные таким образом белки называют рекомбинантными.

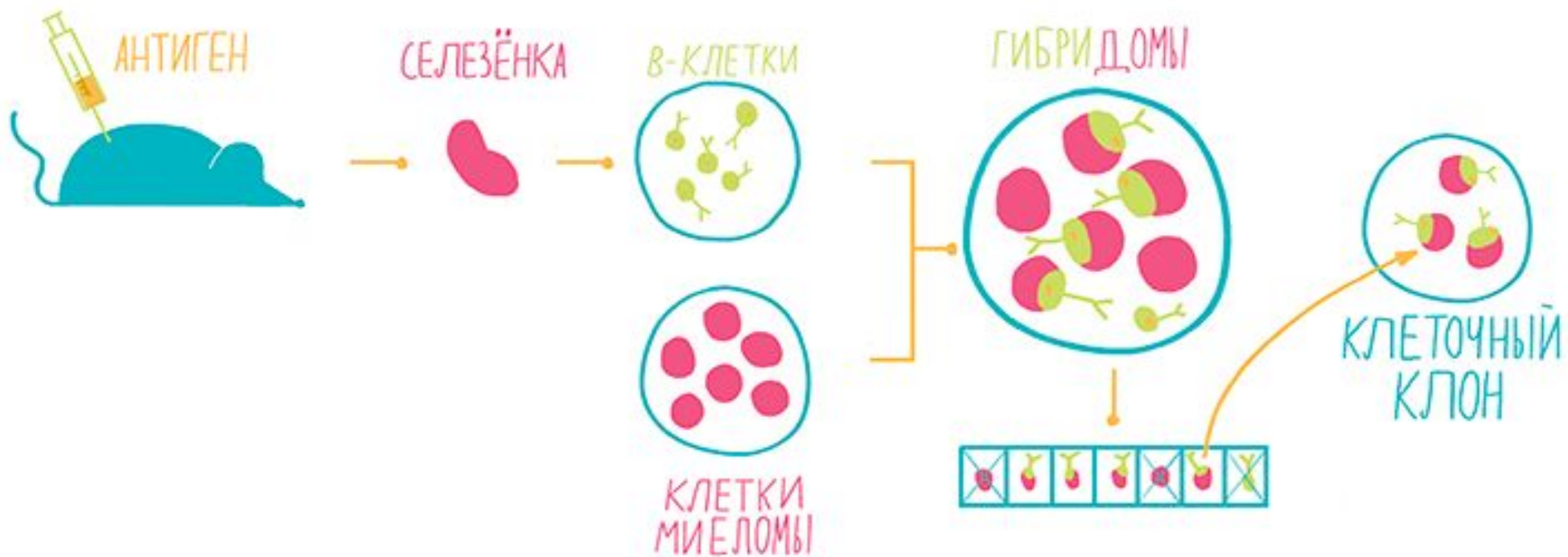


Схема процесса производства антител — гибридная технология. В-клетки, производящие антитела, получают из селезенки иммунизированных мышей. Далее для наработки антител эти В-клетки необходимо размножить, но поскольку они имеют ограниченную способность к делению, их иммортализируют путем слияния с линией раковых клеток (миеломой). Клетки гибридом рассаживают по лункам планшета с сильным разведением для обеспечения попадания не более одной клетки в лунку. Далее выращивают потомков одной клетки — клеточный клон. Антитела, производимые клоном клеток, идентичны и называются моноклональными.

