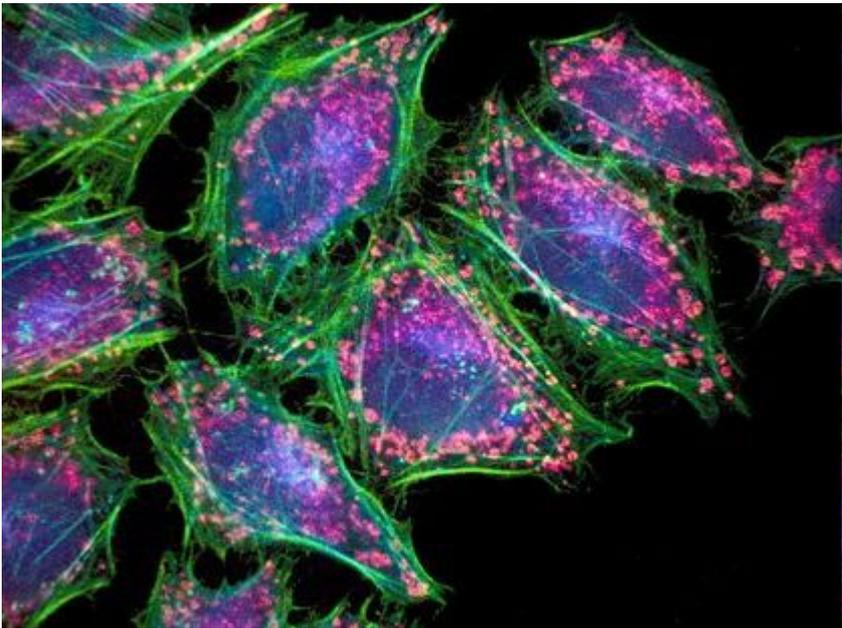


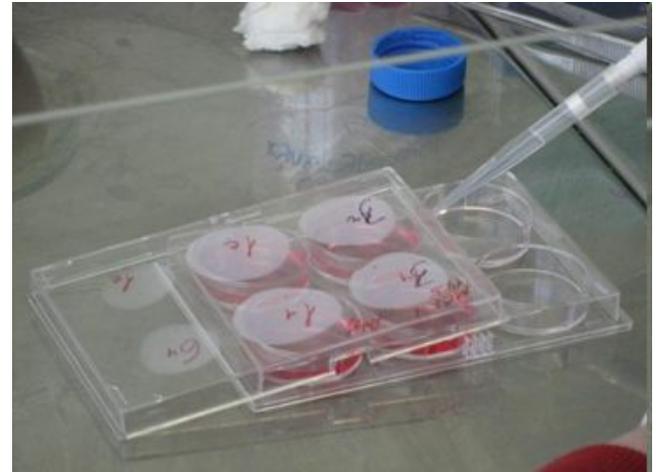
# Культуры ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК



## Лекция 3

**Животные клетки гораздо сложнее культивировать *in vitro* по сравнению с растительными клетками по следующим причинам:**

- 1. Требуются более сложные по составу питательные среды.**
- 2. Клетки очень чувствительны к механическим воздействиям.**
- 3. Рост клеток происходит преимущественно после прикрепления к поверхности.**



## **Культуры клеток животных классифицируют по следующим признакам:**

- способу культивирования;**
- происхождению;**
- продолжительности культивирования**

# Способы культивирования животных клеток

```
graph TD; A[Способы культивирования животных клеток] --> B[Культивирование в прикрепленном состоянии на внутренней поверхности культурального сосуда]; A --> C[Глубинное культивирование]; B --> D[Монослойные культуры]; C --> E[Суспензионные культуры];
```

Культивирование в  
прикрепленном  
состоянии на внутренней  
поверхности  
культурального сосуда

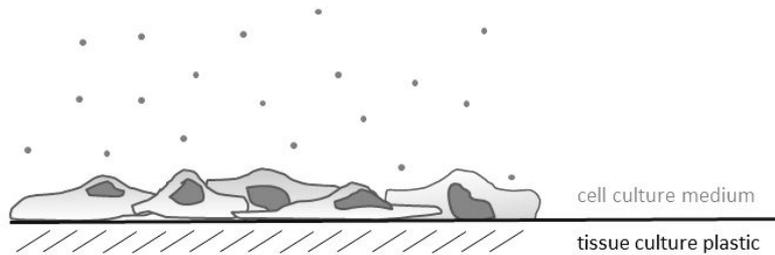
**Монослойные  
культуры**

Глубинное  
культивирование

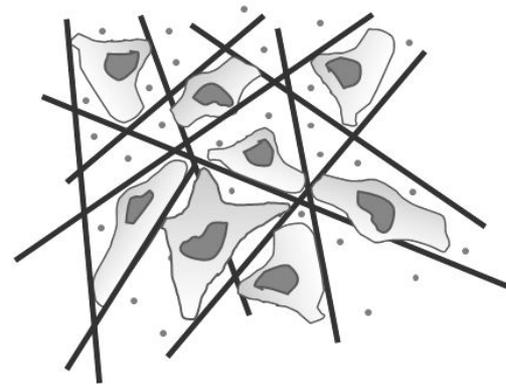
**Суспензионные  
культуры**

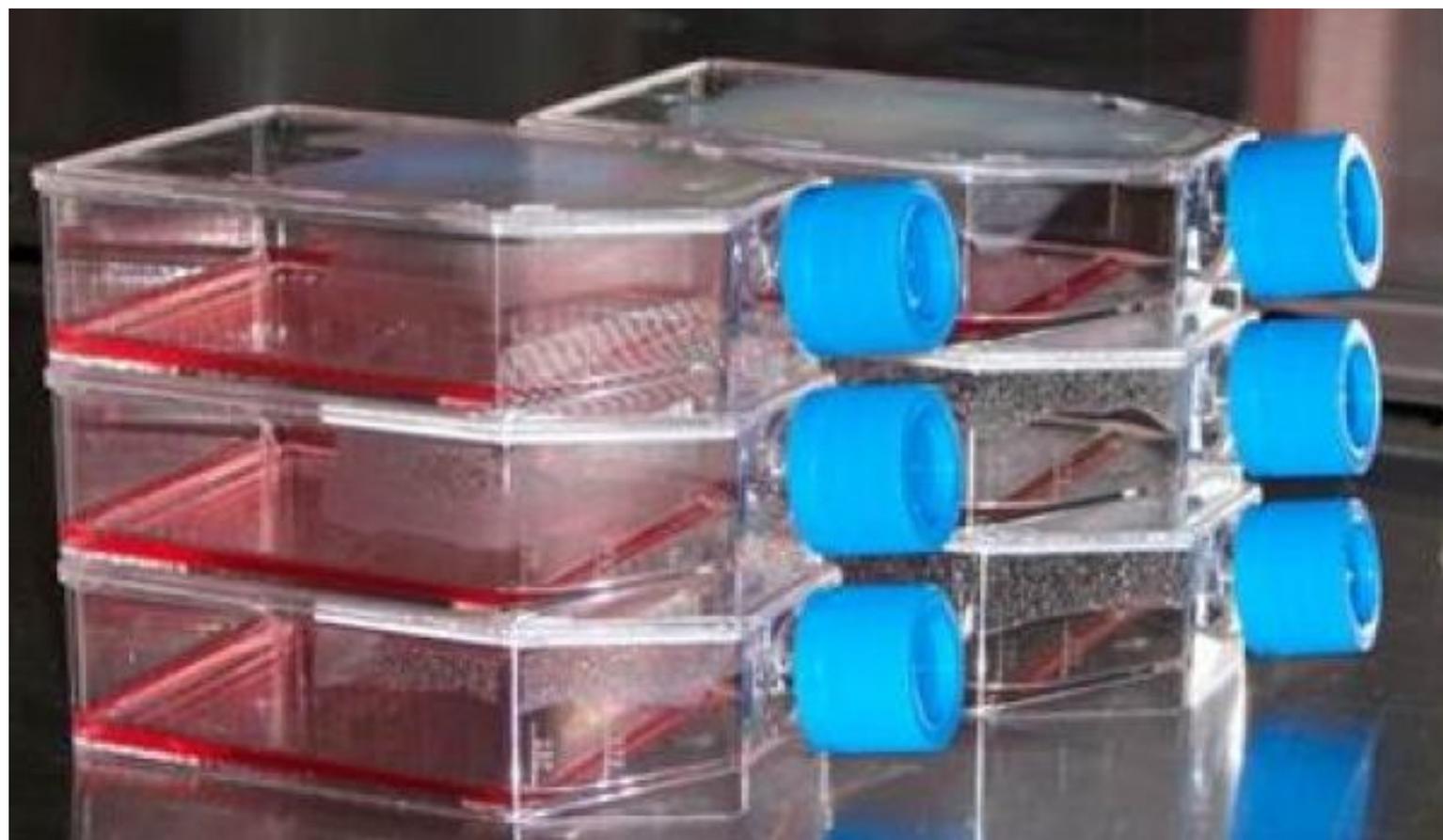
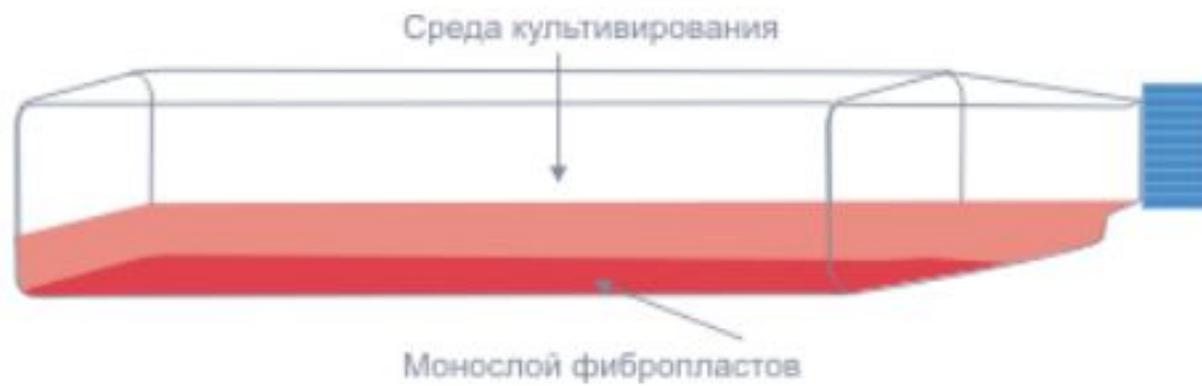
**Монослойные** (опорно-зависимые) **культуры** – культуры, клетки которых размножаются в форме монослоя, прикрепившись к субстрату

2D monolayer culture



3D culture





**В качестве субстрата для опорно-зависимых клеток используют:**

**1. Пластик**

(полистирол, поликарбонат, поливинилхлорид, тефлон и др.)

