

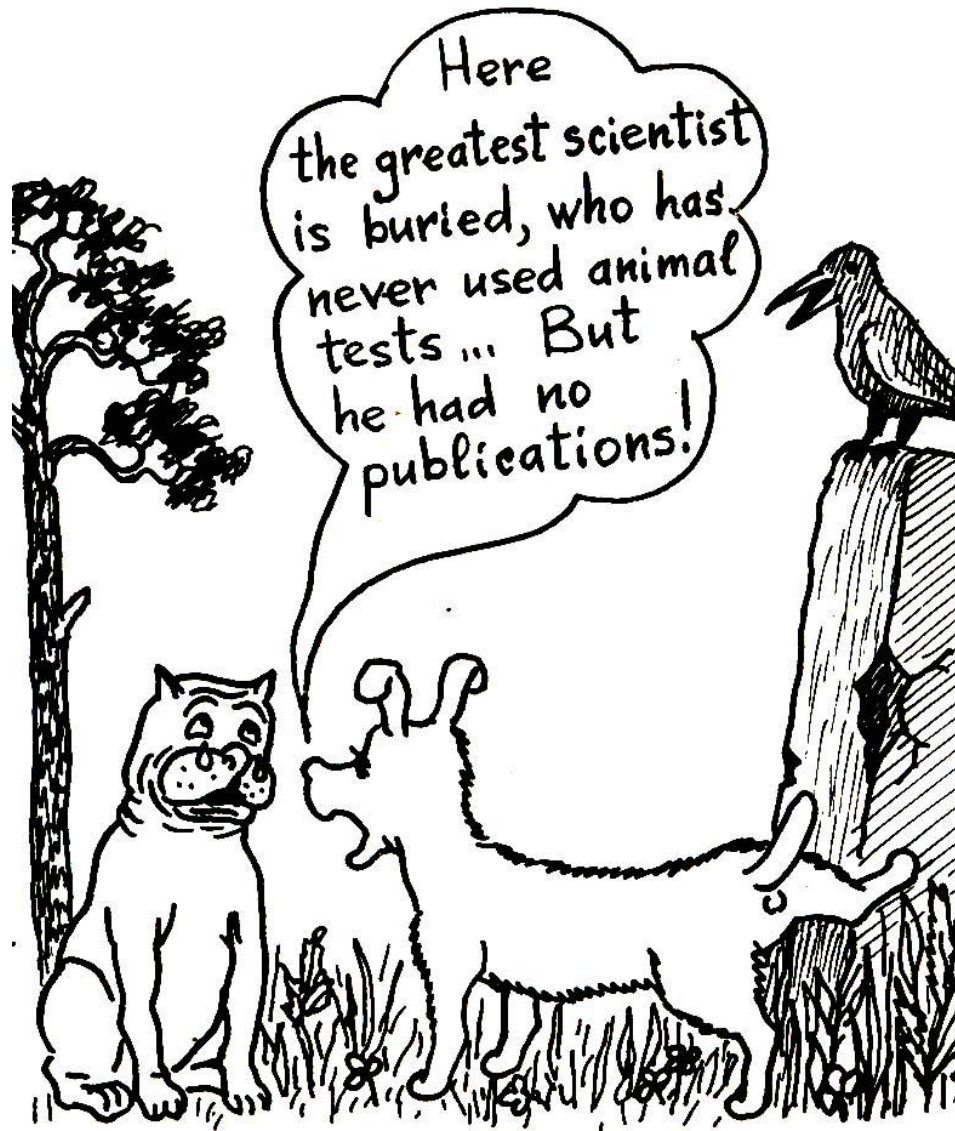
# **Биология клетки в культуре**

*памяти Алексиса Карреля*

**Оборудование и среды для  
работы с клеточными  
культурами**

# *Лекция 1*

**Оборудование и среды для  
работы с клеточными  
культурами**



Here  
the greatest scientist  
is buried, who has  
never used animal  
tests ... But  
he had no  
publications!

- **КАРРЕЛЬ** (Carrel), Алексис
- 28 июня 1873 г. – 5 ноября 1944 г.
- Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1912 г.

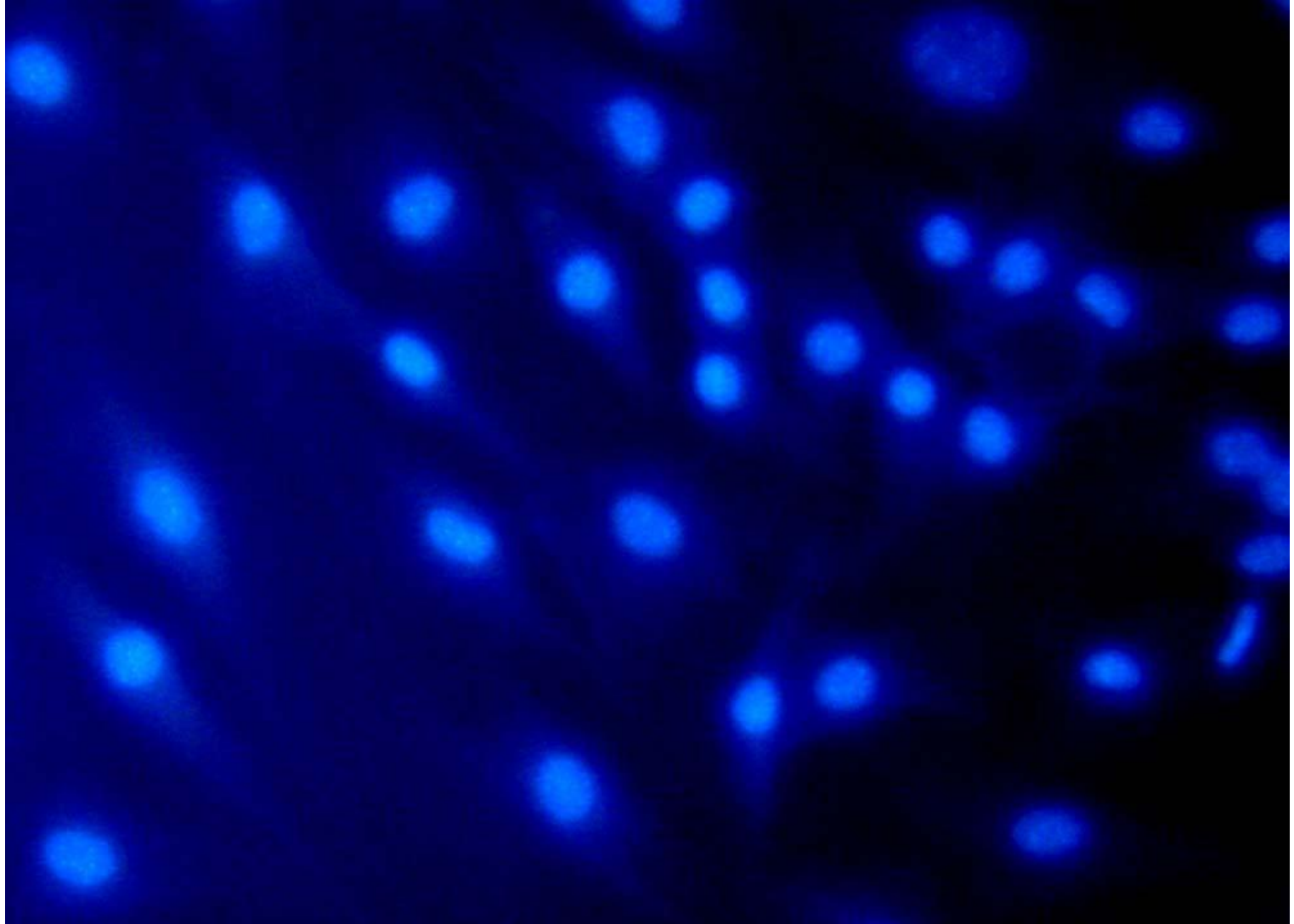


- Carrel A. La technique operatoire des anastomoses vasculaires et de la transplantation des visceres. Lyon Medical, 1902, .99:110-113
- Carrel A, Guthrie CC. Functions of a transplanted kidney. Science. 1905 22(563):473.
- Carrel A, Guthrie CC. Results of a replantation of the thigh. Science. 1906. 23(584):393-4.
- Carrel A. Remote results of the replantation of the kidney and the spleen. J Exp Med. 1910,12:146-50.
- Carrel A. Latent life of arteries. J Exp Med. 1910 Jul 23;12(4):460-86.
- Carrel A. Graft of the Vena Cava on the Abdominal Aorta. Ann Surg. 1910 Oct;52(4):462-70
- Carrel A. On the permanent life of tissues outside of the organism. J Exp Med. 1912 May 1;15(5):516-28.
- Carrel A. Pure cultures of cells. J Exp Med. 1912 Aug 1;16(2):165-8.
- Carrel A, Ebeling AH. Action of shaken serum on homologous fibroblasts. J Exp Med. 1922 Sep 30;36(4):399-403.
- Carrel A. A method for the physiological study of tissues in vitro. J Exp Med. 1923 Sep 30;38(4):407-18.
- Carrel A, Ebeling AH. Survival and growth of fibroblasts in vitro. J Exp Med. 1923 Oct 31;38(5):487-97.
- Carrel A. The Immortality of Animal Tissues and Its Significance. Can Med Assoc J. 1928 Mar;18(3):327-9.
- Carrel A, Lindbergh CA. The culture of whole organs. Science. 1935 Jun 21;81(2112):621-3.

