

Клеточные тест- системы *in vitro*

Выполнил студент
группы: 16-БТ-МАГ

Будаева В.А.

Преподаватель
д.т.н., проф. Иванова Л.А.

История культивирования



Клод Бернар



Росс Харрисон



Вильгельм Ру

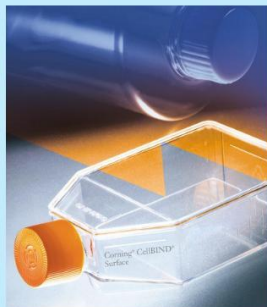
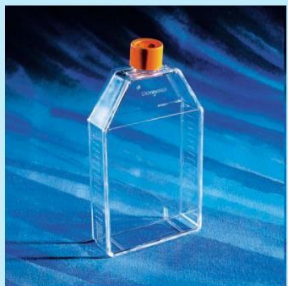


Алексис Каррель

Культивирование клеточных ЛИНИЙ

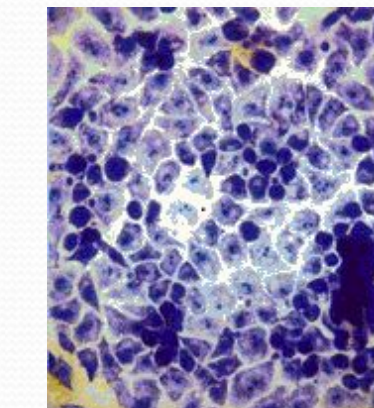
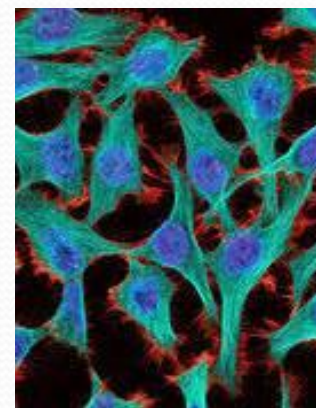
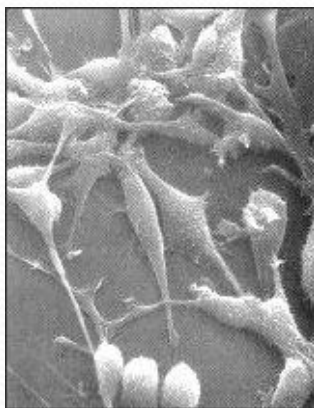
Культивирование клеток представляет собой процесс, посредством которого *in vitro* отдельные клетки (или единственная клетка) прокариот и эукариот искусственно выращиваются в контролируемых условиях.

Матрас для культивирования культур клеток и тканей.



ЖИВОТНЫХ

– это гомогенная популяция генетически однородных клеток, растущих в постоянных условиях



Получение – путем стерильного удаления фрагмента ткани и его дезагрегации:

- **Механически** ткань измельчают до кусочков объемом 1 мм³, которые прикрепляются к субстрату благодаря собственной адгезивности, наличию насечек на чашке или с помощью сгустка плазмы. Клетки, мигрирующие из эксплантатов, используются для пассирования.
- **Дезагрегация ферментами**: трипсином (0,25% неочищенный или 0,01–0,05 % очищенный) или коллагеназой (200–2000 ЕД/мл, неочищенная). Клетки образующейся суспензии оседают, прикрепляются к поверхности и распластываются на ней. Способ обеспечивает более высокий выход клеток.

Характеристика клеток, культивируемых in vitro

По виду животного

По типу ткани-источника:

- соединительная – фибробласты
- скелетная – кость и хрящи
- мышечная – скелетные, сердечные и гладкие мышцы
- эпителиальная – печень, легкие, кожа, мочевого пузыря, почки, молочная железа
- нервная – глиальные клетки и нейроны (хотя они лишены способности к пролиферации)
- эндокринная система – гипофиз, надпочечники, клетки островков Лангерганса

По состоянию ткани на момент извлечения:

- нормальные
- опухолевые

По способу выращивания:

- монослойные
- суспензионные
- на микроносителях

По количеству субкультивирований и сроку жизни:

- **первичные культуры** – получены непосредственно от организма и растут до первого субкультивирования
- **клеточные линии:**
 - диплоидные культуры – 75% клеток обладает кариотипом нормальных клеток исходного вида
 - постоянные (перевиваемые, непрерывные) гетероплоидные культуры, существующие вне организма десятки лет

Системы культивирования клеток

Основные системы культивирования клеток.

