

**Національний університет «Києво-Могилянська академія»**

**Методичні рекомендації  
до магістерського курсу**

**«Молекулярно-клітинні основи самовідновних систем»**

**проф. Білько Н. М. д.м.н.**

**Київ-2007**

## **ЗМІСТ**

Особливості метаболізму клітин у культурі	3
Роль амінокислот у культивуванні клітин	3
Вітаміни та гормони, необхідні у культурі	7
Джерела енергії для культивованих клітин	8
<b>УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН</b>	<b>9</b>
Живильні середовища	9
Сироватка крові тварин	12
Буферні системи	14
Фактори росту	15
термінологія культури тканин тварин та людини	19
Список літератури	23

## Особливості метаболізму клітин у культурі

Ізольовані від внутрішнього середовища організму клітини тварин зберігають основні вимоги до створюваного штучного середовища.

Фундаментальні дослідження з визначення метаболічних потреб у культурі було проведено Морганом, Мортонем і Паркером.

## Роль амінокислот у культивуванні клітин

Спеціальними дослідженнями Ігла та співробітників було встановлено, що для росту та розвитку клітин хребетних поза організмом потрібні 8 незамінних амінокислот – ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан, валін; ізольованій клітині окрім цих амінокислот потрібні ще аргінін, глутамін, гістидин, тирозин та цистеїн.

Амінокислоти, що входять до складу живильних середовищ, здатні виконувати ряд функцій у процесі культивування. Це включення у синтез білка, перетворення в інші амінокислоти, якщо цих амінокислот немає чи вони присутні в недостатній кількості, джерело енергії, якщо кількість глюкози падає нижче за критичний рівень, вихідний матеріал для побудови інших структур, відмінних від білків, наприклад, нуклеїнових кислот, та цілий ряд інших перетворень.

Виконання амінокислотою тієї чи іншої функції багато в чому залежить від умов культивування. Однією з причин необхідності в середовищі 5 амінокислот, не потрібних для цілого організму, є обмежений їх синтез у культурі. Дослідженнями Ігла та співробітників встановлено, що швидкість синтезу в культурі суттєво залежить від щільності популяції клітин.

Критична щільність популяції клітин, при якій зникають метаболічні потреби, не однакова для різних амінокислот. Деякі клітини за умов високої щільності посіву – більше  $2 \times 10^5$  клітин/мл здатні синтезувати цистеїн із метіоніном, а також глюкозу.

Потреба в гліцині клітин первинної культури нирок мавп відсутня при високій щільності посіву і з'являється при її пониженні. Це пояснюється частковим блокуванням синтезу гліцину із серину в результаті низької швидкості синтезу метаболічно активної відновленої форми фолієвої кислоти, яка каталізує процес перетворення серину в гліцин; з додаванням у середовище фолієвої кислоти потреба в гліцині компенсується.

Деякі перещеплювані лінії клітин (фібробласти серця курячого ембріона, клон клітин HeLa) потребують тирозин при низькій концентрації цієї амінокислоти в середовищі. При високій концентрації цієї амінокислоти в середовищі клітини здатні синтезувати її із фенілаланіну. Для більшості клітин тирозин незамінний при їх рості та розмноженні; ніякі інші сполуки, близькі за структурою до

тирозину, не здатні замінити його. Клітини гинуть при вилученні цієї амінокислоти зі складу живильного середовища.

Глутамін також виконує ряд функцій у клітинному обміні. Вуглецевий скелет глутаміну слугує попередником глутамінової, аспарагінової кислот, аспарагіну, проліну і, меншою мірою, серину та аланіну.

Багато клітин ссавців здатні синтезувати глутамін із глутамінової кислоти в достатній кількості для росту і розвитку при високій концентрації клітин у культурі і при достатній кількості в них глутамінсинтетази.

У присутності достатньої кількості глутаміну, який здатний замінювати глюкозу як джерело енергії, зниження концентрації останньої навіть у 10 разів не впливає на темп проліферації клітин.

Глутамін може включатися безпосередньо в клітинний білок, задіяний також і в біосинтезі нуклеїнових кислот. Приблизно 40 % піримідинового вуглецю утворюється із глутаміну (ймовірно, через аспарагінову кислоту), а також половина азоту пуринових і піримідинових основ утворюється із амінного азоту глутаміну. При заміні 90 % глутаміну на глутамінову кислоту зростає потреба в інших незамінних амінокислотах.

Глутамін може слугувати доступним джерелом енергії для багатьох синтетичних процесів, які проходять в ізольованій клітині. Існують різні варіанти використання L-глутаміну. Епітеліальні клітини пупкової вени людини ростуть у середовищі, дефіцитному на глутамін. Найчастіше у культуральне середовище додають не більше 2 мМ L-глутаміну, збільшення його кількості призводить до погіршення якості середовища у процесі зберігання. Концентрація глутаміну в живильних середовищах коливається від 0,68 до 10 мМ.

Клітини ВНК-21 у середовищі Ігла з діалізованою сироваткою зупиняються в рості через відсутність серину, хоча, з іншого боку, його відсутність мало відображається на синтезі в них ДНК при застосуванні безсироваткового живильного середовища.

Особливо важливу роль для життєдіяльності клітин відіграють основні амінокислоти – лізин, гістидин, аргінін.

Багате за кількістю компонентів середовище 199 виявляється недостатнім для росту культур за концентраційними показниками. Для багатьох первинних культур це середовище дефіцитне за попередниками тимідину (фолієвої кислоти) і його додавання стимулює проліферацію.