Клеточная терапия

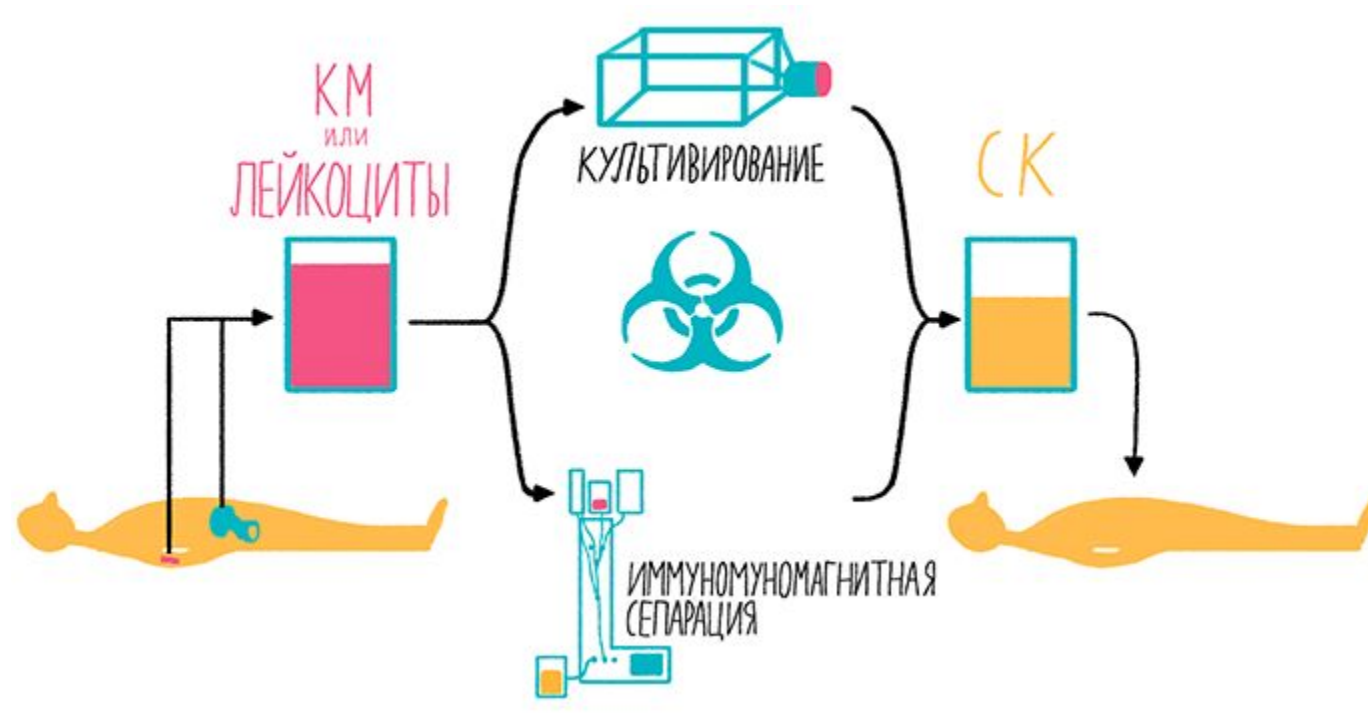


Схема трансплантации аутологичных (своих) кроветворных СК из костного мозга (КМ) и периферической крови. СК из периферической крови получают после предварительной стимуляции их выхода в кровоток из КМ, вводя препарат рекомбинантного белка (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор). После этого путем афереза из крови отбирают небольшие ядросодержащие клетки. Эта процедура проводится в непрерывном режиме, при котором кровь из одной руки поступает в центрифугу, где расслаивается на фракции. Необходимая фракция отбирается, а остальные возвращаются обратно пациенту в другую руку. СК костного мозга получают из тазобедренных костей, прокалывая их в нескольких местах с помощью специальной иглы. При этом получают в общей сложности около 1 л суспензии. Кроветворные СК выделяют путем иммуномагнитной сепарации по маркеру CD34 или путем культивирования в специальных условиях. После проведения химиотерапии эти клетки вводят в кровоток для восстановления клеток крови.

Среды для культивирования клеток

Метод культивирования клеток и тканей находит применение в биотехнологии, молекулярной и клеточной биологии, фармацевтике и др. смежных областях. Клетки, ткани или органы выделяются из животных или растений и помещаются в искусственную питательную среду для поддержания роста и/или пролиферации. Основными условиями, необходимыми для оптимального роста клеток являются: контролируемый температурный режим, субстрат для прикрепления клеток (для адгезивных культур клеток), подходящая культуральная среда, CO₂-инкубатор для контроля уровня pH, поддержание осмотического давления. Наиболее важным моментом для обеспечения оптимального роста/пролиферации клеток является выбор подходящей культуральной среды. Культуральная среда представляет собой жидкость или гель, разработанная для поддержания роста/пролиферации клеток различного происхождения.



Среда для культивирования клеток состоит из определенного соотношения аминокислот, витаминов, солей, глюкозы, гормонов, факторов прикрепления, факторов роста; поддерживает буферную систему и осмотическое давление.

Основные компоненты культуральной среды

- ▶ Компоненты, обеспечивающие буферную систему культуральной среды.

Культивируемые клетки сильно реагируют на изменение pH среды. Оптимальное значение pH для большинства клеток лежит в пределах 7,2-7,4. Бикарбонат натрия поддерживает «естественную» буферную систему культуральной среды (CO_3^{2-} / HCO_3^-); требуя содержания 5-10 % CO_2 в атмосфере, что легко выполнимо при культивировании клеток в CO_2 -инкубаторе. ХЕПЕС представляет собой фосфатную соль с буферной емкостью в пределах 7,2-7,4 pH. Не требует контролируемой газовой среды, но в больших концентрациях может быть токсичен для некоторых типов клеток. Феноловый красный используется как индикатор pH: красный при pH 7,4 и меняет свой цвет до оранжевого или желтого при уменьшении значения pH. Для культивирования клеток, чувствительных к эстрогену рекомендуется использовать среду без фенола красного.