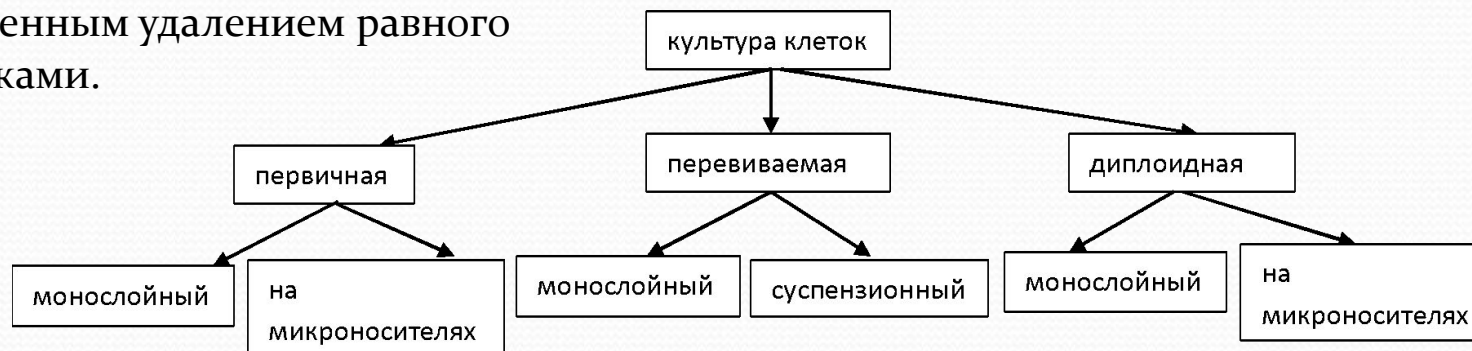
1. Непроточные культуры - тип культур, в котором клетки вводят в фиксированный объем среды, при истощении которой происходит прекращение пролиферации клеток. Способы увеличения продолжительности жизни непроточных культур:

• прерывистый

• постоянный

• перфузионный, открытый и закрытый.

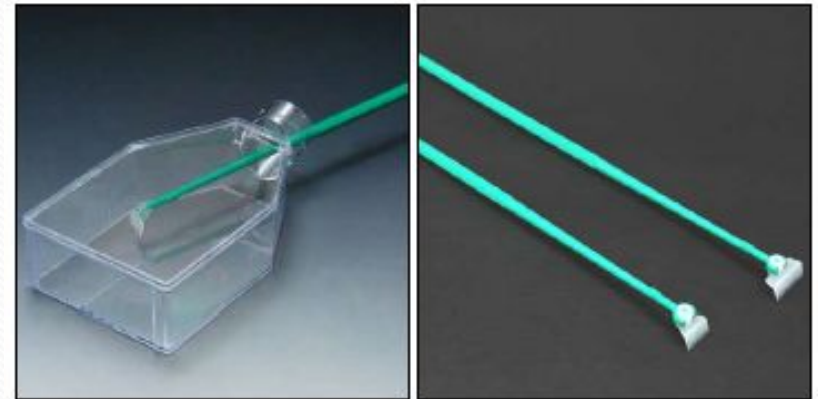
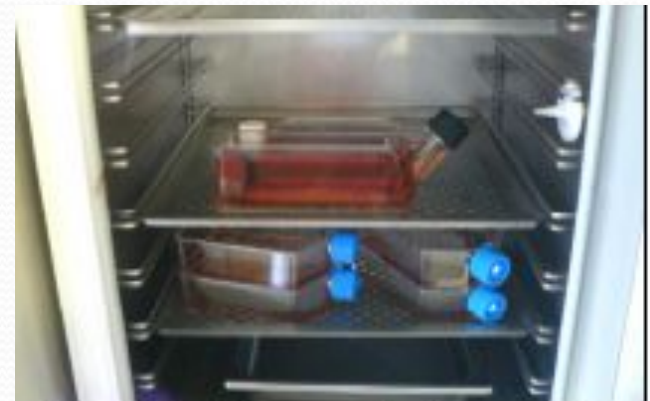
2. Проточные культуры - без изменения концентрации питательных веществ и метаболитов, а также числа клеток. Гомеостаз обусловлен постоянным вхождением среды в культуру и одновременным удалением равного объема среды с клетками.