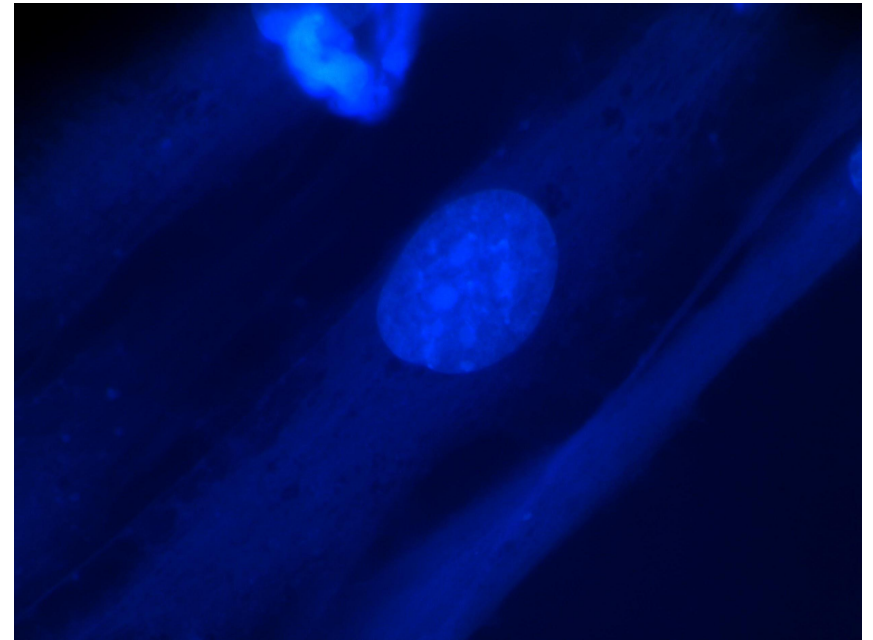
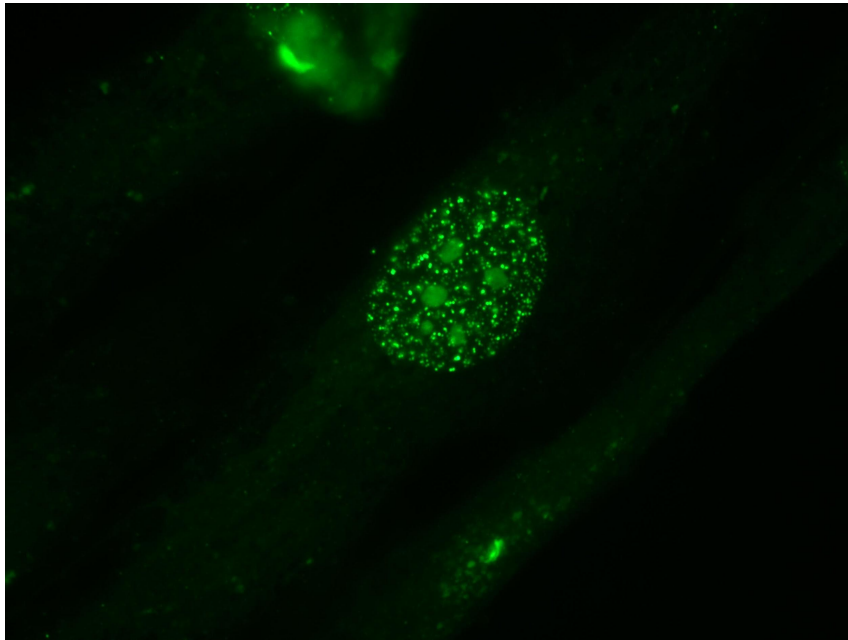
# Alexis Carrel: Man, The Unknown. Doubleday, NY 1935, p. 391

Каррель был одним из сторонников евгеники и его знаменитая научно-философская книга «Человек, непознанное» вся пронизана мыслями о сохранении и улучшении качества человеческой популяции. По его мнению интеллектуалы должны создать свой всемирный совет, обладающий достаточным знанием для предотвращения физического и умственного вырождения цивилизованных наций, который будет давать рекомендации политическим лидерам во благо процветания всего человечества.

# Старение клеток первичной культуры



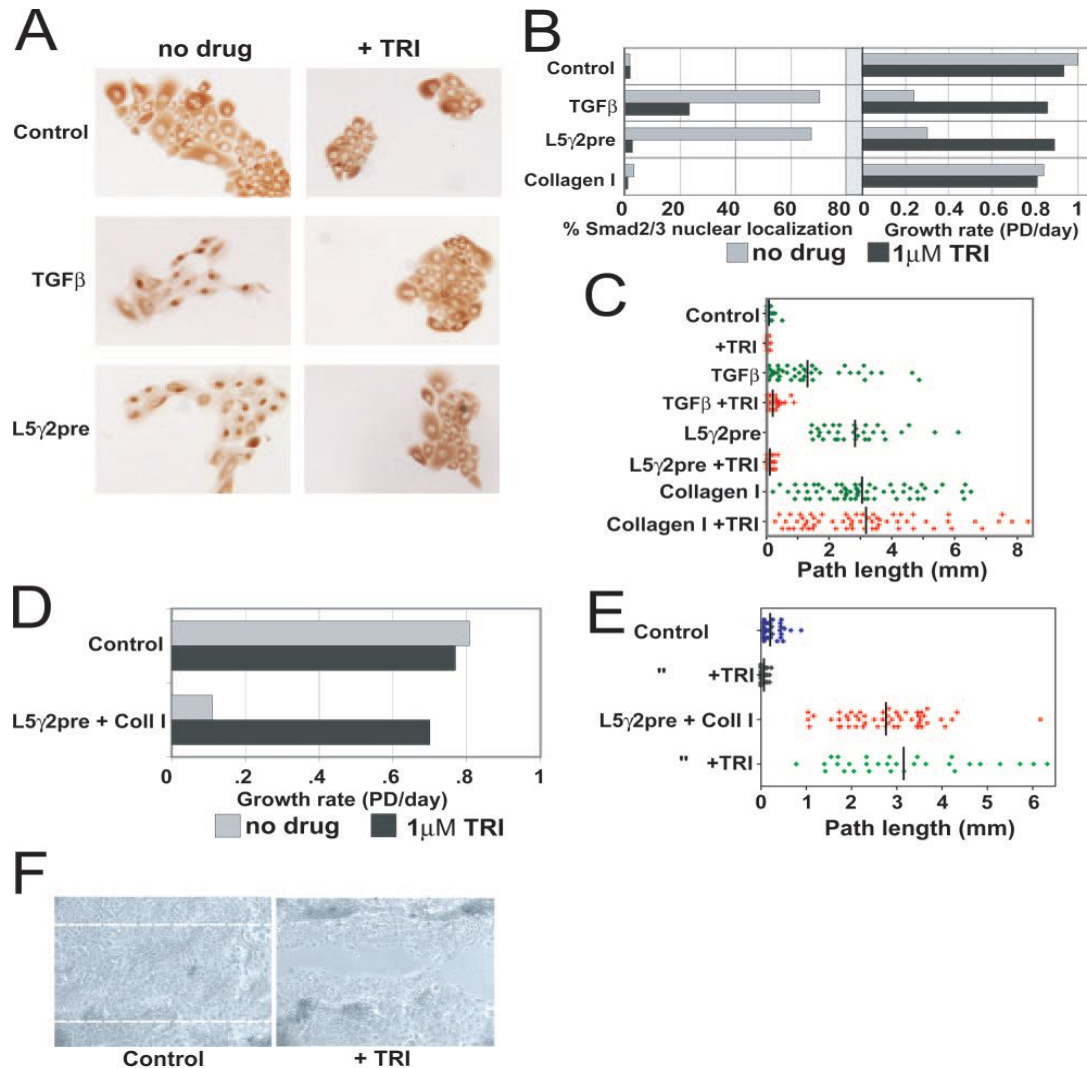
# Фокусы 53BP1 в фибробластах человека





# A Keratinocyte Hypermotility/Growth-Arrest Response Involving Laminin 5 and p16INK4A Activated in Wound Healing and Senescence

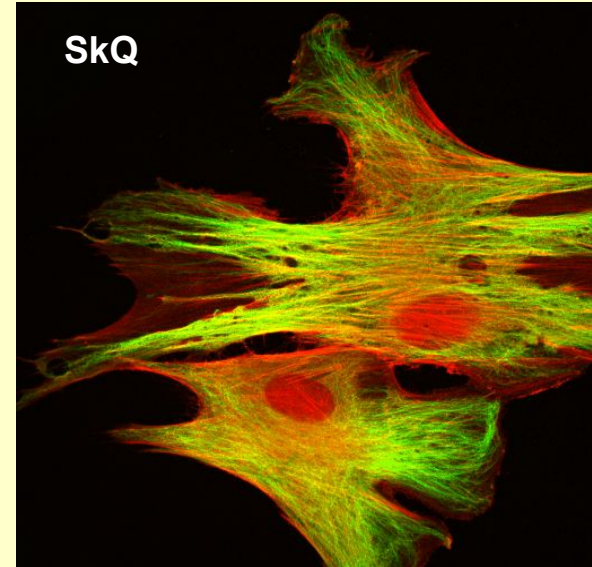
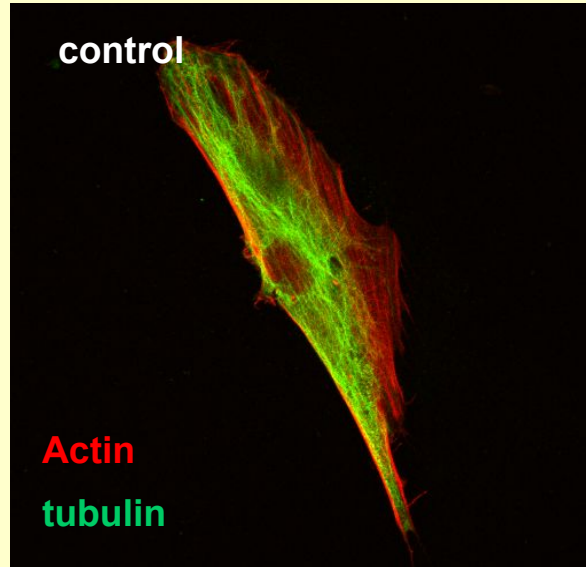
Natarajan et al., 2006