Незамінність окремих компонентів для розвитку клітинних культур не можна розглядати як абсолютний факт, оскільки потреба в певних речовинах може виникнути у зв'язку з відсутністю якихось інтермедіатів чи через низьку щільність популяції; так, дефіцит у середовищі фолієвої кислоти робить незамінним гліцин, а відсутність піридоксалу, який має велике значення в біосинтезі замінних

амінокислот (аланін, серин, гліцин, пролін), викликає необхідність внесення в живильне середовище для підтримання росту клітин амінокислот, які вважаються замінними. Такі незамінні фактори як цистеїн, глютамін, інозитол при високій концентрації клітин стають замінними і можуть синтезуватися клітинами.

У процесі культивування клітин відбуваються не тільки утилізація живильних речовин, що приводить до виснаження середовища, але і вихід в живильне середовище продуктів обміну. У результаті відбувається доповнення складу середовища продуктами метаболізму клітин, зокрема, деякими амінокислотами.

Клітини, які утилізують амінокислоти середовища, створюють свій внутрішньоклітинний фонд вільних амінокислот; у культурах клітин вміст вільних амінокислот знаходиться в динамічній рівновазі з оточуючим середовищем, яка встановлюється через 10-15 хв. після внесення клітин у середовище. При цьому 70 % амінокислот від їх максимального значення проникають у клітину і знову виділяються в середовище. При оптимальній концентрації (0,1 мМ) амінокислот у середовищі їх концентрація у клітинах у 5-10 разів вища, ніж у навколишньому середовищі. У клітинах ВНК-21/13 спостерігається 3-10-разове збільшення концентрації вільних амінокислот порівняно із середовищем культивування. При вивченні амінокислотного обміну клітин НЕР-2, вирощених у середовищі 199 і модифікованому середовищі, яке не містить замінних амінокислот, встановлено, що концентрація замінних амінокислот у клітинах, які виростили на повноцінному середовищі, у 10-20 разів вища, ніж в оточуючому середовищі. Клітини, які виростили на модифікованому середовищі, набули здатності ще сильніше концентрувати амінокислоти, особливо замінні, їх кількість у 2-5 разів перевищує кількість замінних амінокислот в клітинах, які виростили на повноцінному середовищі. Глютамін слабо концентрується клітинами, тоді як замінні амінокислоти, які синтезуються клітинами із глюкози і глютаміну, дуже інтенсивно накопичуються клітинами. Їх вміст у клітинах у 20-50 разів перевищує вміст у середовищі. Ступінь концентрації значною мірою залежить від типу амінокислоти, концентрації її в середовищі і характеру росту клітин. Найбільш інтенсивно використовуються із середовища клітинами ссавців такі амінокислоти як глютамін, лейцин, ізолейцин, цистеїн, аргінін. При вивченні складу амінокислотного фонду у фібробластах миші, які виростили на середовищі 199, відзначено, що незамінні амінокислоти лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін активно беруть участь у процесі метаболізму, приблизно 80 % цих амінокислот концентрується клітинами.

Синтез білка і розмноження клітин у культурі може відбуватися в тому випадку, якщо концентрація незамінних амінокислот у клітинах не нижча за 0,01-0,04 мМ. Якщо концентрація цих амінокислот падає нижче вказаного рівня, то, незважаючи на наявність резервів у живильному середовищі, утворення білків і ріст клітин зупиняється. Загальна концентрація всіх вільних амінокислот повинна досягати 0,1-0,2 мМ. Вищий їх вміст не прискорює синтез білка.

Поки що не відомо, яким чином внутрішньоклітинний запас амінокислот впливає на білковий синтез і ріст клітин. Вміст білка в клітинах залежить від їх типу, щільності популяцій і складу живильного середовища.

## ^ Вітаміни та гормони, необхідні у культурі

Для нормального росту *in vitro* важливим компонентом живильного середовища є вітаміни. Більшість із них належать до групи В: нікотинамід, тіамін, пантотенат, піридоксаль, рибофлавін, фолієва кислота, нікотинова кислота, холін, інозитол, біотин. Всі ці вітаміни є активними групами ферментів, які беруть участь в обмінних процесах клітини. Виключення вітамінів зі складу живильного середовища негативно впливає на проліферацію клітин. Синтез ДНК і поділ клітин залежать від вмісту в живильному середовищі біотину і вітаміну В<sub>12</sub>.

Нестачу вітамінів у середовищі можна компенсувати введенням сироватки крові чи ембріональних екстрактів.

Клітини ростуть значно краще, якщо вітаміни присутні у вигляді коензимів АДФ, АТФ, коензиму А.

Для підтримання спеціальних функцій клітин до складу живильних середових включають жиророзчинні вітаміни А, D, E, K.

Значення гормонів для клітинних культур ще мало вивчено. Хоча клітини добре ростуть за їх відсутності, існують дані про те, що гормони здійснюють значний вплив на проліферацію клітин. Передбачають, що для підтримки росту необхідні гормони, зв'язані з білками сироватки.

## ^ Джерела енергії для культивованих клітин

В якості джерела енергії в живильних середовищах найчастіше використовують D-глюкозу. Клітини використовують вуглеводи для синтезу деяких замінних амінокислот: аланін, серин, аспарагінова та глутамінова кислоти, а також для синтезу жирних і нуклеїнових кислот. Мортон і Морган крім глюкози в перелік активних цукрів включили ще і галактозу, фруктозу, β-глюкозу, глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат.