**2. Стекло**

(пирекс (алюмоборосиликатное стекло))

**3. Металлы**

(нержавеющая сталь, титан)

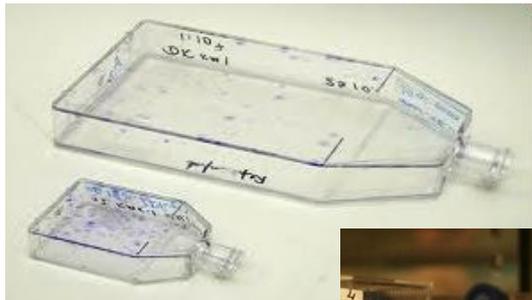
Клетки связываются с субстратом не непосредственно, а с участием **факторов адгезии**

К факторам адгезии относятся белки:

- **фибронектин;**
- **коллаген;**
- **поли-L-лизин;**
- **хондронектин (адгезия хондроцитов);**
- **ламнин (адгезия эпителиальных, нервных клеток)**

# Монослойные культуры

**Стационарные культуры, растущие в неподвижных культуральных сосудах**



**Роллерные культуры, растущие в сосудах, вращаемых вдоль своей продольной оси**



**Площадь, занимаемая клетками, увеличивается на порядок по сравнению со стационарными культурами**

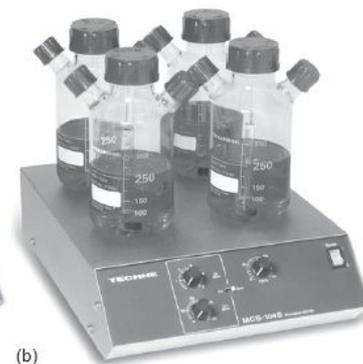
**Роллерные культуры (до 700 бутылок в каждой установке, сотни литров) используют для получения противовирусных вакцин и интерферона**



# Суспензионные культуры – культуры, клетки которых способны расти во взвешенном (суспендированном) состоянии в жидкой питательной среде



(a)



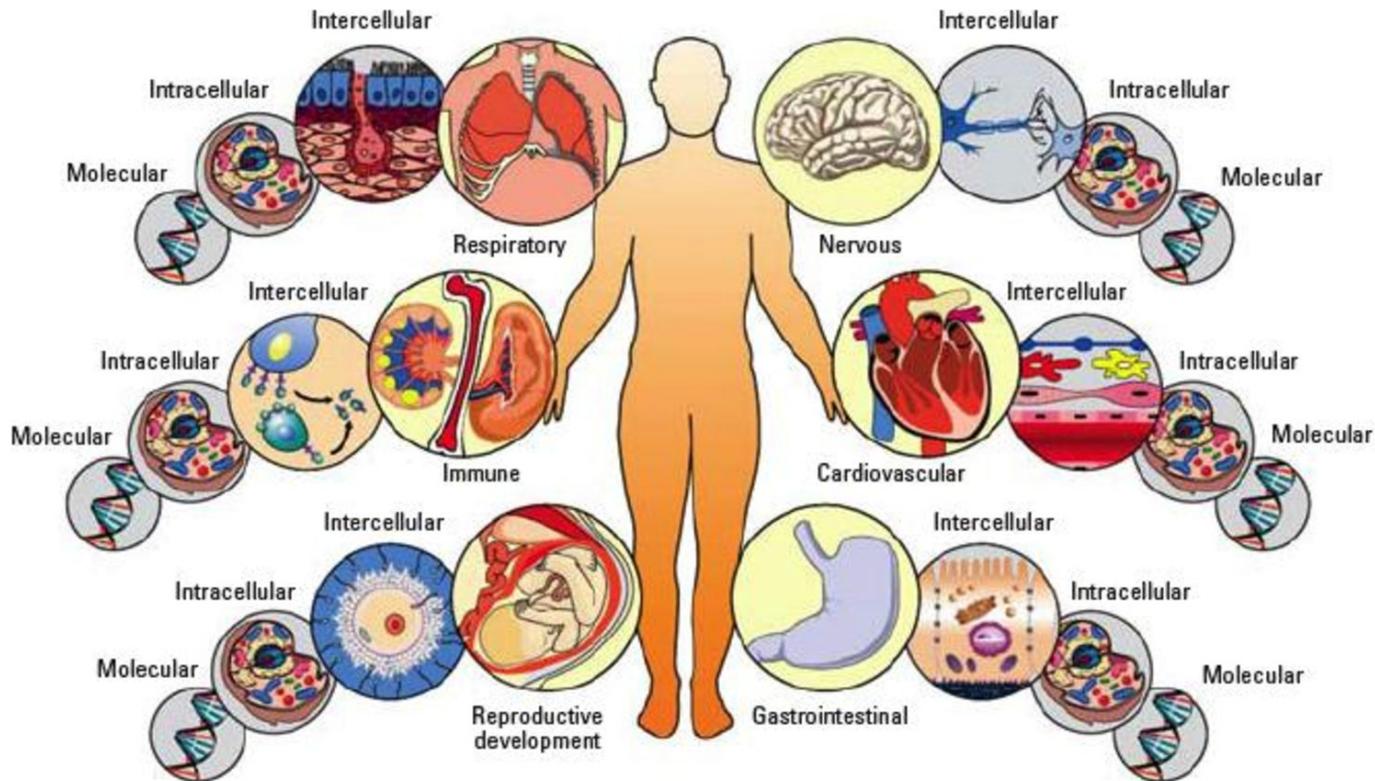
(b)

# Преимущества суспензионных культур:

- простота субкультивирования;
- экономия площадей;
- простота сбора клеток

**!Не все типы животных клеток могут расти в суспендированном состоянии**

# Типы культур животных клеток в зависимости от происхождения

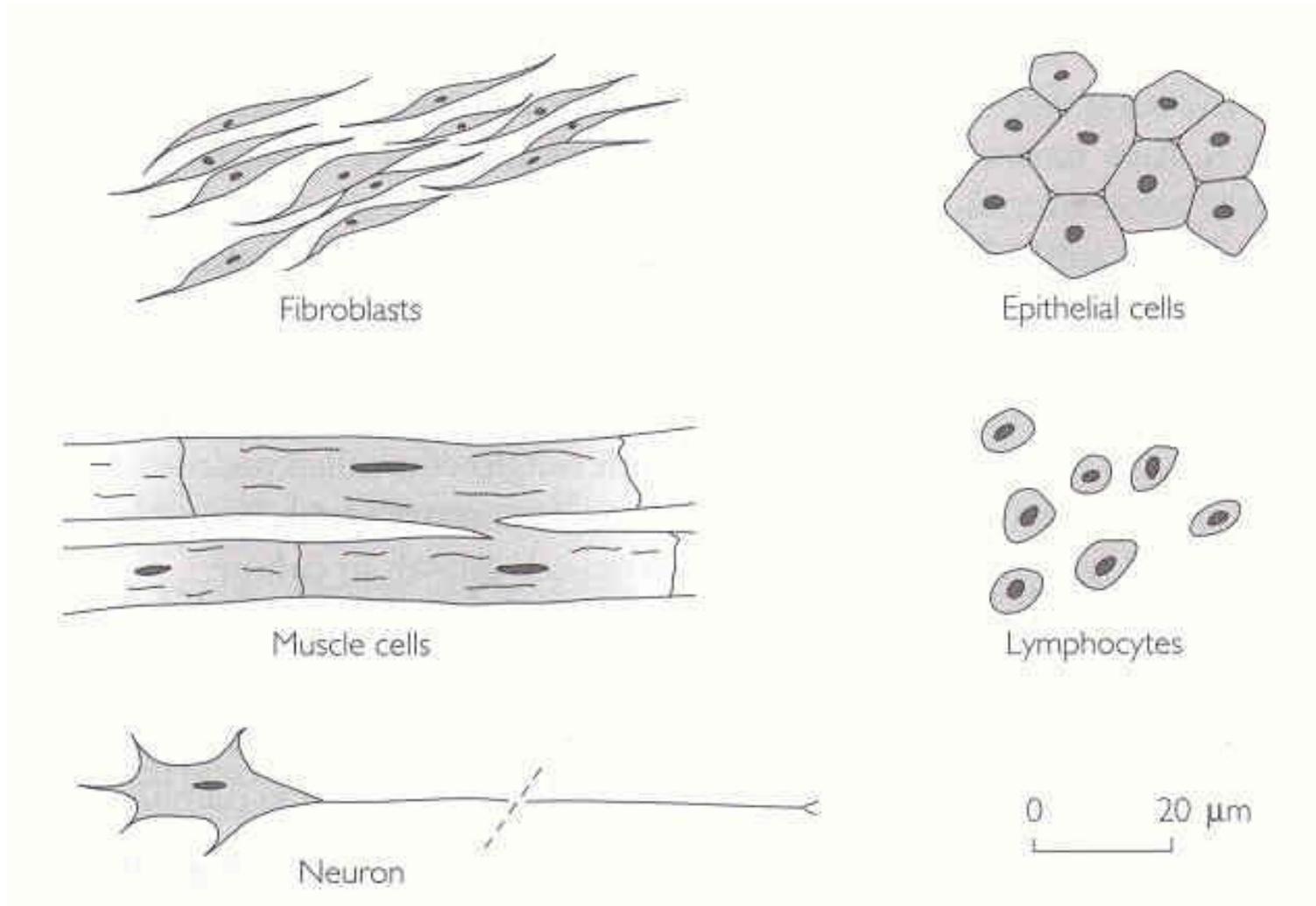


## **А) в зависимости от типа исходной ткани:**

- **элементы соединительной ткани** (фибробласты, лимфоциты, клетки хряща и др.);
- **мышечные ткани** (скелетные, сердечные и гладкие мышцы);
- **эпителиальные ткани** (печень, легкие, почки и др.);
- **клетки нервной системы;**
- **эндокринные клетки** (надпочечники, гипофиз и др.);
- **опухолевые клетки**