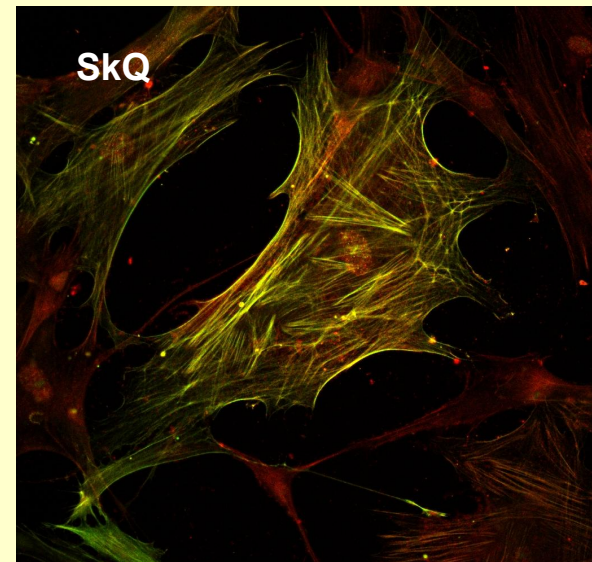
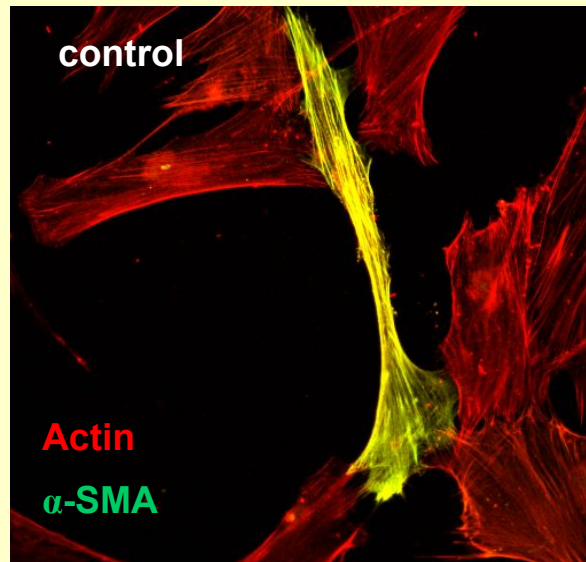
# SkQ induced cell area enhancement and smooth-muscle actin ( $\alpha$ -SMA) expression

Human subcutaneous fibroblasts

Control

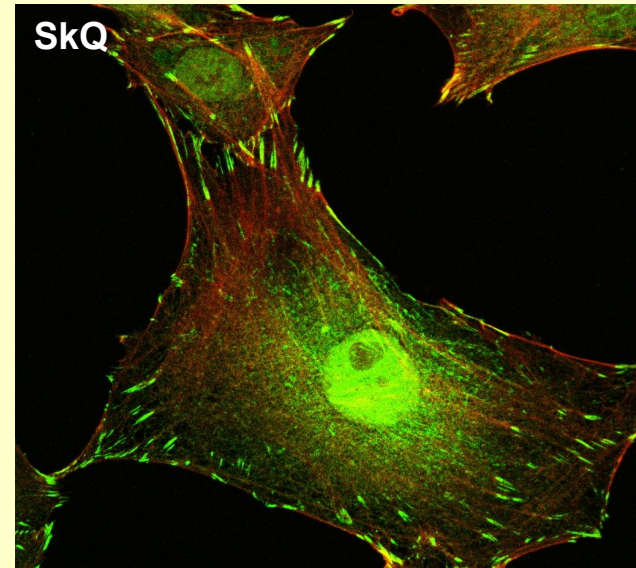
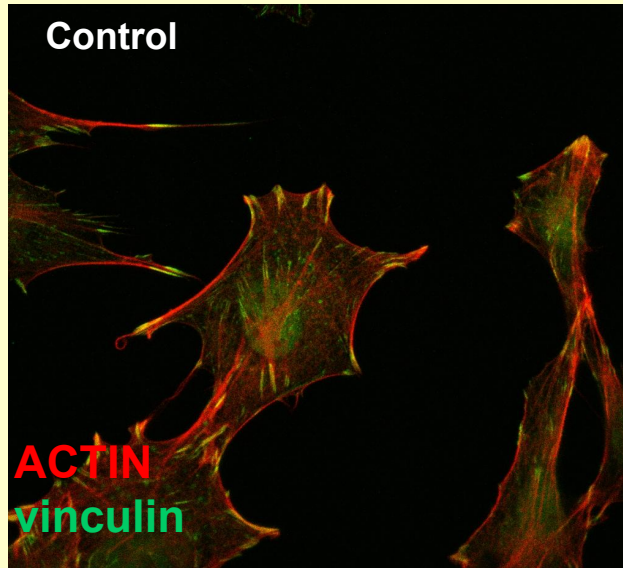


Control

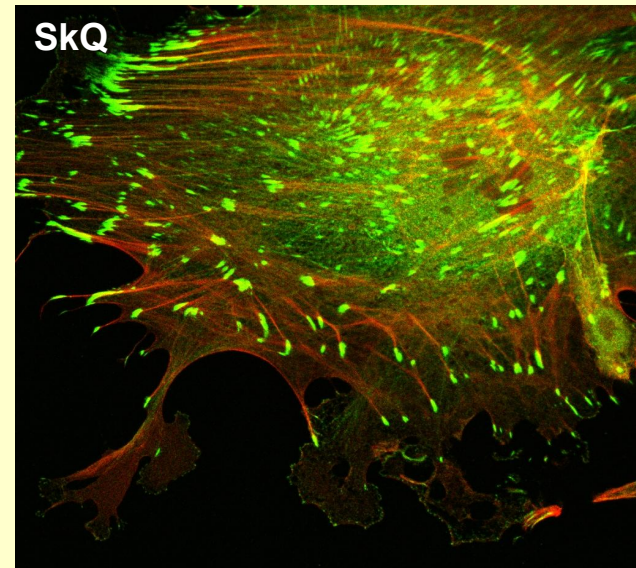
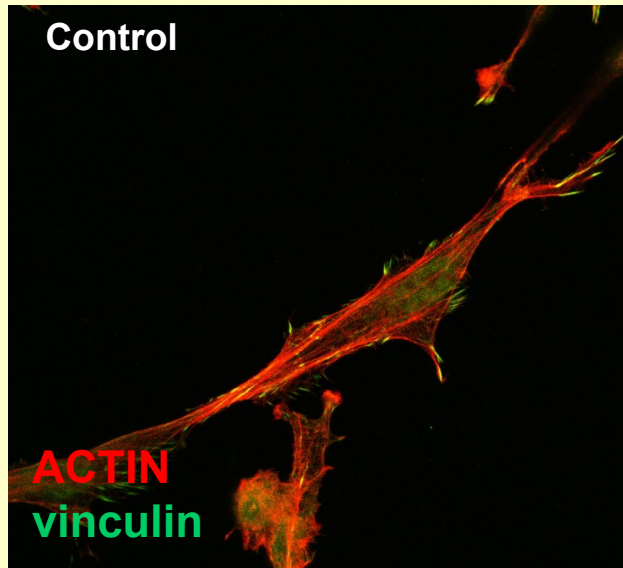