Беручи до уваги, що глюкоза є попередником молочної кислоти, яка закислює живильне середовище, для її заміни використовують галактозу. D-глюкозу можуть замінити дицукри – мальтоза, фруктоза, але не сахароза, пентози та інші інтермедіати циклу трикарбонових кислот. На ріст клітин *in vitro* позитивно впливають також складні цукри – крохмаль і глікоген.

Вилучення глюкози із культурального середовища приводить до прогресивних змін епітеліальних клітин серця щура. Крім того, концентрація глюкози здійснює великий вплив на вміст вітаміну С, глікопротеїновий та інсуліновий метаболізм епітеліальних клітин серця ембріонів корови. 2 г/л глюкози в культуральному середовищі викликає 5-разове зниження засвоєння аскорбінової кислоти епітеліальними клітинами.

Підвищення концентрації глюкози, так само, як і її дефіцит, викликає збільшення її споживання клітинами, що ростуть, і утворення молочної та піровиноградної кислот, токсичних для клітин, при цьому спостерігається зернистість клітин і менший їх приріст.

Проникнення гексоз у клітину залежить від їх здатності вступати в гексокіназну реакцію, яка виявилася найвищою у глюкози і найнижчою у галактози. Клітини з різною інтенсивністю утилізують гексози залежно від їх здатності проникати через клітинну мембрану.

## ^ УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН

Незважаючи на загальні закономірності, встановлені у розвитку і розмноженні клітин поза організмом, слід відзначити, що кожна окрема культура проявляє свої специфічні особливості метаболізму.

### ^ Живильні середовища

Культуральні середовища призначені для підтримки оптимального режиму життєдіяльності ізольованих клітин, фрагментів тканин і органів у штучно створених системах.

Живильні середовища для отримання культур клітин можуть бути ростовими і підтримуючими. Ростові середовища або середовища росту містять поряд з іншими компонентами від 5 до 15 % сироватки крові тварин і сприяють швидкому росту. Для виживання клітин використовують підтримуюче середовище, що містить до 2 % крові тварин.

Середовища, що використовуються для культивування, ділять: 1) за способом приготування – на натуральні (плазма, сироватки, екстракти та ін.) і штучні чи синтетичні (199, Ігла, RPMI-1640 та ін.); 2) за призначенням – препаративні для виділення, промивання клітин тощо; підтримуючі для забезпечення нормальної життєдіяльності непрولیферуючих соматичних клітин; ростові, що містять фактори проліферації і диференціювання клітин, спеціальні середовища для специфічних методів дослідження; 3) за консистенцією – рідкі (199, Ігла та ін.), в'язкі (метилцелюлоза), напівтверді (агар, агароза, колаген, плазма та ін), тверді (колагеновий матрикс, агар і т.д.); 4) за вмістом сироватки – сироваткові і безсироваткові; 5) за формою виготовлення – сухі, рідкі, концентровані.

### ^ Синтетичні живильні середовища

**Середовище Мак-Коя-5 (RPMI-1629)** у модифікації Іваката і Грейса. Містить бактопептон, глюкозу, глутатіон. Застосовують для клонування гранулоцитомакрофагальних прекурсорів, макрофагів, лімфоїдних і фібробластоїдних пухлинних елементів людини і тварин при додаванні сироватки та ряду інших інгредієнтів. Випускають у вигляді 1<sup>x</sup> розчину (з дикарбонатом натрію без L-глутаміну) і в сухому порошку (з L-глутаміном, без дикарбонату натрію).

Зберігають при 4 °С. Клітини культивують при концентрації CO<sub>2</sub> 5-7 %.

^ **Середовище RPMI-1640.** Модифіковане середовище Мак-Коя-5А. Використовують переважно для моношарового чи суспензійного культивування лімфоїдних, гібридомних, лейкомічних клітин з додаванням 5-10 % сироватки. Містить мінімальну кількість солей Mg<sup>++</sup> і Ca<sup>++</sup>. Приготоване на гепес буфері середовище використовують за звичайної концентрації вуглекислого газу. Випускають у вигляді 1<sup>x</sup> (з дикарбонатом натрію чи з гепесом без L-глутаміну), 10<sup>x</sup> (з дикарбонатом натрію без L-глутаміну) розчину чи в порошку (з L-глутаміном, без дикарбонату натрію). Зберігають при 4 °С.

^ **Середовище α-MEM.** Одне за найбільш універсальних середовищ, застосовуваних у гематологічних дослідженнях. У повному обсязі містить рибо- і дезоксирибонуклеозиди. З додаванням БСА чи сироватки застосовують для клонування всіх відомих типів гемопоетичних прекурсорів; у довготривалих культурах кісткового мозку; при вирощуванні багатьох типів лімфоїдних, мієлоїдних, еритроїдних, фібробластоїдних, пухлинних та інших клітин людини, лабораторних тварин та птахів. Без нуклеозидів використовують як препаративне чи підтримуюче середовище. Випускають у вигляді 1<sup>x</sup> розчину без рибонуклеозидів і дезоксирибонуклеозидів (які постачають окремо), з указаними вище речовинами із L-глутаміном у сухому середовищі. Зберігають при 4 °С. Клітини культивують у середовищі при вмісті вуглекислого газу 5-7,5 %.