10 μm



## **Широко используемые культуры клеток животных:**

**а – фибробласты; б – эпителиальные клетки;  
с – мышечные клетки; d – лимфоциты; e - нейроны**

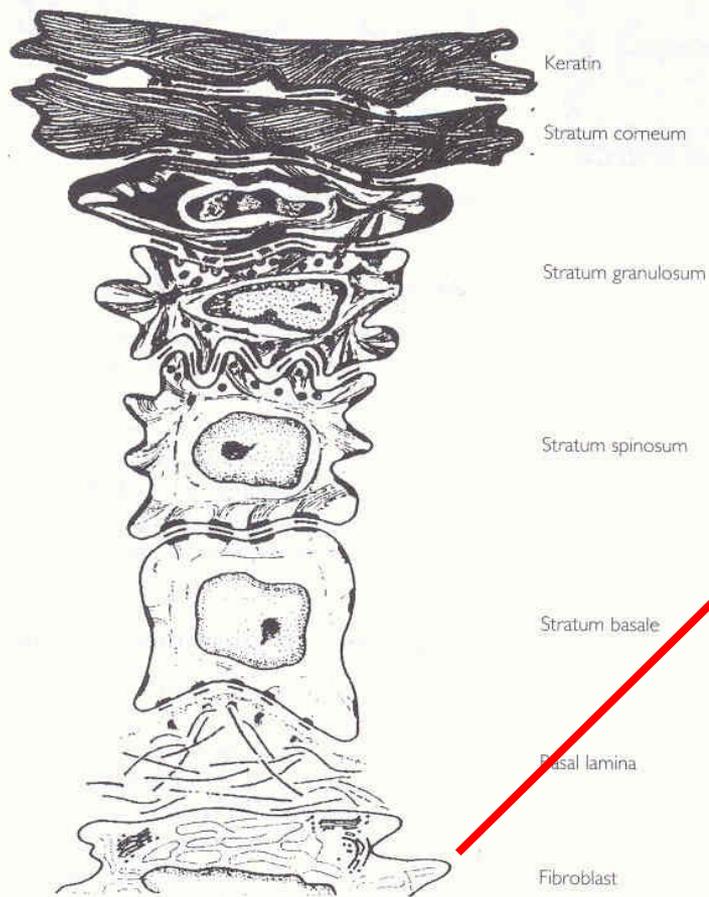
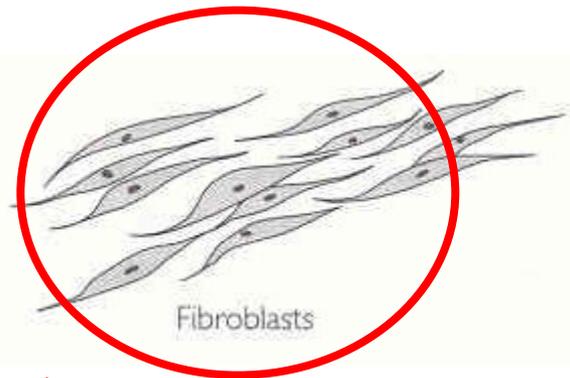
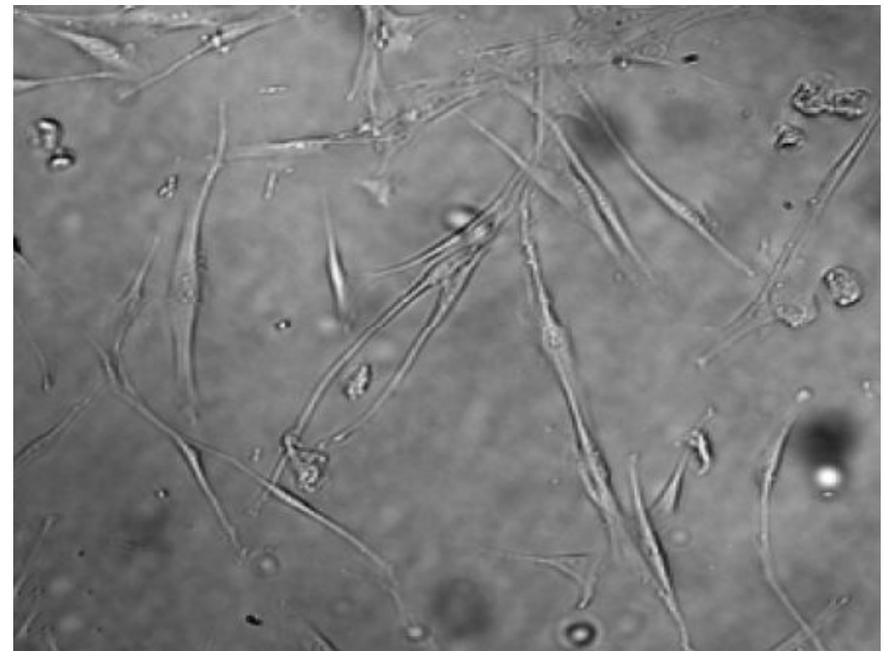


Figure 2.1

Ordered cell layers in the epidermis. Modified from Fusening, 1986.



## Фибробласты



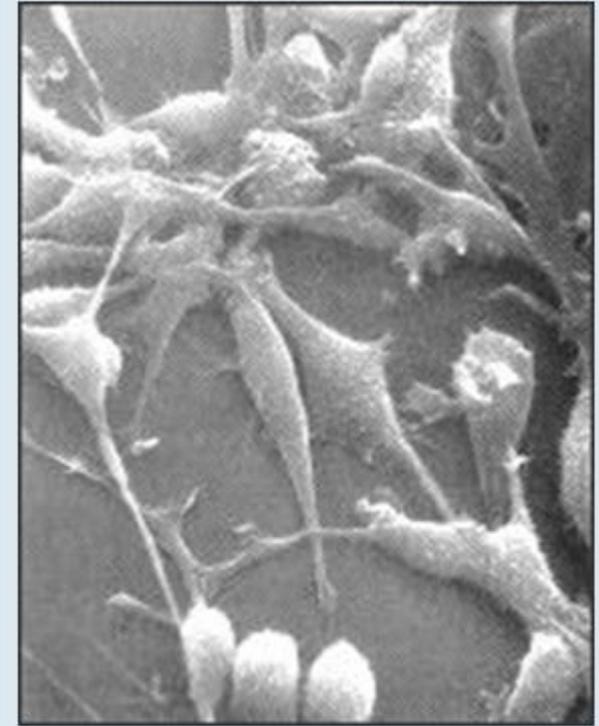
Культура фибробластов  
**ВНК 21** от сибирского  
хомяка впервые была  
получена в 1964 г.

# Фибробласты

Отличаются легкостью культивирования.

Используются для изучения клеточных, биохимических, молекулярных аспектов патогенеза ряда болезней.

Данные, полученные на культивируемых фибробластах, могут быть перенесены (экстраполированы) на условия *in vivo*.