# SkQ induced cell area and focal contacts enhancement

Normal mouse fibroblasts line 10/3

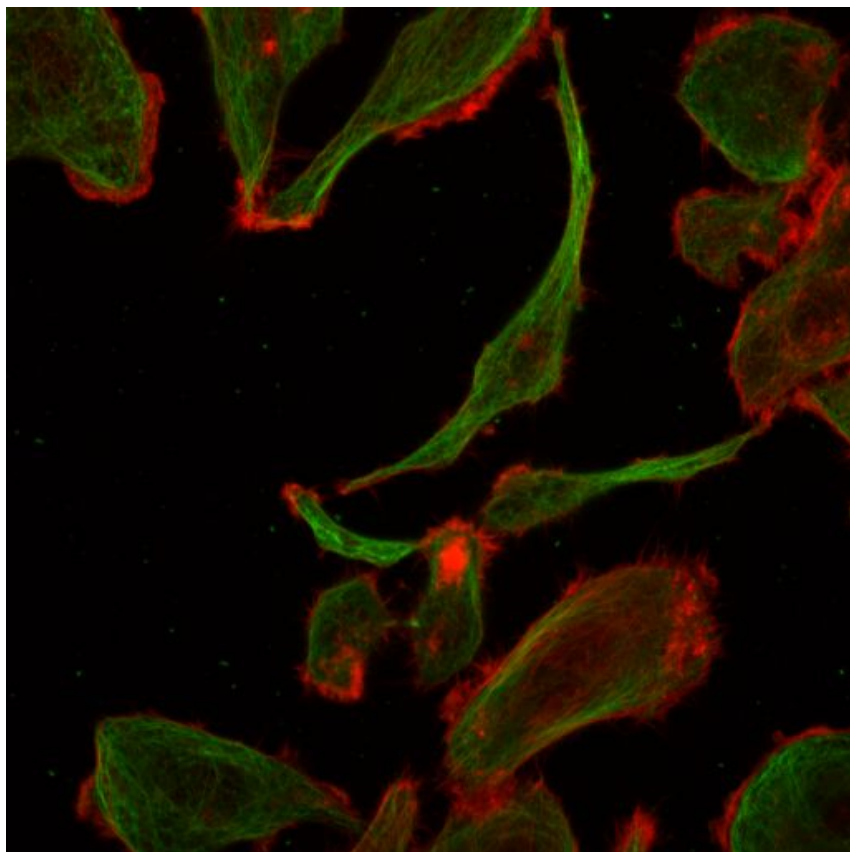


Transformed mouse fibroblasts line 10/3 ras

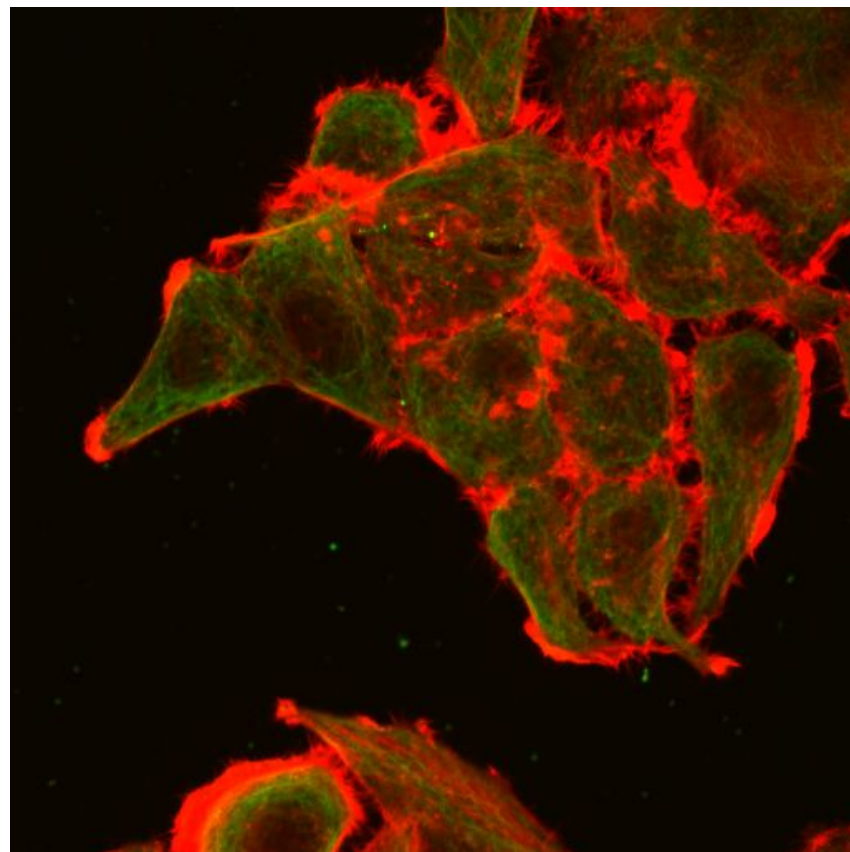


Изменение цитоскелета в клетках SiHa (карцинома шейки матки человека) под действием SkQ1 (20нМ, 7 с, 1 с без в-ва)

контроль



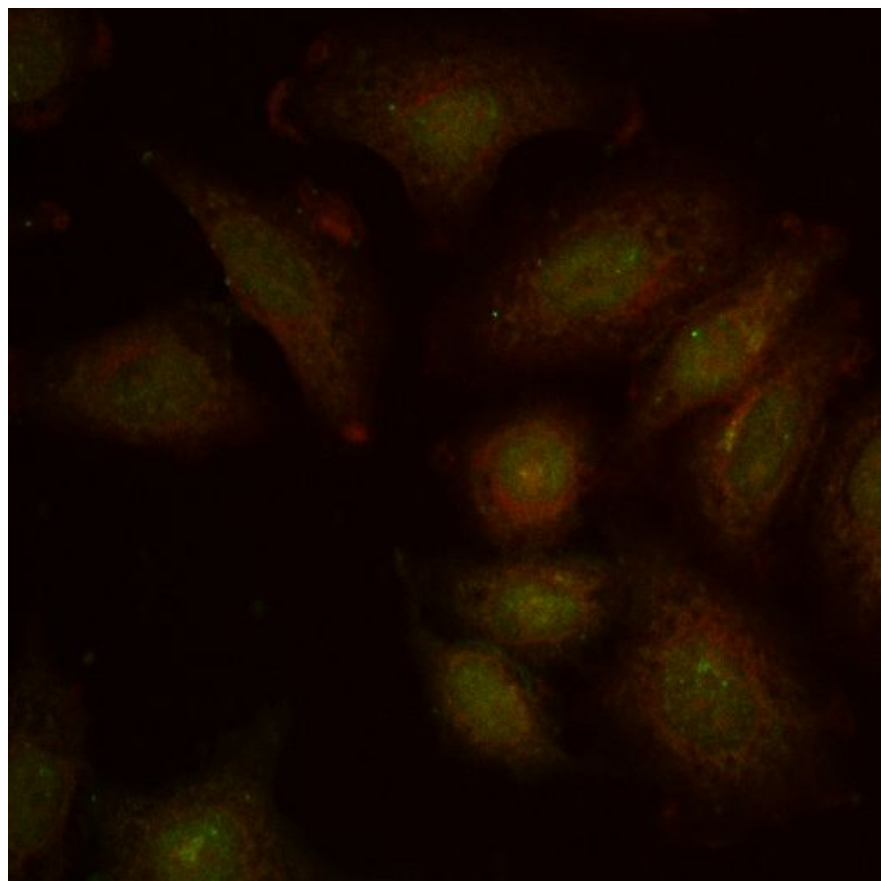
SkQ



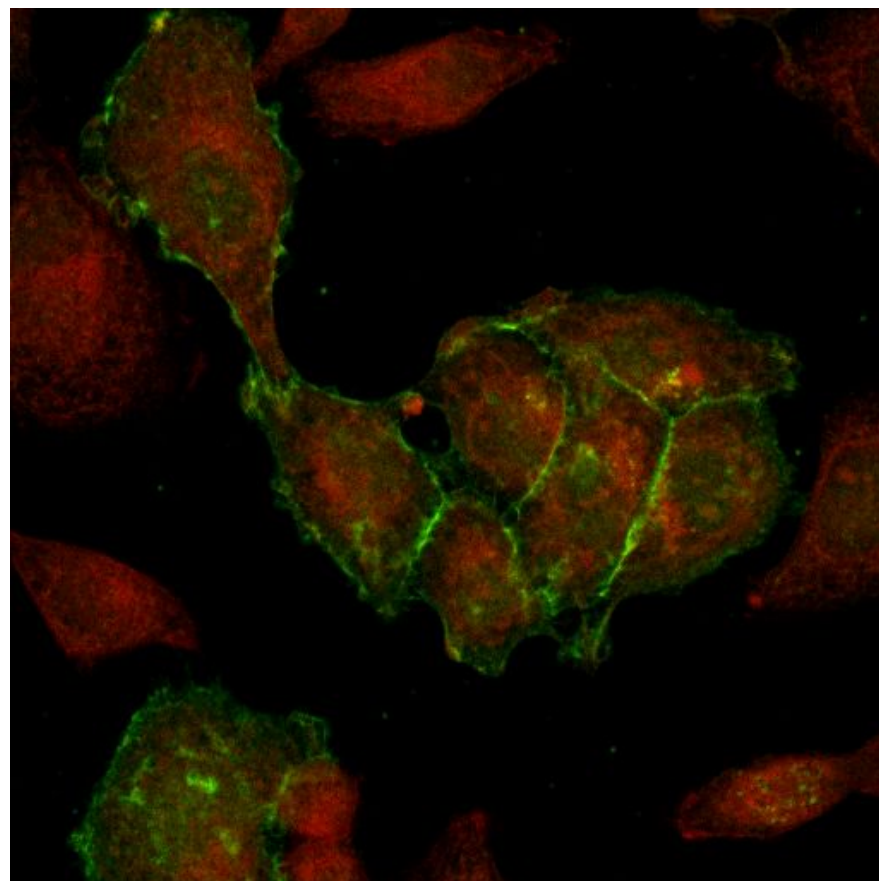
актин – **красный** тубулин - **зеленый**

Изменение межклеточных контактов в клетках SiHa  
(карцинома шейки матки человека) под действием SkQ1  
(20нМ, 7 с, 1 с без в-ва)