^ **Середовище MEM у модифікації Дульбекко (Д-MEM).** Порівняно з оригінальним прописом середовища MEM концентрація амінокислот і вітамінів підвищена у 4 рази. Без сироватки, альбуміну і гідролізатів використовують як підтримуюче середовище для багатьох типів стромальних чи перещеплюваних ліній клітин. При додаванні вказаних інгредієнтів застосовується як ростове і спеціальне середовище для швидкоростучих мієлоїдних, лімфоїдних, фібробластоїдних, лейкоїдних, ембріональних та інших клітин лабораторних тварин. При внесенні у середовище аміноптерину, гіпоксантину і трансферину використовують для селекції гібридомних клітин. Випускають у вигляді 1<sup>x</sup> (без L-глутаміну), 10<sup>x</sup> (без L-глутаміну і дикарбонату) розчинів чи в сухому вигляді (з L-глутаміном, з L-глутаміном і гепесом). Зберігають при 4 °С. У модифікаціях середовища змінюється співвідношення глюкози і пірувату. Культивування здійснюють при концентрації вуглекислого газу в атмосфері 5-10 %.

**Середовище 199.** Складне синтетичне середовище, випускають на розчині Хенкса чи Ерла. Застосовують як препаративне, підтримуюче і ростове (з додаванням сироватки) середовище для культивування фібробластів, макрофагів, лімфоцитів, гранулоцитів, пухлинних та інших клітин людини, ряду лабораторних тварин, птахів. У модифікації 199-1, 199-2 адаптовані для вирощування ниркових елементів мавп. Випускають у вигляді 1<sup>x</sup> (з дикарбонатом натрію без L-глутаміну), 10<sup>x</sup> (без L-глутаміну і дикарбонату натрію) розчинів чи в сухому вигляді (з L-глутаміном, без дикарбонату натрію). Зберігають при 4 °С. Клітини культивують при концентрації CO<sub>2</sub> 5-7 %.



## **^ Безсироваткові живильні середовища (БПС)**

БПС умовно поділяють на 4 види. Перший тип – середовища відомого хімічного складу. Компонентний профіль яких передається майже повному лабораторному аналізу. Другий – це середовища, до складу яких входять нативні або частково очищені білкові продукти і синтетичні полімери. До третього відносять середовища, які містять зменшену кількість сироватки. Четвертий – кондиційовані живильні середовища з продуктами метаболізму гомологічних або гетерологічних клітин.

Ідеальне безсироваткове середовище повинно мати певний хімічний склад, піддаватися автоклавуванню, підтримувати ріст багатьох клітин, клітини не повинні змінювати своїх властивостей.

У якості заміників сироватки крові використовували кортикостероїди, а саме гідрокортизон, що стимулює ріст хрящових клітин і диплоїдних клітин легені людини, підвищує тривалість проліферації клітин WJ-38, однак для такого впливу необхідна невелика кількість сироватки і додаткових факторів росту. Інші стероїдні гормони – естрадіол, андростанолон, диетилстилбестрол у концентрації 10-30 мМ підвищують швидкість поділу клітин GH, також підвищують адгезивні властивості і швидкість росту клітин L<sub>929</sub> у середовищі F-12, доповненому введенням глютаміну, глютамату, глюкози, гіпоксантину, тимідину, NaHCO<sub>3</sub>, гепес-буфера.

## **^ Кондиційовані живильні середовища**

Культуральна рідина, отримана після вирощування клітин певного типу, містить метаболіти, що є факторами росту для гомологічних та гетерологічних клітин. Живильні середовища, доповнені такою рідинною, відомі під назвою кондиціоновані середовища.

Прикладом таких середовищ є середовища з культуральною рідиною після культивування клітин печінки щура.

## **^ Сироватка крові тварин**

Сироватка є необхідним компонентом більшості живильних середовищ для культивування клітинних і органних культур. Сироватка відіграє роль захисного фізіологічного буферу, бере участь у процесах адгезії, розплющування та міграції клітин, є джерелом живильних речовин.

Високомолекулярні фракції сироватки є джерелом захисних речовин, що захищають клітини від пошкоджень ( $\gamma$ - $\beta$ -глобуліни).

Сироватка виконує цілу низку дуже важливих функцій: стимулює засвоєння регуляторних молекул, впливаючи на клітинну мембрану, бере участь у регуляції щільності культури і контактної інгібіції, стимулює внутрішньоклітинний вміст

критично необхідних для клітин живильних компонентів, регулює рівень внутрішньоклітинних циклічних нуклеотидів, чим сприяє фосфорилуванню ядерних білків, активує асоційовані з мембранами системи протеаз, відіграє роль носіїв для низькомолекулярних компонентів.

Одним з вирішальних факторів при культивуванні клітин є вибір, стан і концентрація сироватки, яка додається у культуральне середовище. Для культивування первинних або субкультур клітин різного походження використовують 10-20% фетальну сироватку великої рогатої худоби (FBS), 10-20% сироватки крові людини (PHS) або 20% інактивованої тепло FBS.

Для культивування епітеліїв людини використовують 20% сироватку, для інших клітин – 10%.

pH сироваток: 7,0 (FBS) – 8,0(сироватка новонароджених телят), донорська сироватка людини – 8,1. Осмолярність від 212mOsm (кроляча сироватка) до 339 mOsm (собача сироватка).

Білки сироватки, які забезпечують прикріплення, розплющування і рух, знайдені у сироватці плода корови, свині, кроля, курчати та ін.

Ростостимулююча активність сироватки крові пов'язана з альбуміною або глобуліною фракцією, причому найбільшу активність виявляють гамма-глобуліни. Альбумінові та глобулінові фракції білків сироватки зменшують вільну дифузію низькомолекулярних сполук через мембрани клітин і впливають на утилізацію вуглеводів, амінокислот та ліпідів.