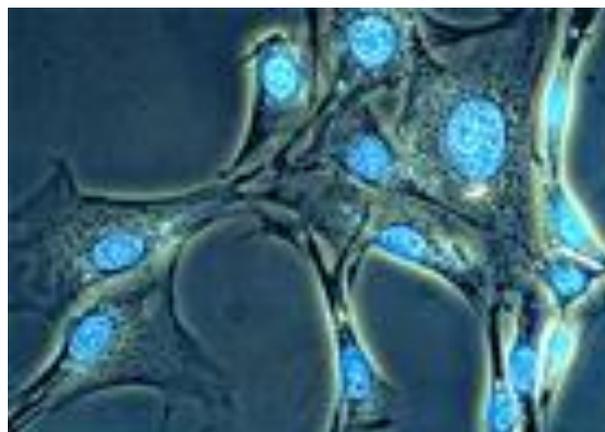


Клетки в культуре:  
крысиные фибробласты

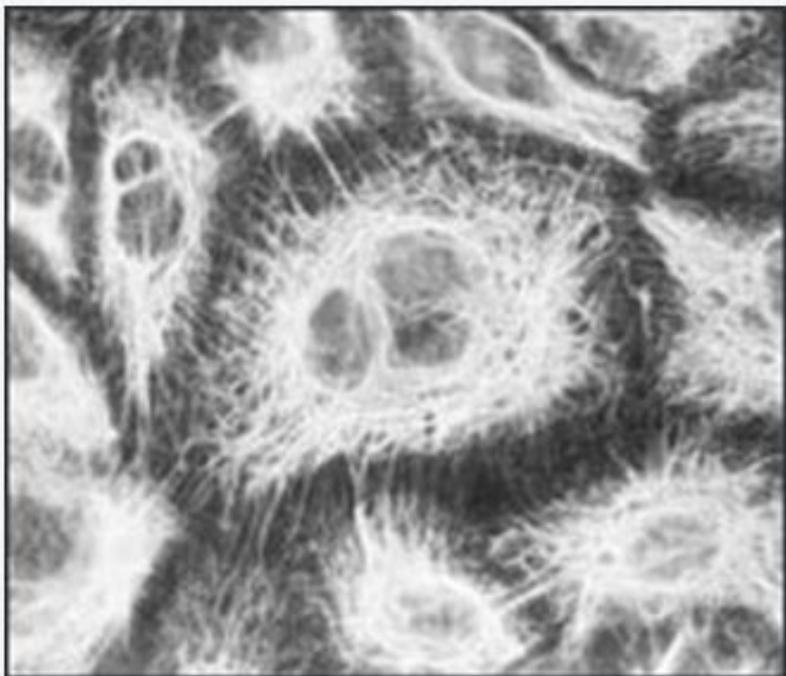
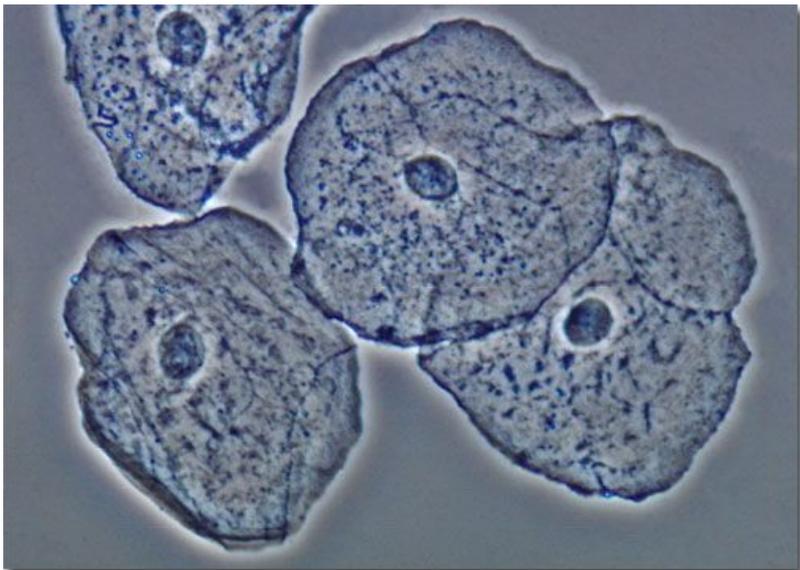


**Фибробласты – клетки молодости**

**Используются для омоложения в  
косметологии, лечения ожогов и  
рубцов**



# Эпителиальные клетки

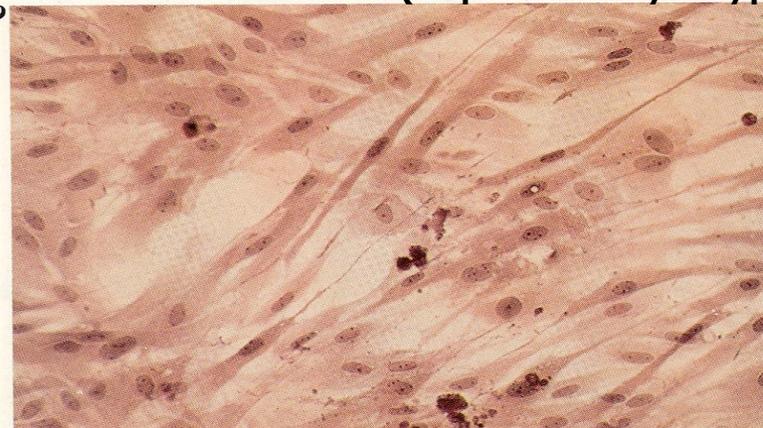


38



Клетки почек мыши (первичная культура)

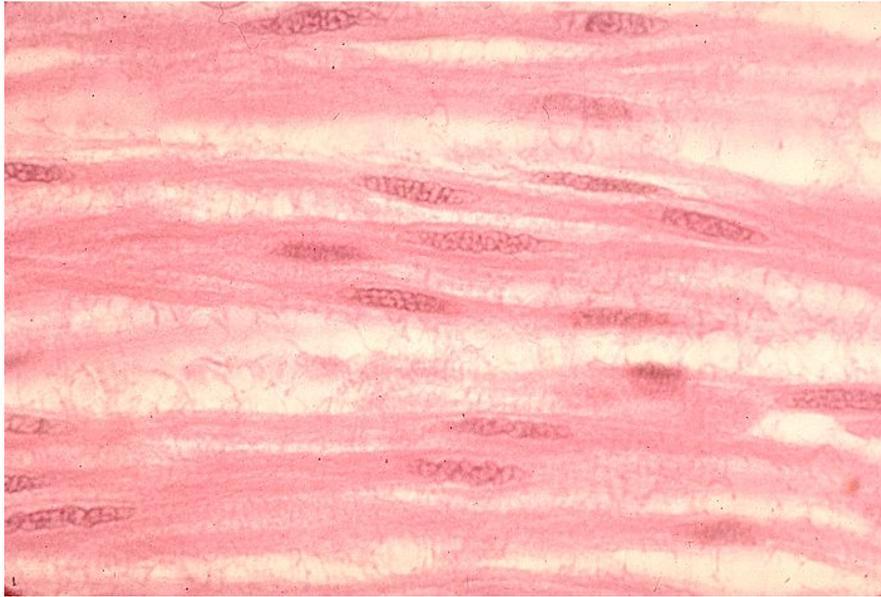
39



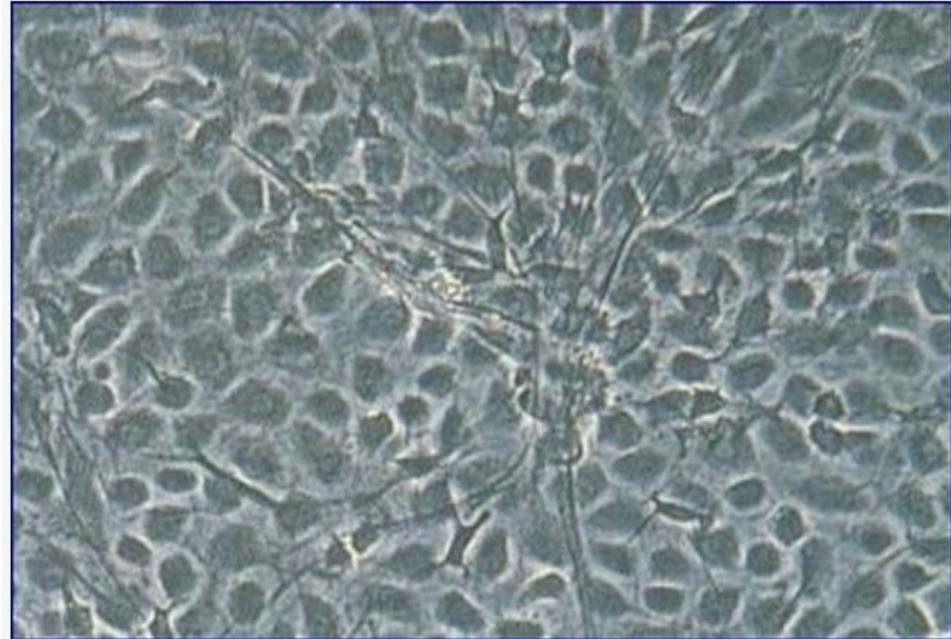
Клетки почек хомяка  
(после нескольких субкультивирований)



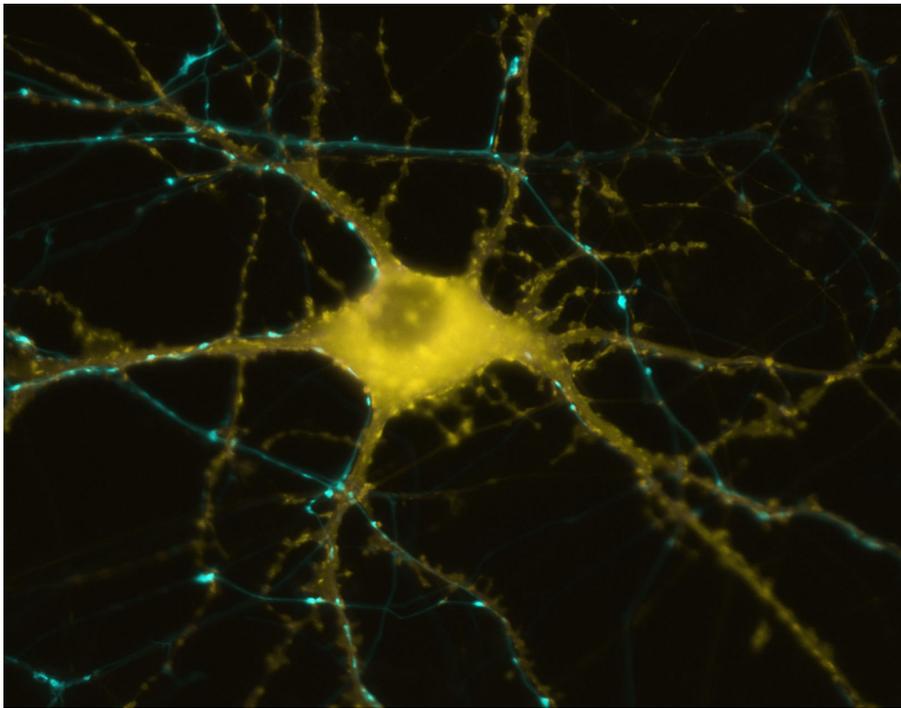
***Лоскут эпидермальной ткани,  
выращенной из клеток кожи человека *in vitro****