контроль



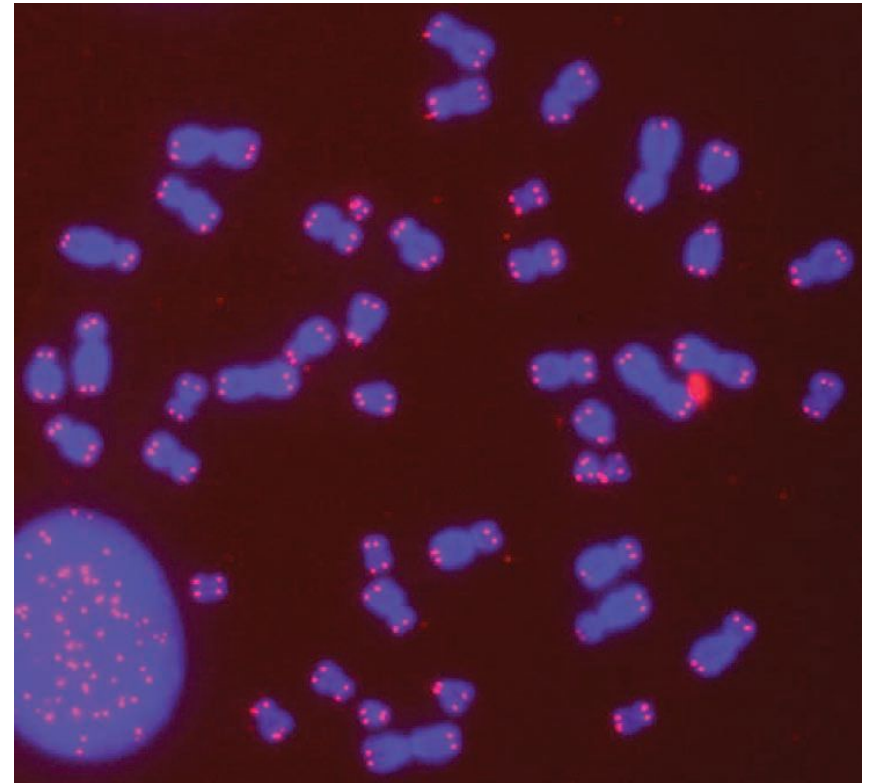
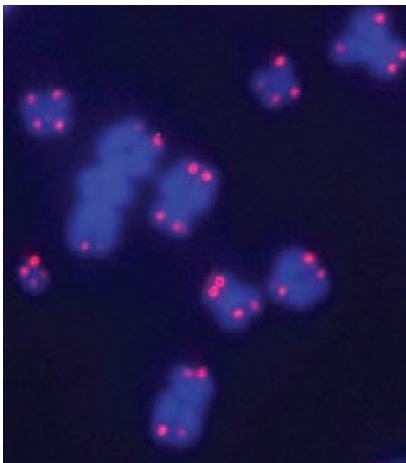
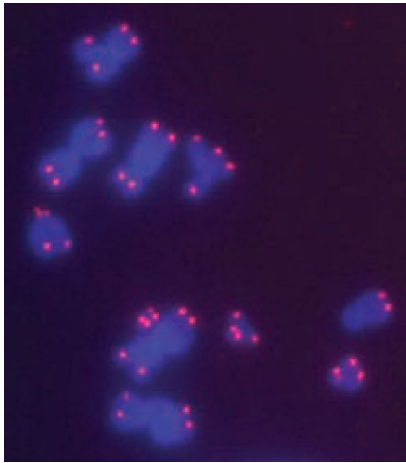
SkQ



актин – **красный**    β-катенин - **зеленый**

# Analysis of telomere loss in clone BNmt-On cultures

expressing NBS1S278A/S343A (Yongli Bai and John P. Murnane, 2003)



Scaffidi P., Misteli T. 2006. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*. 312:1059-1063

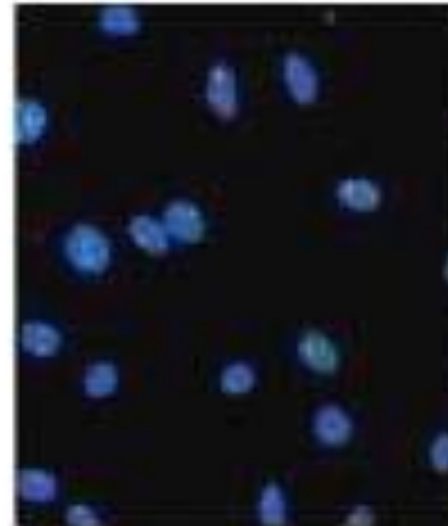
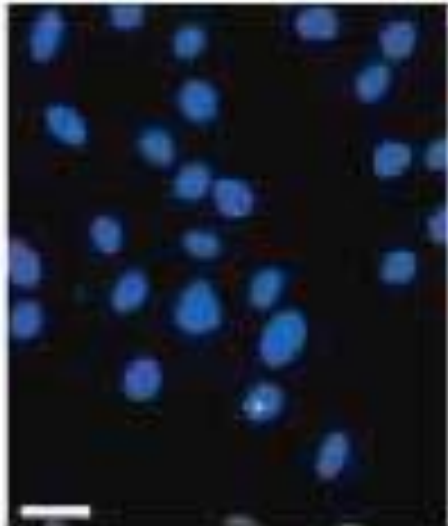
G

DAPI+H2AX

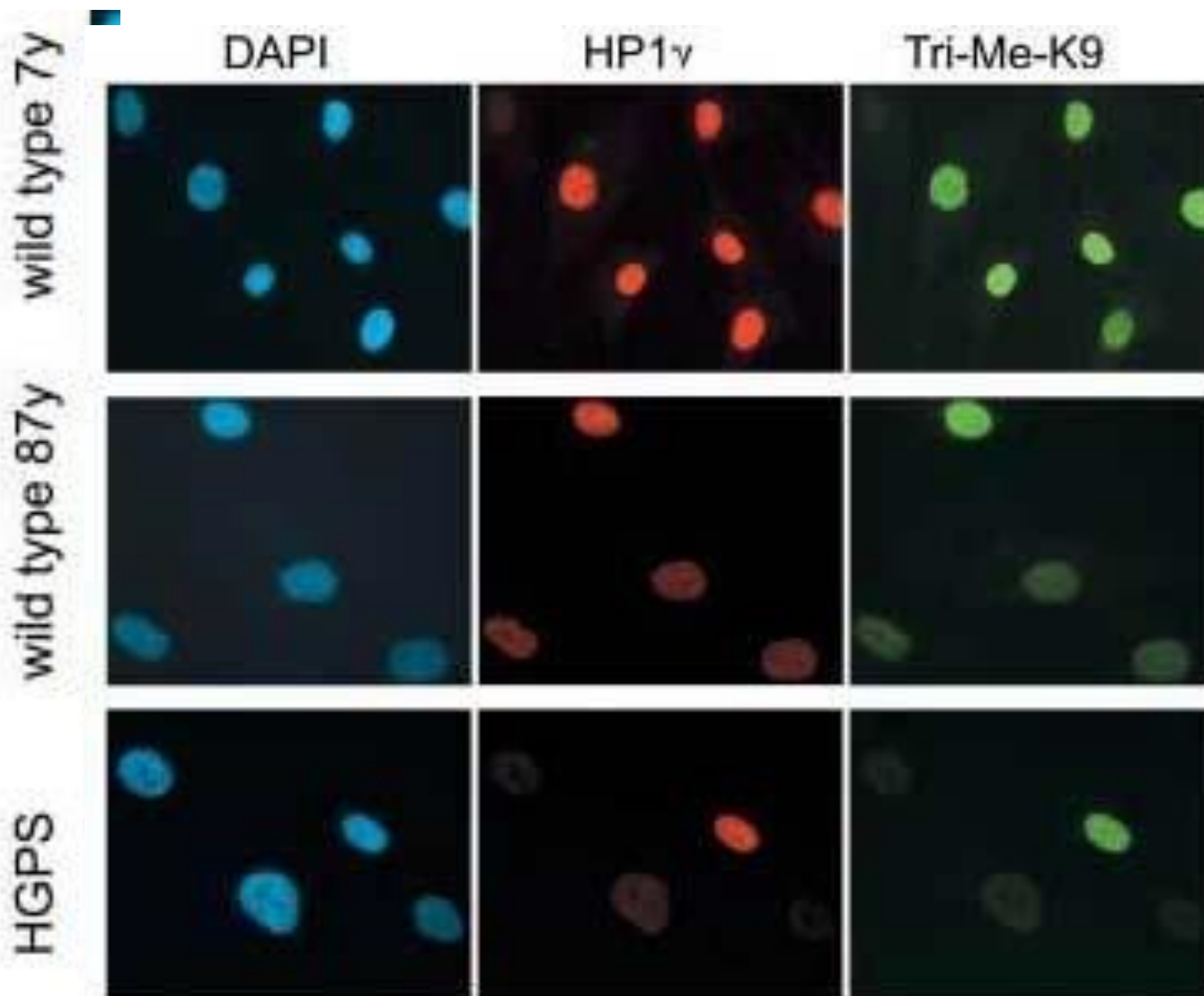
H2AX

DAPI+H2AX

H2AX

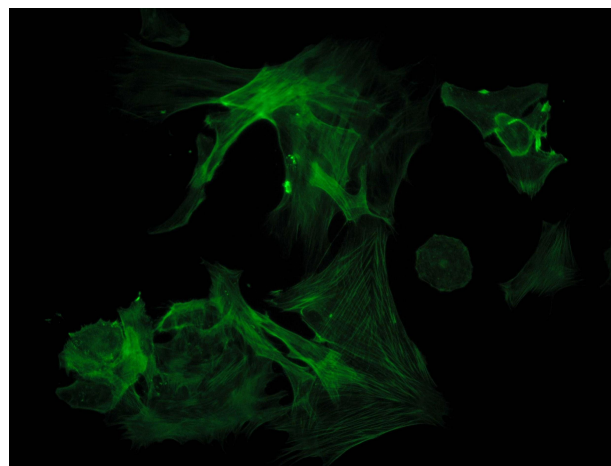
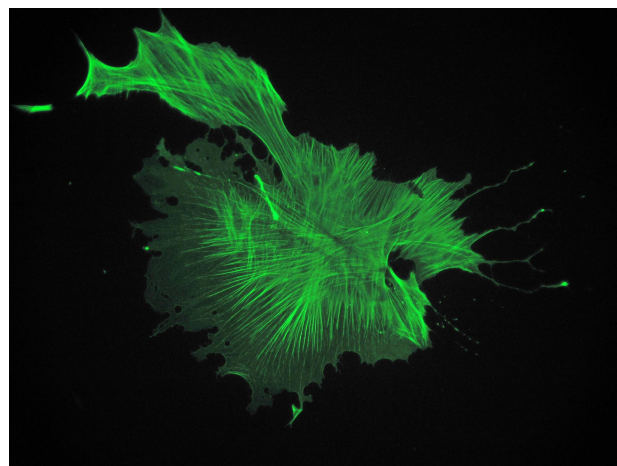
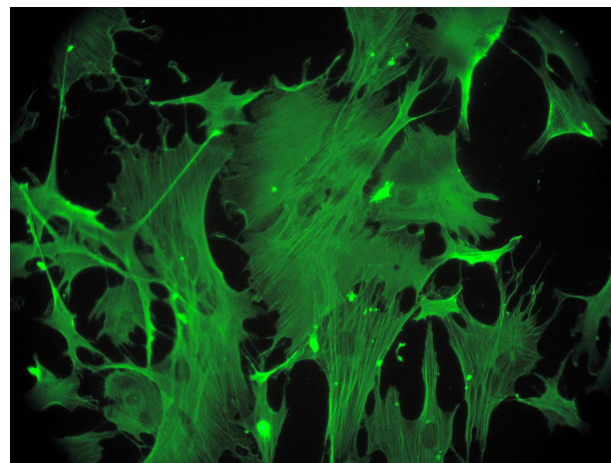
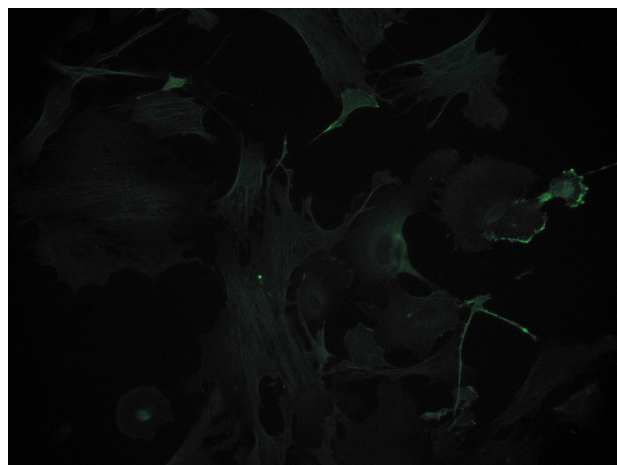