Білки сироватки також здатні стабілізувати і моделювати дію деяких біологічно-активних продуктів, які вони транспортують, а також знижувати токсичність сировини, зв'язуючи важкі метали, комплекси чи пірогени.

Сироватку крові отримують з крові клінічно здорових тварин або їх плодів, отриманих з боєнь, де не спостерігається захворюваність на інфекційні хвороби худоби. Отримання крові і її переробка проводяться у відповідності з регламентом, що поданий у нормативно-технічних документах.

Кров беруть у тварин з яремної вени, стерильним порожнистим ножом з резиновим шлангом в стерильний посуд місткістю 5л, у кожному банку вносять по 3л крові.

При роботі з культурами клітин використовують сироватки, простерилізовані фільтруванням через асбестові пластини "СФ" або ЕКС-2 або мембранні фільтри, або стерилізація прискореними електронами, гамма-бета-променями.

Необхідним параметром при контролі якості сироватки є перевірка її біологічних властивостей за ростовими властивостями, фізико-хімічний контроль і показник цитотоксичності.

## ^ Буферні системи

Буферні системи, застосовувані у культуральних дослідженнях, як правило, входять до складу збалансованих сольових розчинів. Крім того, буферні системи використовують окремо для відмивання клітин чи проведення різних імунологічних, цитохімічних та біохімічних реакцій.

^ **Гепес буфер.** Гепес-2 (гідроксиетил) піперазин – N-2-етансульфуорова кислота, м. м. 238,3 Д;  $pK_a = 7,5$  при 25 °С, нетоксичний для клітин, широко застосовують для підтримки рН від 6,8 до 8,2 у культуральних дослідженнях, пов'язаних із вирощуванням лімфоїдних, макрофагальних, стромальних клітин, гібридом і ряду перещеплюваних ліній клітин. При використанні гепес буфера як газового середовища для культивування беруть повітря, при застосуванні його в комбінації з дикарбонатом натрію необхідно підтримувати концентрацію вуглекислого газу на рівні 2 %. У культурах гепес використовують у концентрації 10-28 мМ. Гепес буфер випускають у вигляді 100<sup>x</sup> концентрату (зберігають при 4 °С) чи сухої речовини (зберігають при 20 °С необмежено довго).

Швидкість проліферації і максимальне накопичення клітин досить суттєво залежать від порівняно незначних змін рН середовища. Хоча стандартні середовища і стандартні умови культивування розраховані на однакові значення рН, є повідомлення про те, що для різних ліній клітин оптимуми рН відрізняються.

## ^ Роль факторів росту у культивуванні клітин

Для підтримки проліферації та диференціювання клітин у культурі необхідними є ряд факторів, таких як фактор росту фібробластів, фактор росту ендотеліальних клітин, епідермальний ростовий фактор інсуліноподібний ростовий фактор, інсулін, еритропоетин, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор, макрофагальний колонієстимулюючий фактор, інтерлейкін-1, інтерлейкін-2, інтерлейкін-3, інтерлейкін-4, інтерлейкін-5, інтерлейкін-6 та інші.

^ **Фактор росту фібробластів.** Протеїн, що складається із 2 гомологічних поліпептидних ланцюгів, які містять 146-156 амінокислот із м. м. 18 кД. Випускають у вигляді ліофілізованого препарату, отриманого із різних тканин ВРХ або за допомогою гібридної техніки. Зберігають при -20 °С. Необхідний для росту мезодермально-нейроектодермальної тканини, включно із фібробластами, ендотеліальними клітинами, остеобластами, хондроцитами, гліальними та іншими елементами. У культурі біологічну активність проявляє у дозі 1-20 нг/мл. Препарат розводять фізіологічним розчином (з 1мг/мл БСА) або збалансованими фосфатним буфером (рН=7,2).

**^ Фактор росту ендотеліальних клітин.** Білок, що складається із 2 поліпептидних ланцюгів ( $\alpha$ -ланцюг містить 134 амінокислоти, м. м. = 17 кД;  $\beta$ -ланцюг – 154 амінокислоти, м. м. = 20 кД), виділяють із тканин ВРХ чи ендотеліальних клітин. Випускають у ліофілізованому вигляді. Зберігають при 4 °С. Мітоген, що стимулює ріст ендотеліальних клітин людини і тварин. Володіє здатністю потенціювати ріст фібробластів, хондроцитів, остеобластів, мієлобластів та м'язових клітин. Зазвичай використовують у поєднанні з гепарином, фібронектином чи колагеновим матриксом. Активний у культурі тканини при концентрації 100-130 мкг/мл. У поєднанні з гепарином (90 мкг/мл) дозу ФРЕН знижують до 10-20 мкг/мл. Робочий розчин готують у 2 етапи. Спочатку препарат розчиняють у надчистій воді (0,3-0,5 мл), потім доводять до потрібної концентрації відповідним культуральним середовищем.

**^ Епідермальний ростовий фактор.** Поліпептид, що складається з 53 амінокислот, м. м. 6 кД. Отримують із підщелепних залоз чи за допомогою гібридомної техніки. Стимулює ріст трансформованих і нормальних епітеліальних, гліальних клітин, фібробластів, хондроцитів і кератоцитів. Використовують у дозі 1-20 нг/мл. Випускають у ліофілізованому вигляді. Зберігають при -20 °С. Перед використанням спочатку розчиняють у надчистій воді (0,3-0,5 мл), потім – у фізіологічному розчині (1 мг/мл БСА), збалансованому фосфатному буфері (рН=7,2).