Монослойный способ

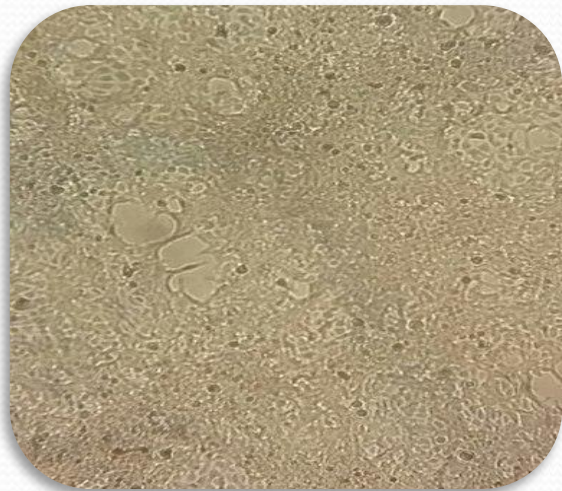
Большинство нетрансформированных клеток млекопитающих могут расти *in vivo* и *in vitro* только будучи прикрепленными к субстрату:

- стеклу (алюмоборосиликатное стекло, чаще модифицированное)
- пластику (обработанные полистирол, полиэтилен, поликарбонат, поливинилхлорид, тефлон, целлофан и др.)
- металлу (нержавеющая сталь или титан)
- другим клеткам

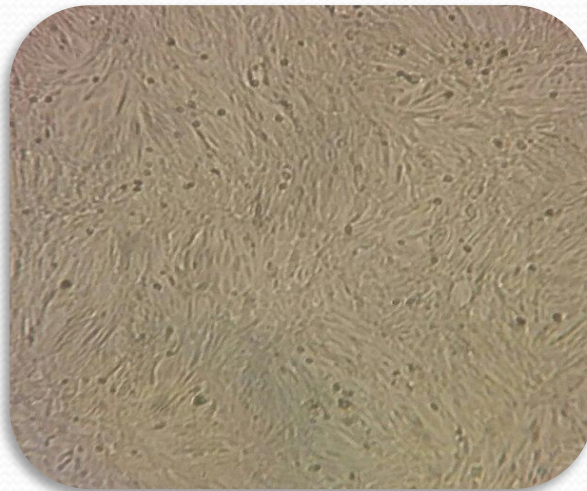


Выбор клеточных тест-систем

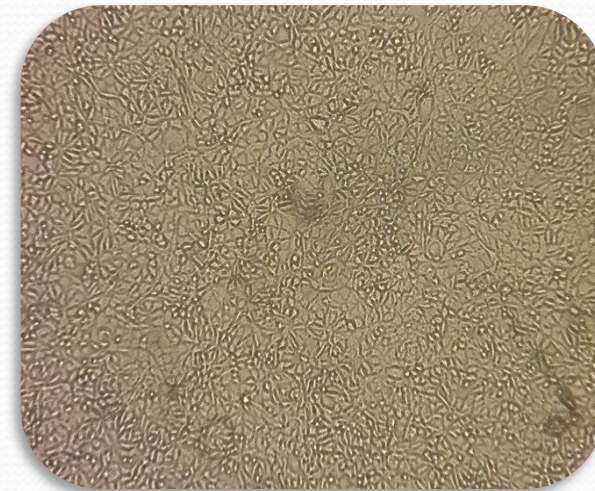
Монослой клеточных линий при 10×увеличении



HEK 293, человек,
клетки почки
эмбриона



VERO, африканская
зеленая мартышка,
почка



NCTC, мышь СЗН/An,
подкожная
соединительная ткань

Питательные среды и добавки

Стандартные среды для ведения культур животных клеток:

- среды Игла MEM (minimal essential medium) и BME (basal medium, Eagle)
- среда Дульбекко DME или DMEM (двойная модификация среды Игла)
- среда Искова IMDM – модификация среда Дульбекко
- среда МакКоя 5A и серия сред RPMI
- среда 199

5–20% биологических жидкостей, например, фетальной (эмбриональной) бычьей сыворотки, сыворотки крови жеребцов или телят для обеспечения клеток:

- гормонами (кортикостероиды, инсулин, простагландины)
- ростовыми факторами (эмбриональным, фибробластным, тромбоцитным, опухоленекротическим)
- факторами прикрепления и распластывания клеток (коллаген, фибронектин, ламинин)
- транспортными белками (альбумин, трансферрин)

Антибиотики

для уничтожения микрофлоры: пенициллин (100 ЕД/мл), стрептомицин (50 ЕД/мл), тетрациклин (100 ЕД/мл)