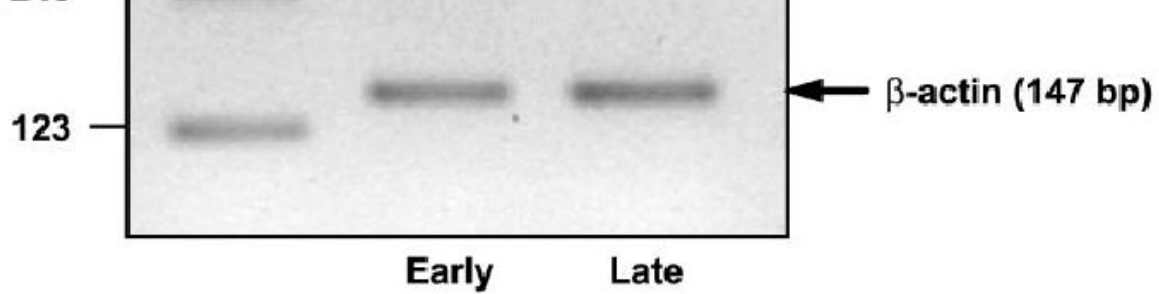
**Scaffidi P., Misteli T. 2006. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. Science. 312:1059-1063**



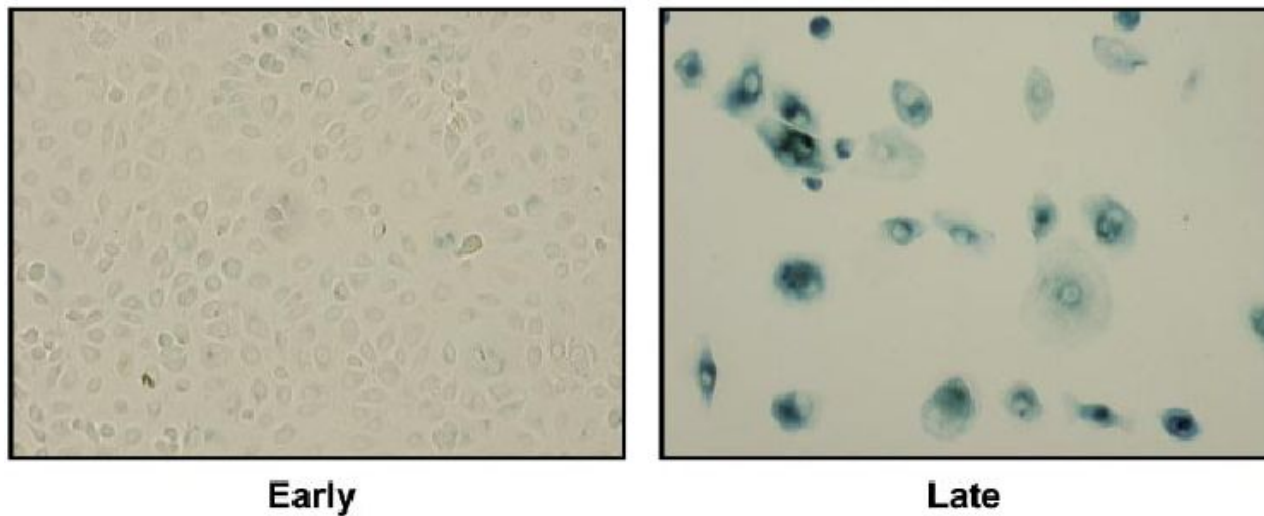


# $\beta$ -актин в первичных фибробластах 12 месячных мышей BALB/c

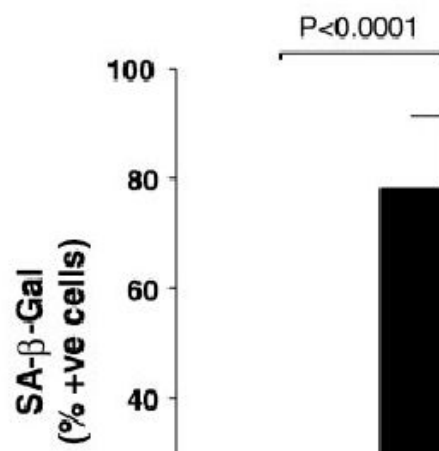




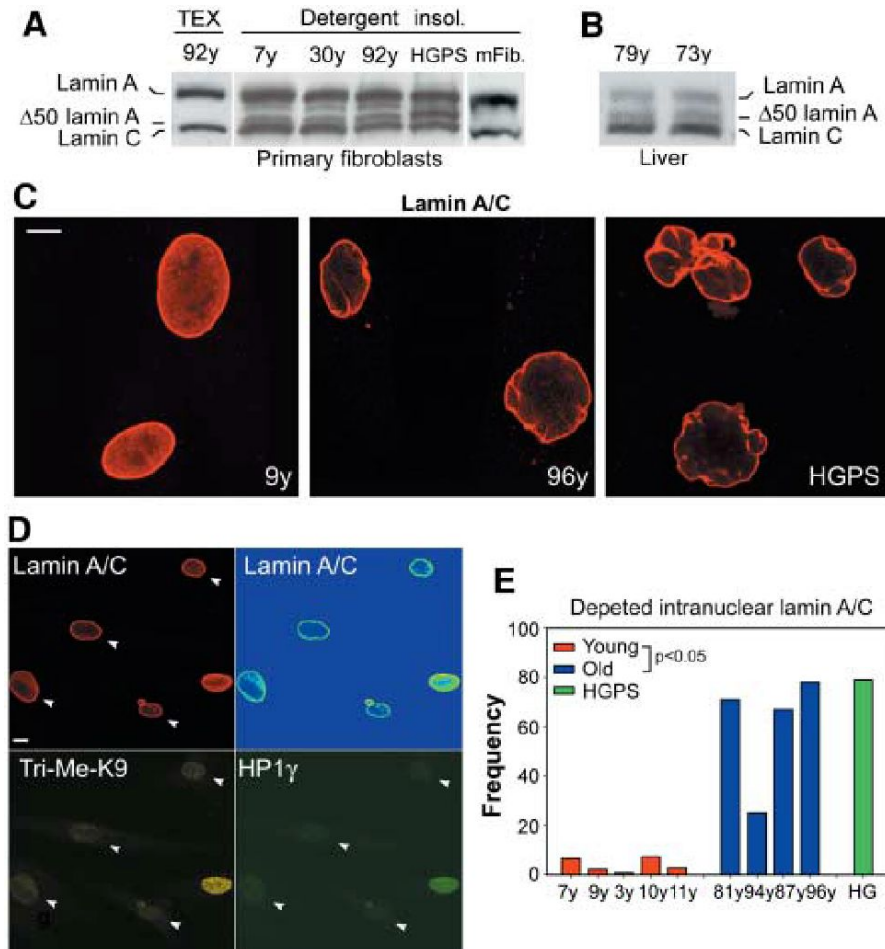
**B**



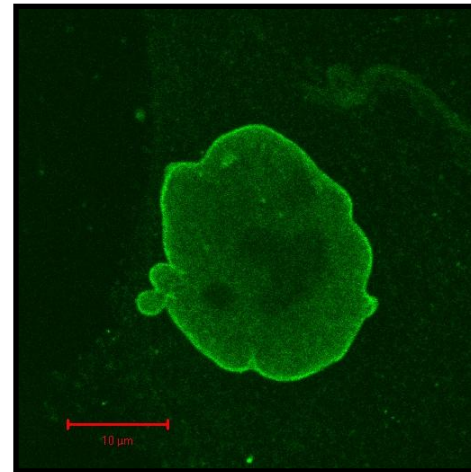
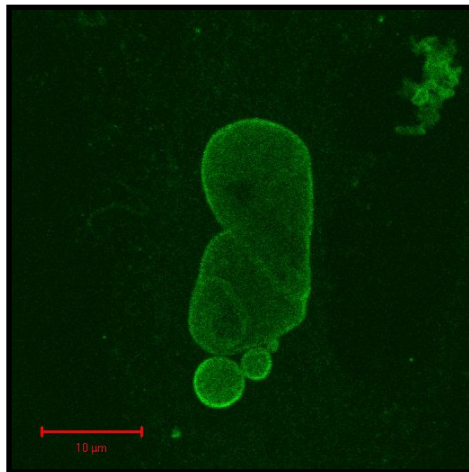
**C**