- ▶ Соли

Неорганические соли поддерживают осмотическое давление в среде и помогают в регуляции мембранного потенциала, обеспечивая среду ионами натрия, калия и кальция. Осмоляльность среды так же важна, как уровень pH при культивировании клеток. Оптимальное значение осмоляльности лежит в пределах 260-340 мосмоль/кг в зависимости от типа культивируемых клеток.

- ▶ Аминокислоты

Аминокислоты являются строительным материалом для белков; незаменимые аминокислоты всегда входят в состав культуральной среды. Особенно важен L-глутамин; обеспечивает азотом НАД, НАДФН и нуклеотиды, являясь вторичным источником энергии для метаболизма клетки. Заменяемые аминокислоты также иногда добавляются в культуральную среду.

- ▶ Углеводы

Большинство сред включают в себя глюкозу и галактозу как источник энергии для клеток.

▶ Белки и пептиды

Наиболее часто используемыми белками и пептидами является альбумин, трансферрин и фибронектин; они особенно важны при бессывороточном культивировании. Альбумин связывает воду, соли, гормоны и витамины и транспортирует их между клетками и тканями. Фибронектин играет ключевую роль в адгезии клеток. Трансферрин - белок-переносчик железа, обеспечивающий железом клеточную мембрану.

▶ Жиры и жирные кислоты

Особенно важны при бессывороточном культивировании, так как сыворотка обычно содержит их.

▶ Витамины

Многие витамины необходимы для клеточного роста и пролиферации. В культуральную среду обычно добавляют рибофлавин, тиамин и биотин.

▶ Добавки

Наиболее важным компонентом культуральной среды является сыворотка; она добавляется перед применением, примерно 5-10 %. Сыворотка представляет собой смесь альбуминов, факторов роста и ингибиторов роста; является источником витаминов, аминокислот, белков, углеводов, жиров, микроэлементов, факторов роста. Наиболее часто используют бычью и телячью эмбриональную сыворотку. Факторы роста, цитокины, гормоны добавляются в культуральную среду для пролиферации и активации клеток. Антибиотики добавляются для предотвращения контаминации культуральной среды бактериями и грибами; однако антибиотики не предотвращают заражение культуральной среды микоплазмой.



- ▶ Среда MEM (Minimum Essential Medium), или среда Игла была разработана Гари Иглом и является наиболее распространенной средой для культивирования клеток наряду со средой DMEM. Среда MEM содержит 13 аминокислот, 6 водорастворимых витаминов, холин и инозит, выполняющие роль углеводородного субстрата. Есть модификации среды MEM с солями Эрла и Хэнкса, а также α -модификация среды MEM с содержанием всех 21 аминокислот и солями Эрла.
- ▶ Среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) является модификацией среды BME (Basal Medium Eagle) и содержит в четыре раза больше аминокислот и витаминов, а также различные добавки, улучшающие рост клеток. Изначально среда DMEM была с содержанием глюкозы 1г/л и применялась для культивирования эмбриональных клеток мыши. Затем появились модификации среды DMEM (с высоким и пониженным содержанием глюкозы, пирувата натрия, различных добавок) для культивирования клеток различных типов, в том числе нетрансформированных клеток и гибридом. Среда DMEM является наиболее распространенной средой для культивирования клеток наряду со средой MEM.
- ▶ Среда DMEM/F-12 в соотношении 1:1 применяется для выращивания широкого спектра клеточных культур. Изначально среда F12 была разработана для бессывороточного культивирования CHO клеток, клеток легких и мышечных L-клеток. В связи с богатым содержанием питательных веществ в среду DMEM/F12 можно добавлять относительно небольшое количество эмбриональной бычьей сыворотки (FBS-fetal bovine serum), либо использовать без сыворотки, но тогда необходимо добавлять такие факторы, как инсулин, трансферин, эпидермальный фактор роста и др..
- ▶ Среда RPMI-1640 была разработана в Roswell Park Memorial Institute (откуда и берет свое название) в 1966 Муром и его коллегами для культивирования лейкоцитов. В настоящее время используется для широкого спектра клеточных культур.



КОНЕЦ

Спасибо за внимание