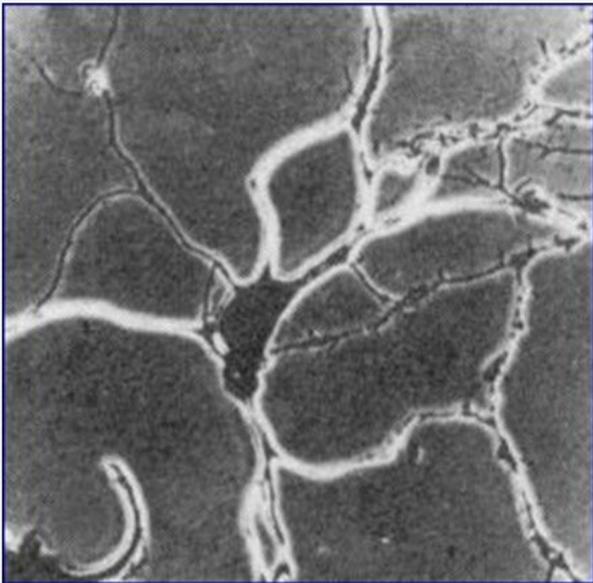
# Мышечные клетки



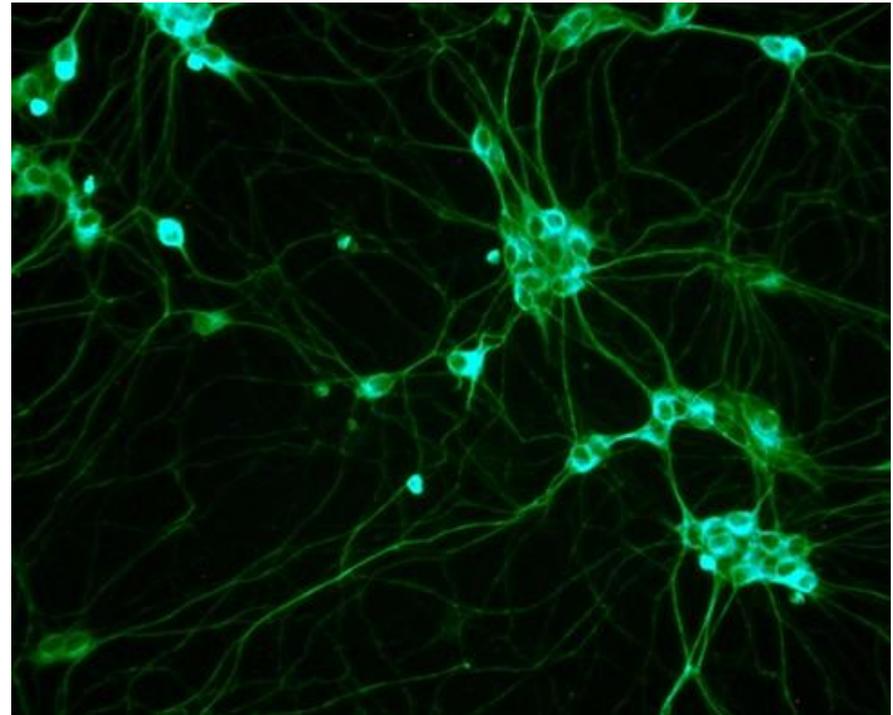
Кардиомиоциты (крыса)

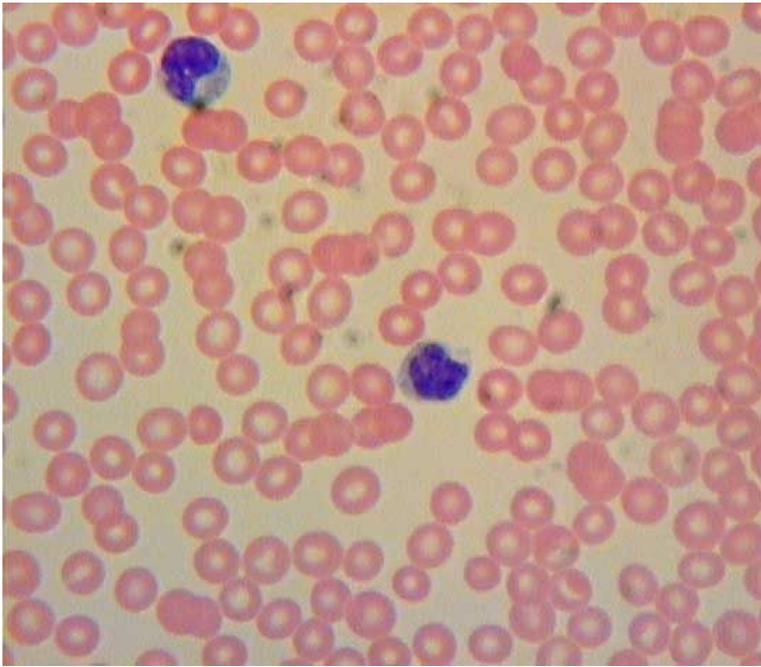


# Нейроны



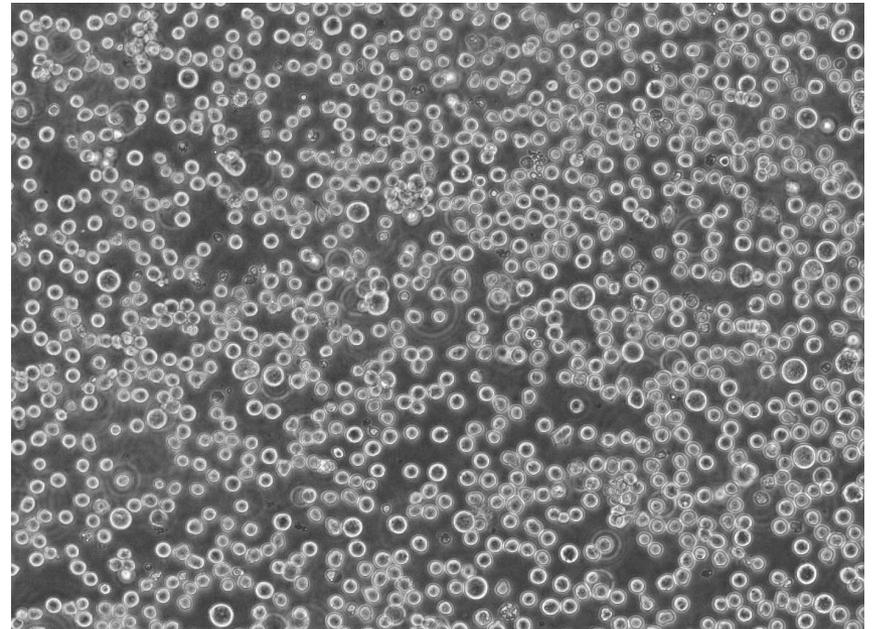
Нейроны гиппокампа в культуре





# Лимфоциты

**Могут расти в виде  
суспензионной  
культуры**



## Б) в зависимости от степени специализации ткани (эмбриональная либо взрослая ткань)

<b>Эмбриональные ткани</b>	<b>Взрослые ткани</b>
активный рост, лучшая выживаемость <i>in vitro</i>	низкая пролиферативная способность

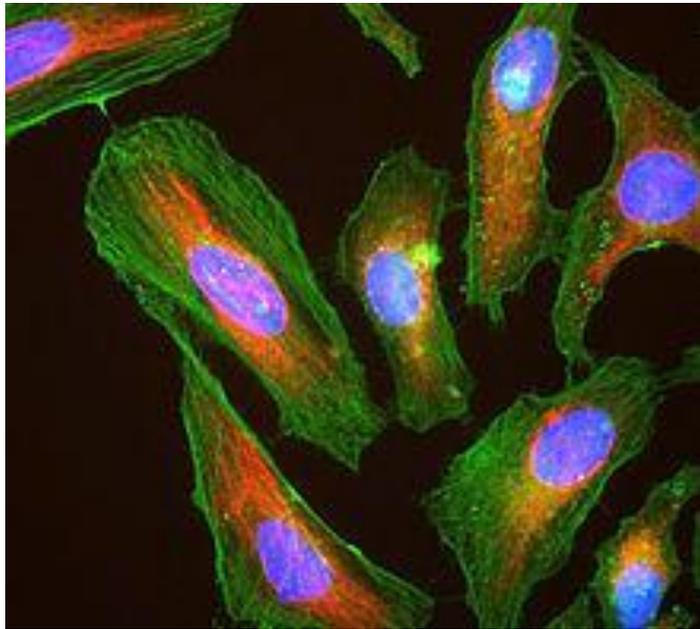
## В) в зависимости от физиологического состояния (нормальная либо опухолевая ткань)

<b>Нормальные ткани</b>	<b>Опухолевые ткани</b>
дают начало культурам с ограниченным временем жизни 	способны пролиферировать неограниченно долгое время 