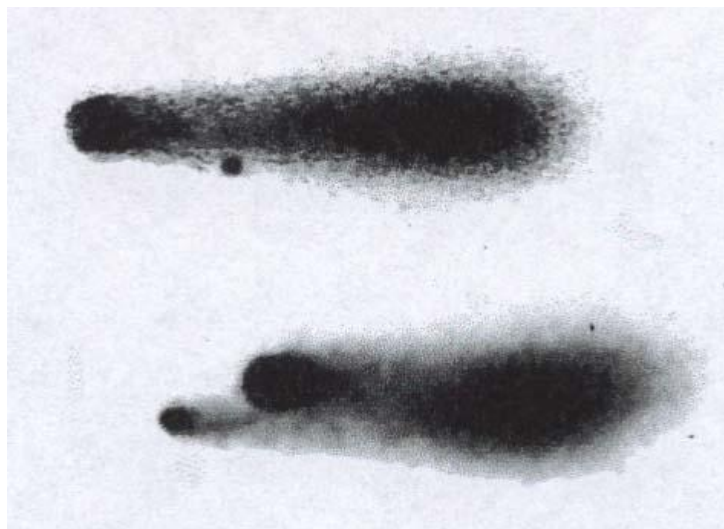
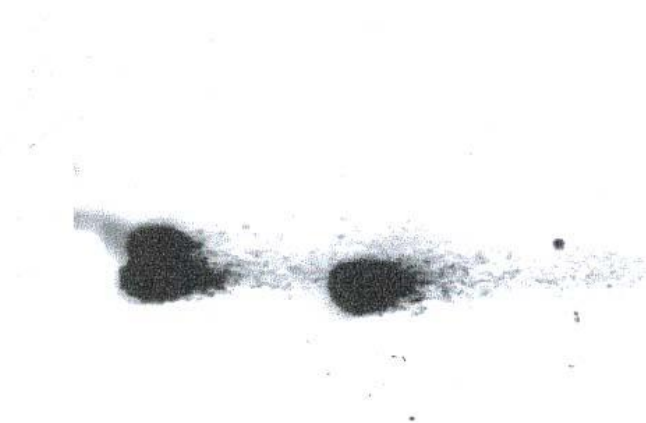
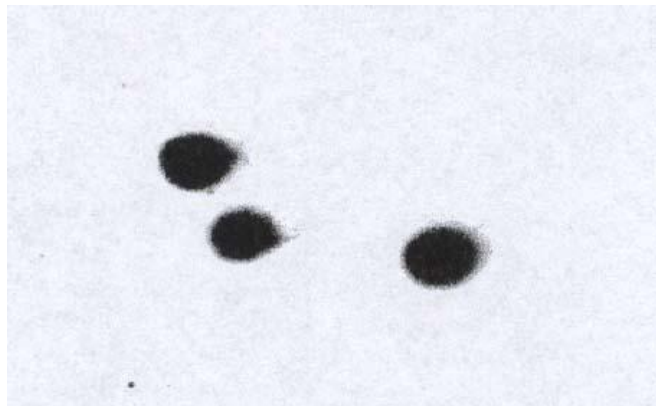
# Lamin A-Dependent Nuclear Defects in Human Aging



# Ядерная оболочка, окраска антителами к ламину A/C



# Метод «КОМЕТ»



# Необходимая посуда

- а) флаконы Карреля
- б) чашки Петри
- в) планшеты (на 4, 6, 24, 96 лунок)
- г) пипетки (Пастера и обычные, «шарики»)
- д) бутылки для сред и растворов
- е) маленькие флакончики (как для антибиотиков)





# Оборудование для бокса

- а) ламинар (biological safety cabinets)
- б) источник огня (спиртовка, газовая горелка, fire boy)
- в) приспособления для пипетирования (груши, pipette boy)
- г) дозаторы
- д) водоструйный или
- электрический насос
- е) CO<sub>2</sub>-инкубатор



# Бокс биобезопасности 2 класса для работы с клеточными линиями





# Пипетки и дозаторы (Softaide)

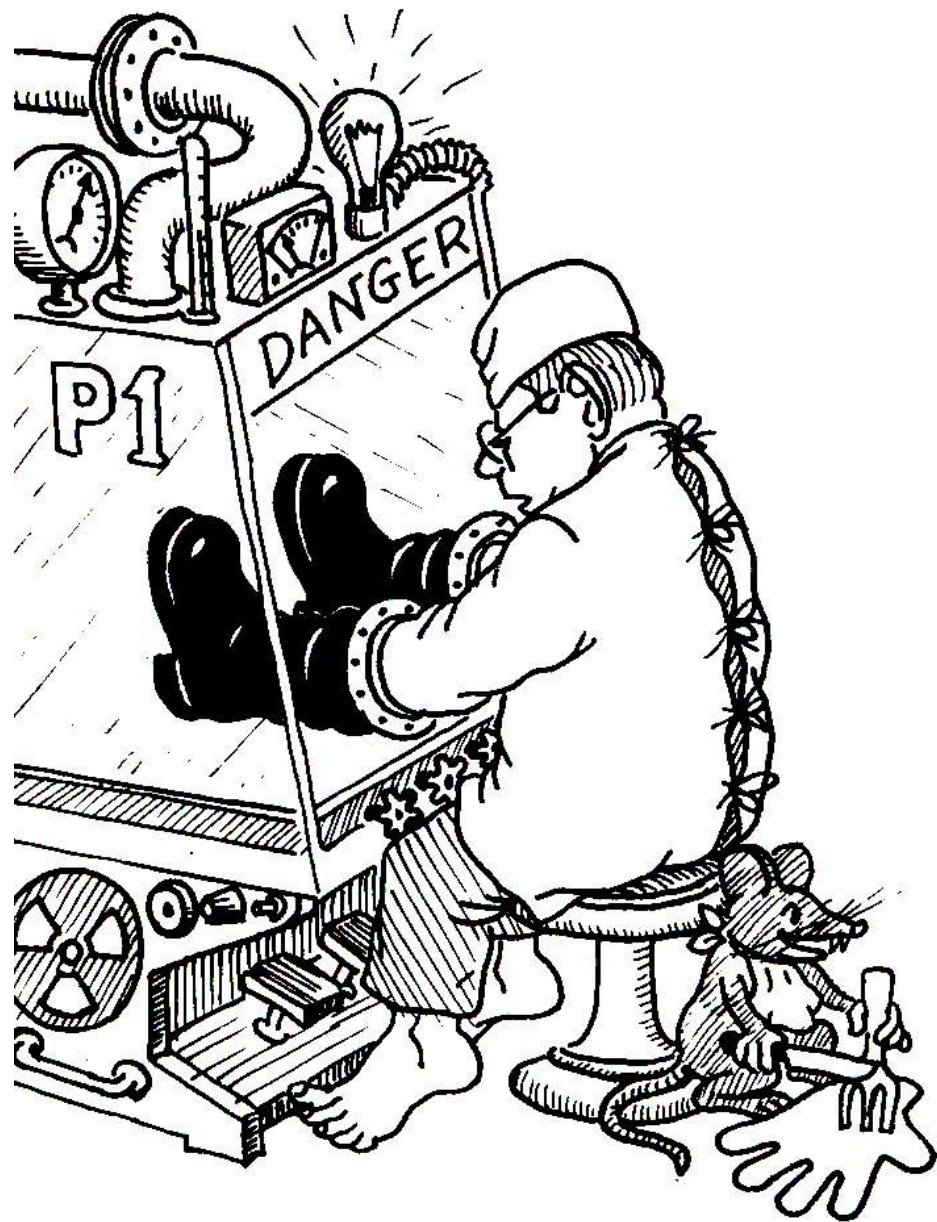


# Дозаторы

(Дозирующее устройство Финпипет С1 (Термо Фишер Сайентифик))

- легкое дозирование благодаря мощному насосу;
- 8 скоростей аспирации и дозирования, что позволяет быстро заполнять пипетки большого объема и не испытывать проблем с пипетками малых объемов;
- литий-ионный аккумулятор обеспечивает непрерывную работу до 15 час;
- быстрая зарядка - 3 часа,
- легкий вес - 220г;
- автоклавируемый силиконовый адаптер;
- защитный фильтр из тефлона (PTFE), позволяющий предотвратить заброс жидкости;
- большой цифровой дисплей с подсветкой.