**Інсуліноподібний ростовий фактор (соматомедин С).** Поліпептид, що складається із 70 амінокислот, м. м. 7,6 кД. Отримують із сироватки крові чи з допомогою гібридомної техніки. Випускають у ліофілізованому вигляді. Зберігають при -20 °С. Використовують у якості ростового фактора у поєднанні із ІЛ-3, ЕП, КСФ, геміном та іншими для вирощування ГЕММ-КУОк, Е-БУОк, Е-КУОк у безсироватковому середовищі. Стимулює ріст еритроїдних прекурсорів без еритропоєтину, фібробластів, нейробластоми, м'язових волокон та інших соматичних клітин. Концентрація у культуральному середовищі становить 1-50 нг/мл (0,01-0,1 Од/мл). Перед використанням розчиняють у 1-3 мл 0,1М розчину оцтової кислоти чи 1-3 мл 10мМ гідрохлорної кислоти, потім доводять до необхідної концентрації відповідним культуральним середовищем, що містить 1 мг/мл БСА.

**Інсулін.** Протеїн, що складається із 2 поліпептидних ланцюгів (А-ланцюг містить 21 амінокислоту, В – 30), м. м. 5,7 кД. Виділяють із підшлункової залози. Випускають у ліофілізованій формі. Зберігають при 4 °С. Володіє широким стимулюючим ефектом відносно клітин різних гістогенетичних ліній (гемопоетичні, стромальні, ендотеліальні та інші соматичні клітини). Потенціює дію ЕП і КСФ. У культурі тканини концентрація становить 1-10 мкг/мл (0,026-0,3 Од/мл). Перед використанням препарат розчиняють у 0,5-0,6 мл надчистої води, потім доводять до потрібної концентрації відповідним живильним середовищем.

**Еритропоетин.** Глікопротеїн із м. м. 23-46 кД, стимулює процеси проліферації і диференціації еритроїдних клітин-попередників та дозрівання елементів, які морфологічно диференціюються. Випускають у вигляді ліофілізованого препарату, який отримують за допомогою гібридомної техніки чи виділяють із плазми крові овець із низьким рівнем ендотоксину. Зберігають при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  та  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  відповідно. Біологічну активність *in vitro* проявляє у дозі 0,25-2,0 Од/мл.

^ **Гранулоцито-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ).** Глікопротеїн, м. м. 14,2-40,0 кД. Стимулює ріст ГМ-КУОк, Г-КУОк, М-КУОк, Е-БУОк у культурі тканини *in vitro*. Підвищує продукцію ІЛ-1. Синергіст ІЛ-3. Його отримано у рекомбінантній формі і виділено із кондиційного середовища мітоген-стимульованих Т-лімфоцитів, клітин лінії СК ЗР. Біологічну активність в системі *in vitro* проявляє в дозі 50,0-100 Од/мл. У ліофілізованому вигляді зберігають при  $0-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , у рідкому – при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

^ **Гранулоцитарний КСФ (гранулоцито-макрофагальний індуктор-2, диференціюючий фактор).** Глікопротеїн, м. м. 25-62 кД. Стимулює ріст Г-КУОк, ГМ-КУОк у культурі тканини *in vitro*, дозрівання мієлоїдних клітин, що диференціюються, підвищує функціональну активність гранулоцитів, синергіст ІЛ-3. Отримують шляхом очищення кондиційного середовища тканини легень або за допомогою гібридомної техніки. Біологічну активність у системі *in vitro* проявляє у дозі  $10^{-12}$ - $10^{-14}$  моль/л чи 75-150 Од/мл. У модифікованому вигляді зберігають при  $0-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , у рідкому – при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

^ **Макрофагальний КСФ (КСФ-1).** Глікопротеїн, м. м. 70 кД. Стимулює ріст, головним чином, М-КУОк, ГМ-КУОк у культурі тканини *in vitro* і дозрівання диференційованих мієлоїдних клітин, підвищує функціональну активність зрілих моноцитів і макрофагів. У культурі тканини активність проявляє у дозах  $5 \times 10^{-12}$ - $5 \times 10^{-13}$  М чи 100-200 Од/мл.

**Інтерлейкін-1 (ендогенний піроген, лімфоцитаактивуючий фактор, гемопоетин-1).** Глікопротеїн, що існує у вигляді форм  $\alpha$  і  $\beta$  з м. м. 4-17кД, що відрізняються між собою за кількістю цистеїнових залишків. Основним продуцентом ІЛ-1 є макрофаги. Разом із мітогенами активує Т-лімфоцити, викликаючи у них продукцію ІЛ-2. Підвищує чутливість високоочищених фракцій родоначальних клітин крові до дії ростових факторів. Є синергістом для ГМ-КСФ та М-КСФ (КСФ-1). Індукує вироблення ІЛ-6 стромальними клітинами кісткового мозку.

Випускають у вигляді рекомбінованих препаратів ІЛ-1 $\alpha$  та ІЛ-1 $\beta$ , які готують на фосфатному буфері з БСА. Зберігають при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (розчин) і  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Біологічну активність проявляє у дозі 50-100 Од/мл.

**Інтерлейкін-2 (фактор росту Т-клітин).** Протеїн, що складається із 133-152 амінокислот, м. м. 14-17 кД, продукується активованими Т-клітинами чи лейкозними лініями Т-клітин людини. Випускають у вигляді ліофілізованих препаратів (рекомбінантний ІЛ-2 людини, ІЛ-2 шурів, отриманий із активованих Т-лімфоцитів), вільних від лімфоцитарних токсинів, інтерферону і ІЛ-1. Зберігають при -20 °С. Біологічну активність проявляє у дозі 20-100 Од/мл.