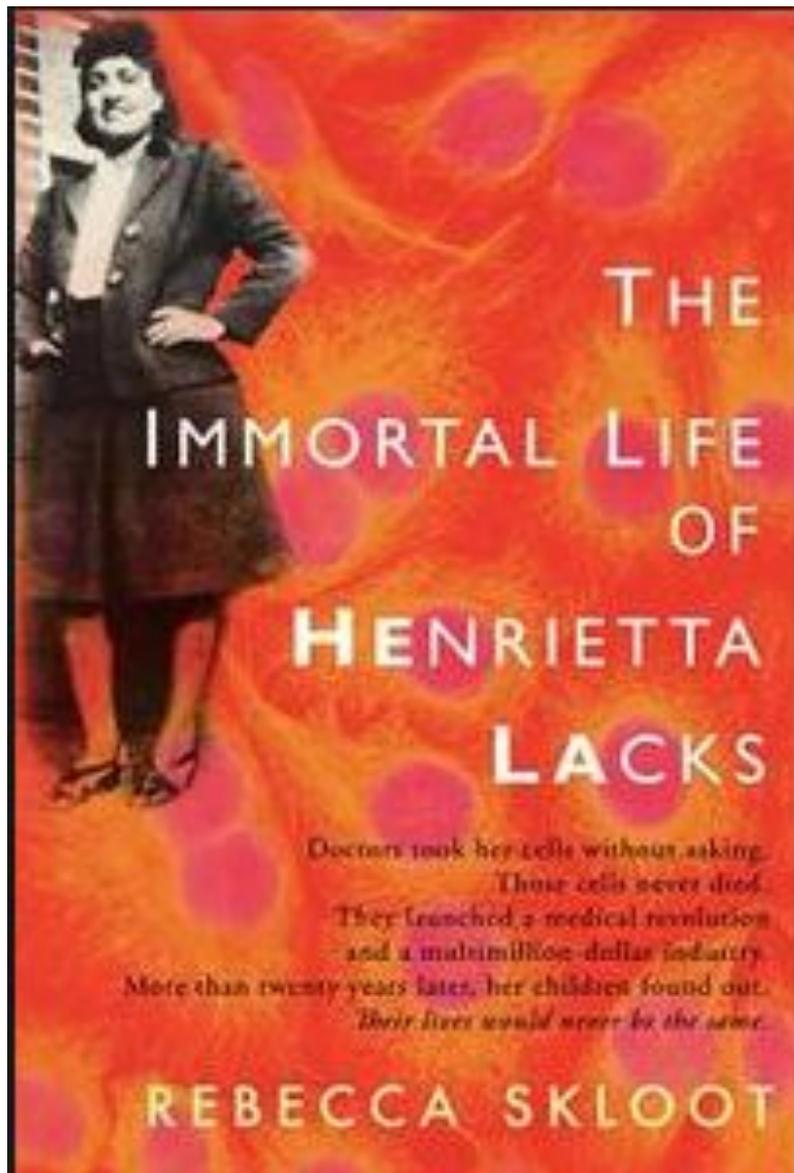
# HeLa

Одна из первых и наиболее широко используемых культур опухолевых клеток человека

- 8 января 1951 г.: выделена из раковой опухоли шейки матки (Henrietta Lacks (1920-1951))



Henrietta Lacks (circa 1945)



Опубликовано более чем 60,000 научных статей с использованием клеток HeLa. Интенсивно используется для исследования раковых заболеваний.

Клетки HeLa называют **«бессмертными»**, они способны делиться бесконечное число раз, в отличие от обычных клеток.

Были заражены геномом вируса папилломы, от которого умерла женщина. Обладают аномальным кариотипом: различные сублинии HeLa имеют 49 — 78 хромосом.

Recent National (US) Bestseller story about Henrietta Lacks

# Типы культур животных клеток

в зависимости от продолжительности культивирования

## Первичные культуры

Свежевыделенные культуры.

Существуют лишь до первого пересева даже при систематической смене питательной среды

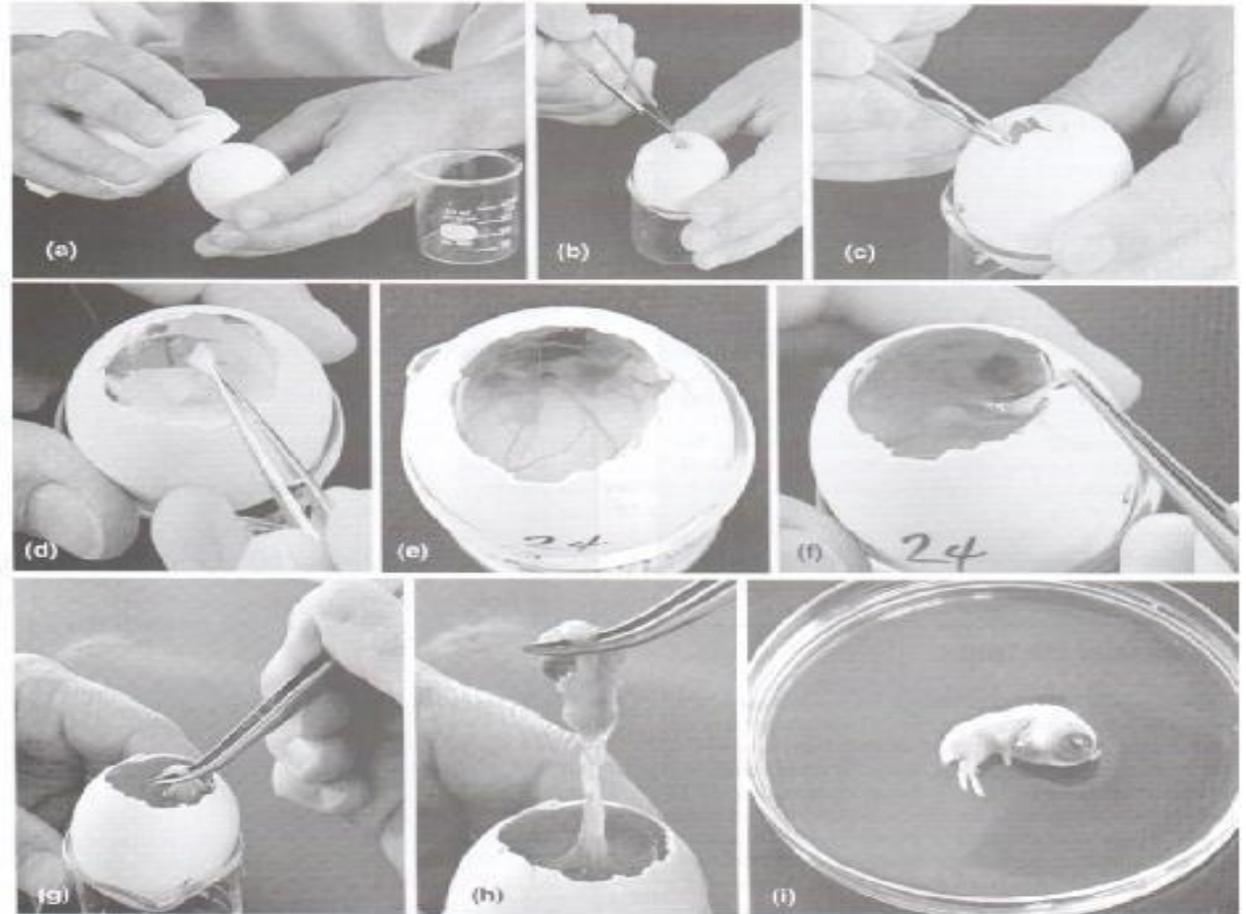
## Клеточные линии

Культуры, подвергаемые пассированию в течение ограниченного времени (до 50 пассажей) либо способные к неограниченному росту

# Получение первичной культуры

## Этап 1. Стерильное удаление фрагмента ткани, органа животного

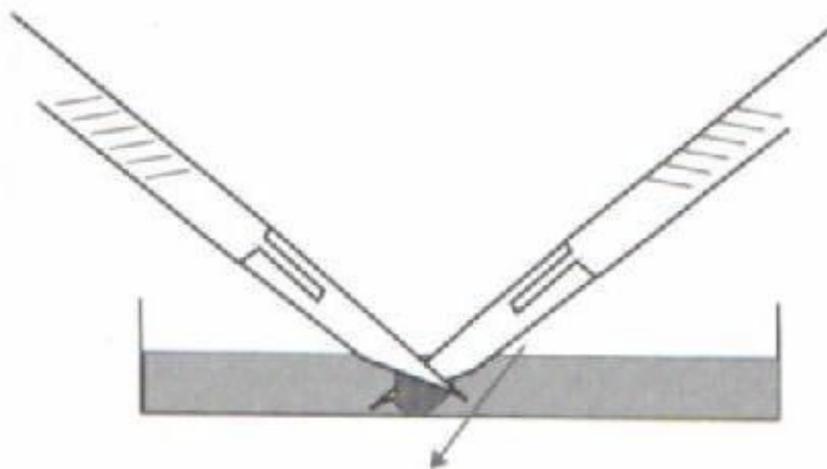
Источником получения первичных культур клеток чаще всего являются эмбриональные ткани (например, птиц и других экспериментальных животных, абортированных 8-14-недельных плодов человека)



# Получение первичной культуры

## Этап 2. Механическая и ферментативная дезагрегация экспланта

**2.1.** Ткань измельчается до кусочков объемом до 1-3 мм, экспланты отмываются от эритроцитов раствором Хенкса с антибиотиками пока жидкость не станет почти прозрачной



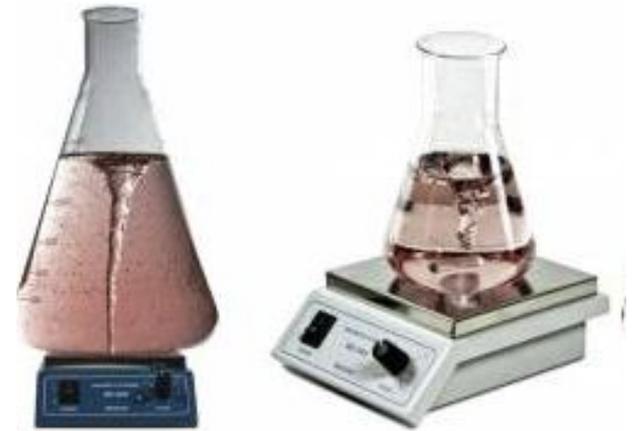
(a) Scraping or "spillage".