# Приготовление сверхчистой и общелабораторной воды

- а) дистилляция и бидистилляция
- б) новые многоступенчатые системы очистки:
- обратный осмос
- фильтры из активированного угля
- колонки с ионообменными смолами
- мембранные фильтры
- УФ-облучение



# Мытье и стерилизация посуды

- а) предварительная стерилизация (автоклавирование)
- б) предварительное замачивание (5% хлорамин, 5% гипохлорит натрия, 3% перекись водорода)
- в) полоскание после замачивания
- г) мойка и полоскание
- д) сушка
- е) упаковка
- ё) финальная стерилизация

# Создание питательных сред

- Eagle H. The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Stain HeLa) in tissue culture. *J Exp Med.* 1955;102:37-48.
- Eagle H, Oyama VI, Levy M. Amino acid requirements of normal and malignant human cells in tissue culture. *Arch Biochem Biophys.* 1957;67:432-46.
- Ham RG. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, syntetic medium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1965;53:288-93.
- Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB 3rd, et al. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1976;36:4562-9.
- Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol.* 1983;81(1 Suppl):33s-40s. 21.
- Тартаковский А.Д. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих. 44-62

# Поддержание pH и осмотического давления

- Осмотическое давление раствора определяется числом молей осмотически активных частиц (ионов и неионизированных молекул) растворенных веществ на 1 кг растворителя (осмоляльность) или на 1 л раствора (осмолярность). В питательных средах эти величины близки (т.к. это разбавленные водные растворы).
- Общую осмоляльность раствора можно (осмоль\кг) вычислить
- $$\sum_{i=1}^n m_i x_i$$
- по формуле  $\sum_{i=1}^n m_i x_i$  - где  $m_i$  – концентрация i-того
- растворенного вещества (моль\кг), а  $x_i$  - количество частиц, на которое диссоциирует его молекула,  $n$  – количество веществ.
- Причем теоретически вычисленная величина может быть несколько выше реальной

- Пределы рН и осмоляльности при которых происходит нормальное размножение клеток достаточно узки и несколько варьируют в зависимости от типа клеток.
- Для диплоидных фибробластов человека оптимальная рН  $7.30 \pm 0.15$ , а осмоляльность  $285 \pm 40$  мосмоль\кг.
- Для фибробластов куриного эмбриона –  $7.12 \pm 0.18$  и  $300 \pm 20$ .
- Для некоторых линий грызунов (эпителий предстательной железы мыши) оптимальная осмоляльность –  $350$  мосмоль\кг.
- Оптимум рН для нетрансформированных клеток сдвинут в щелочную область по сравнению с перевиваемыми клеточными линиями.



# Буферные растворы для сред

- Среда Эрла
- Среда Хэнкса
- Фосфатно-солевой буфер Дульбекко



# Буферные растворы для сред

Компонент г/л	Эрла	Хенкса	Дульбекко
<b>NaCl</b>	<b>6.80</b>	<b>8.00</b>	<b>8.00</b>
<b>KCl</b>	<b>0.40</b>	<b>0.40</b>	<b>0.20</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>0.20</b>	<b>0.14</b>	<b>0.10</b>
<b>MgSO<sub>4</sub> - 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.20</b>	<b>0.20</b>	-
<b>MgCl<sub>2</sub> – 6H<sub>2</sub>O</b>	-	-	<b>0.10</b>
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.14</b>	-	-
<b>NaHPO<sub>4</sub> -12H<sub>2</sub>O</b>	-	<b>0.12</b>	<b>2.90</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	-	<b>0.06</b>	<b>0.20</b>
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<b>2.20</b>	<b>0.35</b>	-
<b>Глюкоза</b>	<b>1.00</b>	<b>1.00</b>	-
<b>Феноловый красный</b>	-	<b>0.02</b>	-

- pH в большинстве сред поддерживает (как и в крови) бикарбонатный буфер.
- $\text{HCO}_3^- = \text{CO}_2 + \text{OH}^-$
- Меньшее количество бикарбоната используется при культивировании в плотно закрытых флаконах, большее требует повышенного парциального давления  $\text{CO}_2$  в атмосфере.
- Можно поддерживать pH, повышая концентрацию аминокислот (среда Лейбовича), или добавляя синтетические органические вещества – HEPES –(4-(2-окси-этил)-пиперазинэтансульфоновая кислота), который легко растворяется, не связывает двухвалентные катионы и не проявляет цитотоксичности до концентрации 0.05M (обычно используется 0.01-0.03 M). **НО!!!** Добавляя HEPES нужно помнить, что он повышает осмоляльность (0.05 M – на 75 мосмоль\кг).

# Состав сред

- 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. **Заменимые аминокислоты** также иногда добавляются в культуральную среду.
- Углеводороды
- Большинство сред включают в себя **глюкозу** и **галактозу** как источник энергии для клеток.

# Сыворотка

- 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.

# Состав сред

- 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.

# Среды для культивирования

- Среда Игла (BME, basal medium, Eagle)
- MEM (minimal essential medium) + инозит, - биотин, увеличено количество аминокислот, с Са или без
- Среда Дульбекко (DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium)
- Среда Искова (IMDM, Iscove's modified Dulbecco's medium) возможно применение для бессывороточного культивирования, содержит ростовые факторы
- Серия сред RPMI (Roswell Park memorial Institute) 1629 (среда Мак-Коя 5А, самая богатая), 1640 (самая простая, снижено содержание магния и кальция) – для культивирования лимфоцитов в присутствии сыворотки
- Среда Лейбовича (L-15, Leibovitz) – стабильный pH благодаря увеличению содержания аминокислот до предельно нетоксичного
- Среды Хэма (F-10, F-12) – для плохо растущих клеток
- Среда 199 – несет широкий спектр питательных веществ в низкой концентрации

- **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  $\alpha$ -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, эпидермиальный 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.
- **Среда IMDM** (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium) - это модификация среды DMEM, содержащая селенит натрия, добавочные аминокислоты и витамины, пируват натрия, ХЕПЕС и нитрат калия вместо нитрата железа. Среда IMDM используется для поддержания культуры клеток В лимфоцитов, В клеток, стимулированных полисахаридами, Т лимфоцитов и гибридом.

- **Среда 199** первоначально была разработана для поддержания культуры первичных эксплантов. В настоящее время среда 199 применяется для продукции вакцин, культивирования первичных эксплантов и тканей хрусталика. Изначально среда 199 готовилась с солями Эрла, но есть модификация среды 199 с солями Хэнкса.
- **Среды F-12 и F-10** изначально были разработаны Хэмом (Ham's nutrient mixture) для культивирования СНО клеток, HeLa и мышинных L-клеток. Обе среды были разработаны для бессывороточного культивирования.  
**Среда F-12** применяется для культивирования широкого спектра клеток млекопитающих и гибридом.
- **Среда Грейса** (Grace's Insect Media) применяется для поддержания клеточных линий, полученных от бабочек и некоторых двукрылых.
- **Среда Шнейдера** (Schneider's Insect Media) изначально разрабатывалась для дрозофилы, но может применяться и для поддержания клеточной культуры других двукрылых.

# Создание бессывороточных сред

- Iscove NN, Guilbert LJ, Weyman C. Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol. *Exp Cell Res.* 1980;126:121-6.
- Iscove NN, Melchers F. Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J Exp Med.* 1978;147:923-33.

# Стимуляторы клеточной пролиферации в бессывороточных условиях

<b>Группа веществ</b>	<b>Наименование</b>	<b>Эффективная концентрация</b>
<b>Гормоны</b>	<b>Инсулин</b>	<b>0.1-10 мкг/мл</b>
	<b>Глюкагон</b>	<b>0.05-5 мкг/мл</b>
	<b>Гормон роста</b>	<b>0.05-0.5мкг/мл</b>
	<b>Соматомедин С</b>	<b>0.05-0.5мкг/мл</b>
	<b>Паратирин</b>	<b>1-100 нг/мл</b>
	<b>Тиреолиберин</b>	<b>1-10 нг/мл</b>
	<b>Люлиберин</b>	<b>1-10 нг/мл</b>
	<b>Трийодтиронин</b>	<b>(1-100)х10<sup>-12</sup> М</b>
	<b>Гидрокортизон</b>	<b>(10-100)х10<sup>-9</sup>М</b>
	<b>Прогестерон</b>	<b>(1-100)х10<sup>-9</sup>М</b>
	<b>Тестостерон</b>	<b>(1-10)х10<sup>-9</sup>М</b>
	<b>Эстрадиол</b>	<b>(1-10)х10<sup>-9</sup>М</b>

## Стимуляторы клеточной пролиферации в бессывороточных условиях

Группа веществ	Наименование	Эффективная концентрация
Факторы роста	ЭРФ	1-100 нг/мл
	ФРФ	1-10 нг/мл
	НРФ	1-10 нг/мл
Простогландины	F <sub>2a</sub>	1-100 нг/мл
	E <sub>1</sub>	1-100 нг/мл
Транспортные белки	Трансферрин	0.5-100 мкг/мл
	Альбумин	0.5-2 мг/мл
Факторы прикрепления (адгезии)	Фибронектин	0.5-5 мкг/мл
	Сывороточный фактор	0.5-5 мкг/мл
	распластывания	
	Фетуин	1 мг/мл

# Криопротекторы

- Сахароза
- Декстран
- Этиленгликоль
- Поливинилпирролидон (ПВП)
- Диметилсульфоксид (ДМСО)
- Полиэтиленоксиды (ПЭО)
- Глицерин

# Опять А.Каррелль

- В своей наиболее популярной книге «Человек. Неизвестное» ("Man, the Unknown", 1935) Каррелль представил грандиозный план, который, по его мнению, сохранит человечество и улучшит качество человеческой популяции. Он предложил создать «Высокий совет», который будет управлять миром во благо его процветания; решения этого органа будут носить рекомендательный характер для политических лидеров, которые будут обращаться за советами в «интеллектуальный центр» мирового правительства
- Согласно мнению Каррелля такая организация «будет обладать достаточным знанием, чтобы предотвратить физическое и умственное вырождение цивилизованных наций».







- Информация для заказа
- НаименованиеОбъемПроизводствоМетодКат.НомерROUND FILTER SET  
SOFTAIDE Hamilton 51248-34 SAFETY  
CHECK VALVE  
SOFTAIDE Hamilton 51248-34 SAFETY  
CHECK VALVE  
SOFTAIDE Hamilton 51248-32  
SOFTAIDE 230V EURO  
PLUG Hamilton 51248-34 SAFETY  
CHECK VALVE  
SOFTAIDE Hamilton 51248-32  
SOFTAIDE 230V EURO  
PLUG Hamilton 51248-34 SOFTAIDE