**Інтерлейкін-3 (мульти-КСФ).** Глікопротеїн, м. м. 15-28 кД, продукується активованими Т-лімфоцитами, клітинами лінії WENJ-3B. Активує процеси проліферації і диференціювання Н-КУОк, ГЕММ-КУОк, Е-БУОк, ГМ-КУОк, Г-КУОк, М-КУОк, Е-КУОк, Мег-КУОк. Отримують із кондиційованого середовища клітин-продуцентів (WENJ-3B, РКW-стимульованих спленоцитів) чи за допомогою гібридомної техніки. Біологічну активність проявляє в дозі 50,0-100 Од/мл.

**Інтерлейкін-4 (В-стимулюючий фактор).** Протеїн, м. м. 20 кД, продукується активованими Т-клітинами. ІЛ-4 переводить В-ліфоцити зі стану спокою у S-фазу клітинного циклу, стимулює проліферацію деяких типів лімфоцитів і тучних клітин, індукує продукцію IgG<sub>1</sub> і IgE. Отримують препарат за допомогою гібридомної техніки.

**Інтерлейкін-5 (Т-замісний фактор).** Глікопротеїн, що складається із 134 амінокислот, м. м. 45-60 кД, продукується активованими Т-лімфоцитами чи Т-клітинною гібридомою. Використовують у дозі 10-100 Од/мл. Ростовий і диференціюючий фактор для В-клітин, стимулює ріст Ео-КУОк людини і диференціювання еозинофілів у мишей. Індуктор синтезу IgA. Отримують за допомогою гібридомної техніки

**Інтерлейкін-6 (β<sub>2</sub>-інтерферон, ростовий фактор гібридомних плазмоцитів).** Протеїн, м. м. 26 кД, продукується Т-клітинами. ІЛ-6 у поєднанні з інтерфероном викликає диференціювання В-клітин. Стимулює ріст ГМ-КУОк, Н-КУОк. Синергіст для ІЛ-3 при дії на Н-КУОк. Отримано рекомбінантну форму препарату. Випускається у вигляді суміші α- і β-інтерферону, виділеного із супернатанту стимульованої клітинної лінії L 929 мишей у модифікованій формі. Зберігають при 0-5 °С.

## Термінологія культури тканин тварин та людини

**Культура тканин тварин та людини** – система *in vitro*, у якій ембріони, зачатки органів, цілі органи, експлантати або клітини, що були отримані від тварин або людини, підтримуються, ростуть та діляться протягом 24 та більше годин.

^ **Клітинна культура** – культура первинно роз'єднаних клітин. Залежно від співвідношення з підтримуючим субстратом розрізняють два основних види культур клітин: одношарові та суспензійні.

^ **Первинна культура** – культура, джерелом якої є органи, експлантати або клітини, безпосередньо вилучені з організму (виключивши культури, джерелом яких є пухлини, утворені культивованими клітинами, введеними тваринам). Первина культура вважається первинною, доки її жодного разу не пасивували.

^ **Культура диплоїдних клітин** – морфологічно однорідна популяція клітин, стабілізована в процесі культивування *in vitro*, яка має обмежений термін життя і характеризується трьома фазами (стабілізацією, активним ростом, старінням) та зберігає у процесі пасування каріотип, притаманний вихідній тканині.

^ **Постійна (перещеплювана) гетероплоїдна культура** – культура, повністю адаптована до умов існування поза організмом протягом років, що володіє здатністю до практично необмеженого розмноження (субкультивування).

^ **Культура органів** – правильно приготовані зрізи органів, які *in vitro* зберігають свою структуру і функції протягом декількох днів, а деколи і тижнів.

**Пасивована культура (субкультура)** – культура, що була перенесена з одного посуду в інший.

**Рекультура** – 1) культура, яку отримали з експлантатів або клітин пухлини, або культура, що розвинулася при імплантації культивованих клітин тварині; 2) культура, яку отримали в результаті переносу експлантата або моношару в інший посуд з новим живильним середовищем.

^ **Двовірна культура** – культура, розростання клітин якої відбувається на площині.

**Тривимірна культура** – культура, у котрій підтримуючим субстратом для клітин є пористе тіло (наприклад, культура на губчастому субстраті).

**Імплантаційна культура** – експлантати або клітини, що культивуються в організмі експериментальних тварин: підшкірно, у передній камері ока, у черевній порожнині.

^ **Культура, що розвивається** – культура, що має одну або декілька з таких ознак, як поділ клітин, диференціювання клітин, диференціювання клітинних комплексів.

^ **Переживаюча культура** – культура, клітини якої залишаються живими, проте не поділяються та не диференціюються.

**Клон** – популяція клітин, що виникла шляхом мітотичного поділу з однієї клітини. Клон не обов’язково має бути однорідним, тому поняття “клон” та “клонування” не слід вживати для опису однорідності клітинної популяції.

^ **Клонований штам або лінія** – штам або лінія, що походять безпосередньо з клону.

**Субклон** – культура, що була отримана з клону шляхом виділення клітин або групи клітин, які мають одну чи декілька ознак, притаманних лише деяким клітинам цього клону.

^ **Абсолютна ефективність утворення колоній** – частка у відсотках посіяних клітин, що утворили колонії. Мають бути вказані умови посіву, культивування та оцінки.

^ **Відносна ефективність утворення колоній** – частка у відсотках посіяних клітин, що утворили колонії, у співвідношенні до контролю, у якому абсолютна ефективність утворення колоній умовно прийнята за 100%. Мають бути вказані умови посіву, культивування та оцінки, а також абсолютна ефективність утворення колоній у контролі.