Состав питательных сред для клеточных тест-систем

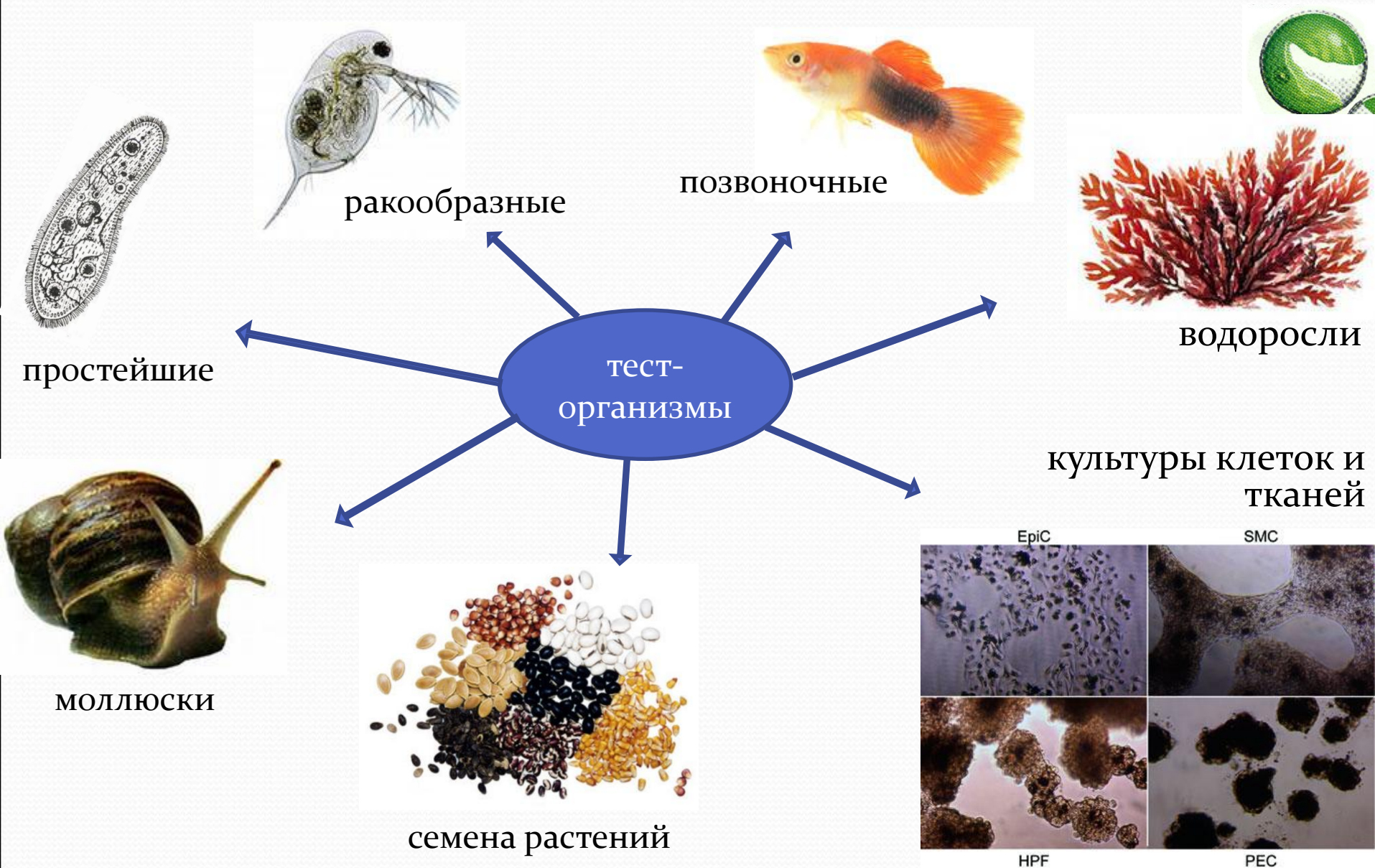
Питательная среда и компоненты	Клеточная линия				
	HEK 293	FLECH	MH-22a	HEp-2	NCTC
Питательная среда EMEM с L-глутамином, мл	–	–	–	9	9
Питательная среда DMEM с L-глутамином, глюкоза 1 г/л, мл	9	9	9	–	–
Сыворотка КРС для культур клеток, бычья, мл	1	1	1	1	1

Название и компоненты сред	Клеточные линии		
	HEp-2	VERO	FLECH
Питательная среда DMEM с L-глутамином, глюкоза 1 г/л, мл	9	9	–
Питательная среда EMEM с L-глутамином, мл	–	–	4,5
Питательная среда 199, мл	–	–	4,5
Сыворотка крови КРС для культур клеток, мл	1	1	1



Биотестирование

- определение степени безопасности объектов по реакции живых организмов



Способ определения безопасности пищевых ингредиентов с помощью клеточных тест-систем

На основе исследований клеточных систем *in vitro* был получен патент «Способ определения безопасности пищевых ингредиентов с помощью клеточных тест-систем» авторы Чеботарёв И.И., Никонов И.Н., Машенцева Н.Г., Чеботарёва С.Е., Фисинин В.И., Клабукова Д.Л.



**Спасибо за
внимание!**