**2.2. Для разрушения межклеточного вещества используют ферменты: трипсин или коллагеназу**

Обработку раствором трипсина можно проводить при комнатной (холодная трипсинизация) либо повышенной температуре (+37°C).

Кусочки ткани заливают раствором трипсина и в смесителе на магнитной мешалке перемешивают взвесь в течение 10-30 мин



# Получение первичной культуры

## Этап 3. Центрифугирование полученной суспензии клеток

Для отделения крупных комочков ткани и соединительнотканых волокон содержащую клетки жидкость фильтруют через марлю, затем центрифугируют при 800-1000 об/мин в течение 5 мин.



# Получение первичной культуры

## Этап 4. Ресуспендирование клеток в питательной среде, перенос в культуральные сосуды

Надосадочную жидкость сливают, осадок отмывают и разводят питательной средой, чтобы получить в 1 мл 100 000-400 000 клеток.

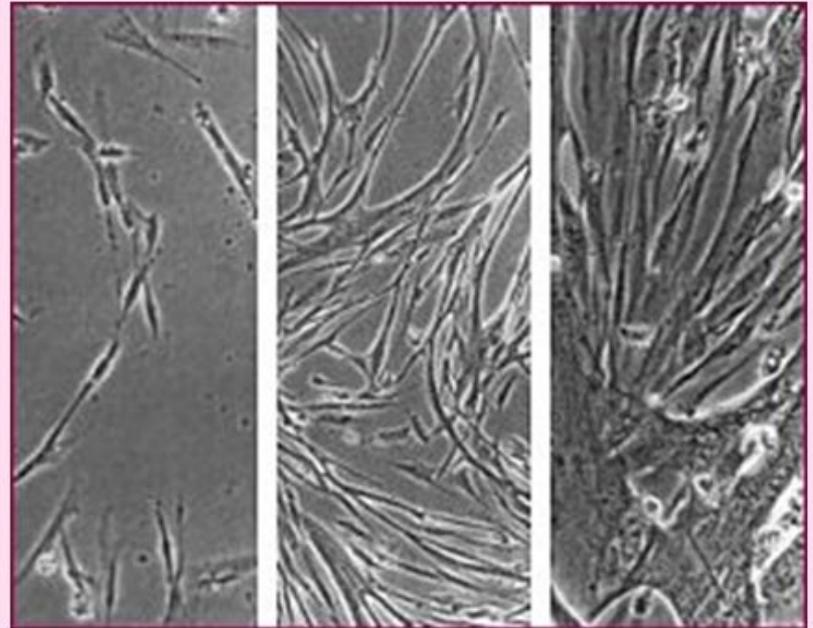
Взвесь клеток разливают в матрицы, плотно закрывают пробками и помещают в термостат при температуре 37 °С.



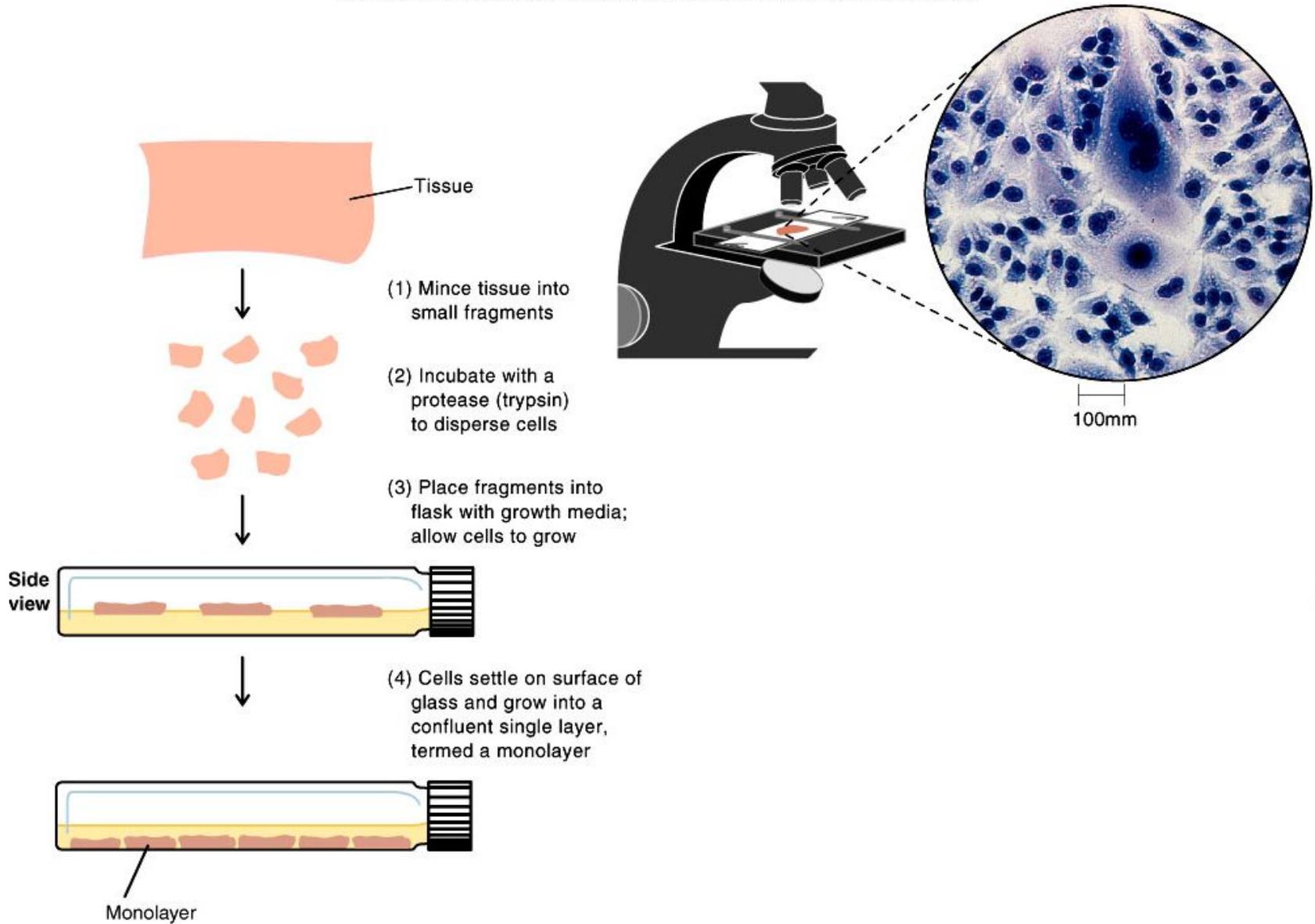
# Получение первичной культуры

## Этап 5. Формирование монослойной культуры

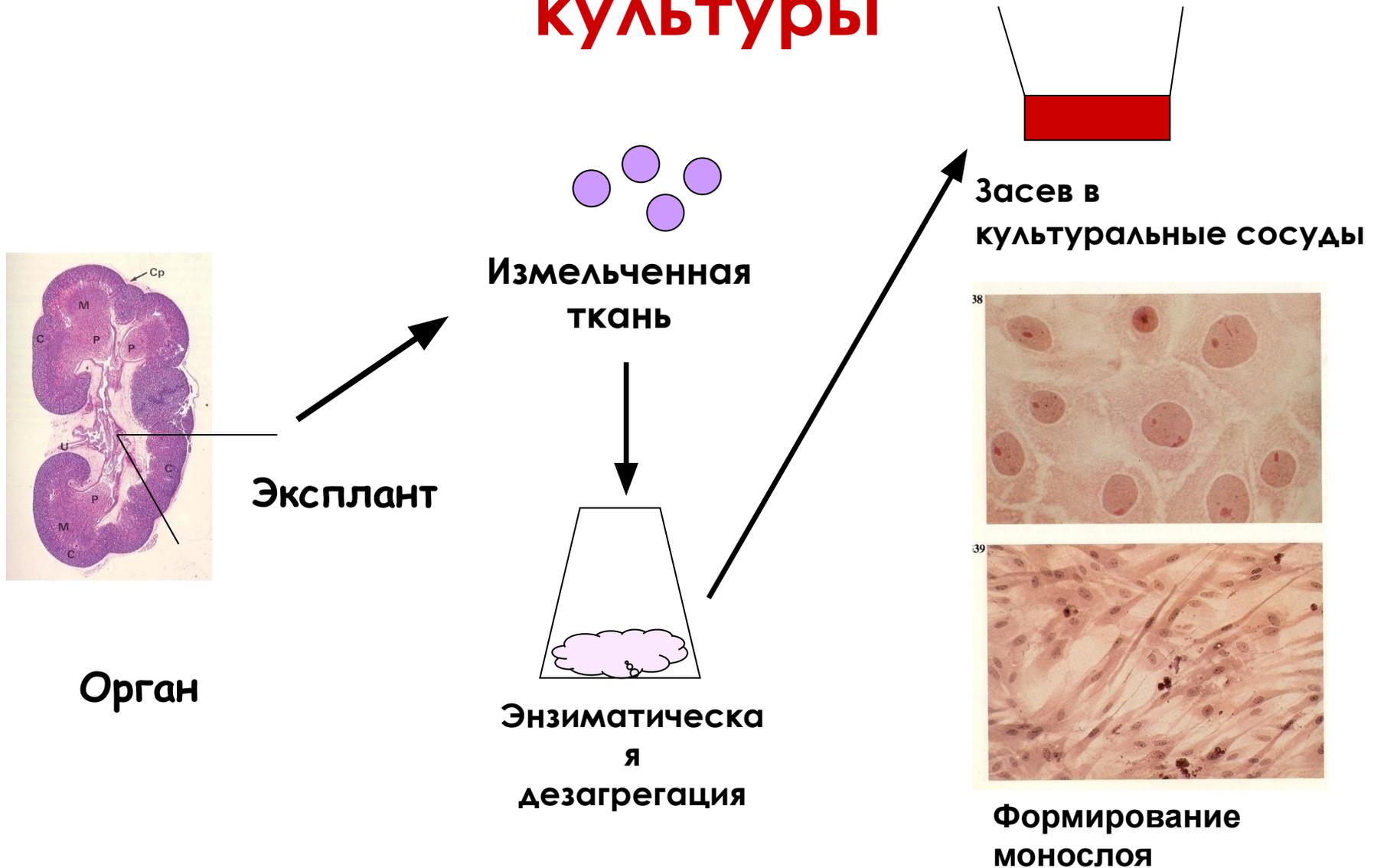
Прикрепляясь к субстрату, клетки в течение нескольких суток (как правило, 5-7) образуют монослой в виде пласта, сцепленного со стенками матрасцев