^ **Диференціювання в культурі** (диференціювання *in vitro*) – поява в культурі структур і (або) функцій, що притаманні дорослому стану органа, тканини чи клітини.

^ **Дедиференціювання в культурі** (диференціювання *in vitro*) – зникнення в культурі структур і (або) функцій, що притаманні дорослому стану органа, тканини чи клітини.

^ **Живильне середовище** – середовище, що містить інгредієнти, призначені для забезпечення існування ембріонів, органів, експлантатів та клітин у культурі.

^ **Культуральне середовище** – середовище, яке окрім живильних речовин містить агенти, що мають стимулюючу, пригнічувальну, токсичну, мутагенну чи канцерогенну дію на культуру.

^ **Підтримуюче середовище** – середовище, в якому не відбувається поділ клітин, які здатні до поділу поза організмом, проте зберігається їх життєздатність.

**Кондиційоване середовище** – середовище з культур ембріонів, органів, експлантатів або клітин, що містить продукти їх життєдіяльності.



^ **Гранулярно-еритроцитарно-макрофагально-мегакаріоцитирна (поліпотентна) колонієутворююча одиниця (ГЕММ-КУО)** – клітина-попередник, що формує колонію, яка містить гранулоцити, еритроцити, моноцити-макрофаги та мегакаріоцити.

^ **Гранулярно-макрофагальна колонієутворююча одиниця (ГМ-КУО)** – клітина-попередник, що формує колонію, яка містить гранулоцити та моноцити-макрофаги.

**Гранулярна (гранулоцитна) колонієутворююча одиниця (Г-КУО)** – клітина-попередник, що формує колонію гранулоцитів.

^ **Еозинофільна колонієутворююча одиниця (Ео-КУО)** – клітина-попередник, що формує колонію еозинофілів.

**Гранулоцитарно-макрофагальна колонія** – колонія в культурі, що містить 40 та більше названих клітин.

^ **Неповна гранулоцитарно-макрофагальна колонія** – колонія в культурі, що містить 3-39 названих клітин.

**Кластер** – неповна гранулоцитарно-макрофагальна колонія в культурі, що містить 3-20 названих клітин.

^ **Еритроїдна бурстутворююча одиниця** – ранній попередник еритроцита, що формує в культурі колонію з широким розсіюванням еритроїдних клітин.

**Мегакаріоцитарна колонієутворююча одиниця (Мег-КУО)** – клітина, що формує в культурі колонію мегакаріоцитів.

^ **Фібробластна колонієутворююча одиниця (Ф-КУО)** – клітина кісткового мозку, що формує в колонії культуру фібробластоподібних клітин.

## Список літератури

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж.// Молекулярная биология клетки: Пер. с англ.– М.: Мир, 1994.– с.176-186.
2. Афанасьев Б. В., Алмазов В. А. Родоначальные кроветворные клетки человека. – Л.: Наука, 1985. – 204 с.
3. Білько Н. М. Методи експериментальної гематології. – К.: Видавничий дім «Києво-Могилянська академія», 2006. – 54 с.
4. Билько Н. М., Вотякова И. А., Василовская С. В., Билько Д. И. Характер взаимодействия стромального матрикса и АС 133+ клеток кордовой крови в трехмерной культуре *in vitro* // Цитология, 2004. – Т.46. – С. 897-898.
5. Гематологія і трансфузіологія / під ред. Гайдукової С.М. – К.: ВПЦ «Три крапки», 2001. – 752 с.
6. Глузман Д. Ф., Абраменко И. В., Скляренко Л. М., Надгорная В. А. Лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний. – К.: Изд. “Морион”, 1998. – 334 с.
7. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. – Томск: изд-во Томск. ун-та, 1992. – 273 с.
8. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Под ред. проф. Л. П. Дьяконова, проф. В. И. Ситькова – М.: Компания Спутник+, 2000. – 400 с.
9. Кассирский И. А., Алексеев Г. А. Клиническая гематология М.: Изд. Медицина, 1970. – 800 с.
10. Кухарчук А. П., Радченко В. В., Сирман В. М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки. – К.: ООО «КРС-Медицинские технологии», 2004. – 505 с.
11. Руководство по гематологии: в 3 т. Т. 1. Под ред. А. И. Воробьева. 3-е изд., перераб. и допол. – М.: Ньюдиамед; 2002. 280 с. с ил.
12. Сибірна Н.О., Великий М.М. Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові. Методичний посібник. – Львів, Ред.-вид. відділ Львів. ун-ту, 1997. – 69 с.
13. Чертков И.Л., Дризе Н.И., Воробьев А.И. и др. Кроветворение // Руководство по гематологии/ под ред. Воробьева А.И., 2002. – Т.1 – с. 28-43.
14. Bilko N.M., Votyakova I.A., Vasylovska S.V., Bilko D.I. Characterization of the interactions between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models // Cell Biology International, 2005. – Vol. 29. – p. 83-86.
15. Dexter T.M. Stromal cell associated haematopoiesis // Journal of Cell Physiology, 1982. – Vol. 1 (suppl.). – p.87-94.
16. Pluznik D. H., Sack L. The cloning of normal “mast” cells in tissue culture// Journal of Cell Physiology, 1965. – Vol. 66. – p. 319-324.
17. Wobus A. Potential of embryonic stem cell// Molecular Aspects of Medicine, 2001. – Vol. 22. – p. 149-164.