Рост миобластов в культуре



# Схема получения первичной культуры



# Как определить, что клеточную культуру пора посеять?

- клетки образуют плотный монослой;
- индикатор-краситель меняет цвет  
(например, индикаторный краситель Phenol Red (феноловый красный) меняет цвет с ярко-красного в свежей среде до желто-оранжевого в среде с культивируемыми в течение некоторого времени клетками)



**Первичная культура**

*Субкультивирование*

**Клеточная линия**

**Ограниченная**

**Постоянная**

*Деградация*

*Трансформация*

# КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ

**1. Клеточные линии с ограниченным ростом – культуры клеток, которые сохраняют способность к делению в течение определенного времени**

**К ним относятся диплоидные культуры (диплоидные штаммы).**

**В зависимости от вида животного продолжительность жизни диплоидных штаммов различна:**

**для свиней – 25-40 пассажей,  
овец – 30-35 пассажей,  
крупного рогатого скота – 30-45 пассажей,  
лошадей – 50-60 пассажей.**

**Человек  $50 \pm 10$  пассажей**

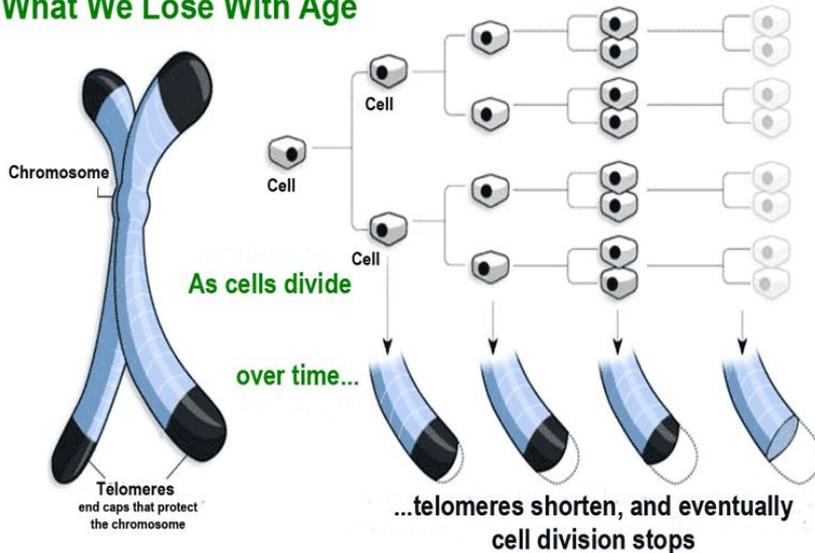
**Наиболее активное размножение клеток диплоидных штаммов наблюдают в период от **5 до 20 пассажей**, затем активность клеточного метаболизма снижается.**

# Предел или лимит Хейфлика — число делений соматических клеток

Максимальное число делений различно в зависимости от типа клеток и ещё сильнее различается в зависимости от организма.

Для большинства человеческих клеток предел Хейфлика составляет 52 деления.

## What We Lose With Age

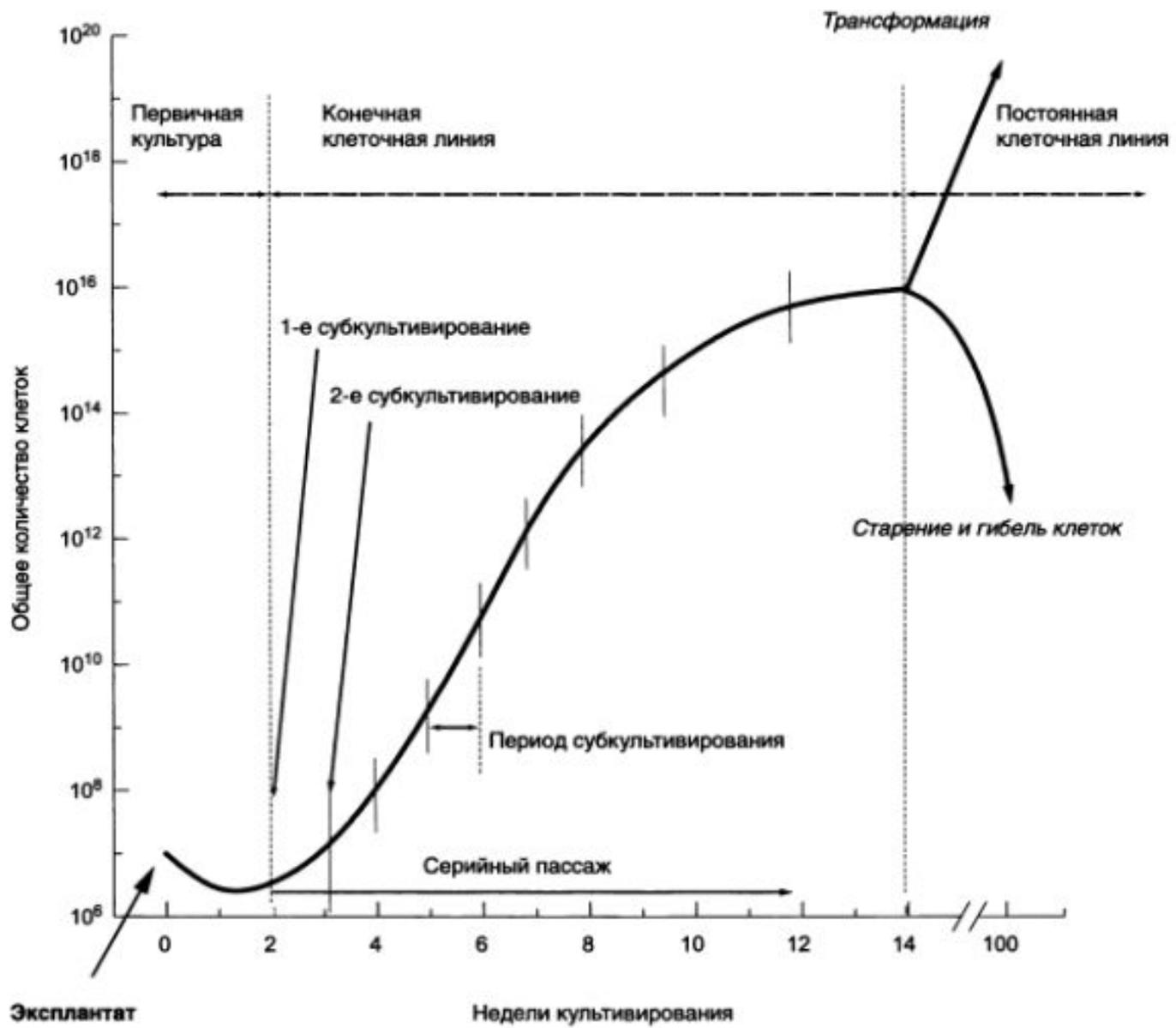


Граница Хейфлика связана с сокращением размера **теломер** - участков ДНК на концах хромосом

Раковые клетки производят фермент **теломеразу**, которая наращивает теломеры на концах ДНК хромосом

2009 г. - присуждение Нобелевской премии за исследования в области применения теломеразы.

**После определенного количества пассажей ограниченная клеточная линия либо стареет и дегенерирует, либо трансформируется и превращается в постоянную клеточную линию**



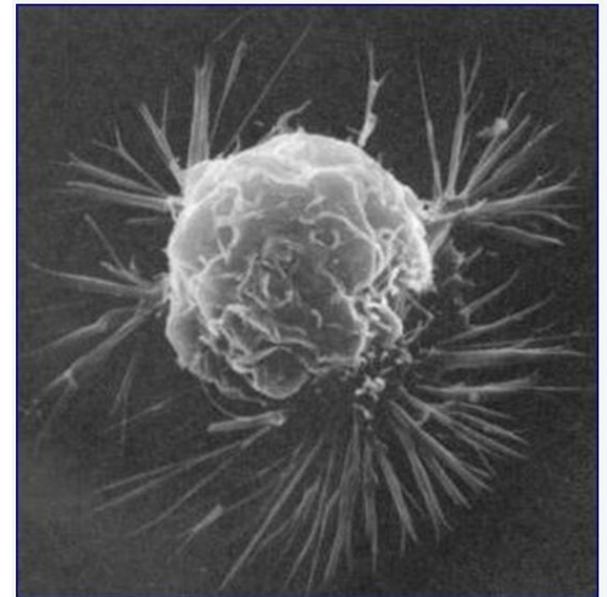
# КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ

**2. Постоянная клеточная линия** – линия клеток, которая поддерживается в результате последовательных субкультивирований неограниченно долгое время.

Полностью адаптированы к существованию вне организма. Автономно размножаются подобно бактериям. **Получают из раковых и реже нормальных тканей.**

# Преимущества постоянной клеточной линии:

- более высокая скорость роста;
- высокая плотность, а следовательно, и большой выход биомассы;
- возможность поддержания в более простых средах;
- способность к росту в суспензии



Раковая клетка молочной железы (человек)