



Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық
Университеті
Биология және биотехнология факультеті



Жануарлар клеткалық культурасын алу және өсіру түрлері

Орындаған: Домакбаева А

Шымыр Г

Утешова С

Ұлықбекова М

Тилеп Н

Шала Б

Тексерген: Сербаева А

Жоспары:

I. Кіріспе

Әдіс тарихы

II. Негізгі бөлім

1. Клеткаларды культивирлеу

2. Культураға клетканы енгізу

3. Клеткалардың шығуы

4. *In vitro* жағдайында культивирленетін клеткалар сипаттамасы

5. Қоректік орта

6. Клетканың культивирлену шарты

III. Қорытынды

Әдіс тарихы

I

- . 20 ғасырдың бірінші 10 жылдығында жануарлардың клетка тіндерін организмнен бөліп алуды және олардың өсуіне жағдай жасауды және *in vitro* өндіруді мойындады.

II

- жұмыстың екінші этапы басталып, негізі болып өсіру мүмкіндіктерінің демонстрациясы және мұндай клеткадағы инфекция агент-вирустарының репродукциясы болып табылады.

III

- Тарихтың үшінші этапы вакцина препараттарына қолдану үшін жануарлар клеткаларындағы үлкен вирус материалының көлемін алу мүмкіндігін практика жүзінде көрсетіле басталды,

III этап

Үлкен вирус материалының көлемін алу мүмкіндігін практика жүзінде көрсетіле басталды, және жойылуы:

1) клеткаға спецификалық экзогенді алынған гендерді енгізу және олардың экспрессиясын алу

2) клеткада бүтін популяцияның бір клеткасын өсіру мүмкіндігі бекітілгенге дейін болды. Мұндай популяцияларды қоршаған ортаға антидене бөлетін клеткалардан алғанда, барлық антидене молекулалары тұнбаүстілік сұйықтықта бірдей болады. Бұл екі феноменнің себебі мен барысы қазіргі уақытта қарқындылықпен зерттелуде және олар өзімен берілген бағыттың 4-ші этап жұмыстарының басталуына алғышарты болып саналады.

Культурада жануар клеткаларының өсу және бөліну қасиетін көрсету үшін, әдістер қатарын меңгеру қажет етілді.

- 1. Экзогенді прокариоттардан және саңырауқұлақтардан таза клеткалар алу әдістемесі.
- 2. «Тіннен бөлініп алынғын» немесе жекешеленген клеткалары бар ортаны жасау әдістемесі ығыстырылмайды.
- 3. Динамикада клетканың дамуын бақылау әдістемесі.
- 4. Жануарлар клеткасын үздіксіз *in vitro* жағдайда культивирлеу және оларды басқа биологиялық агенттерден бос ұстау әдістемесі.

Осы әдістемелердің разработкасының ғылыми негізін, жануар және өсімдік тектес тірі организмдердің құрылымдық элементі ретінде клетка құрайды. Жануар тінінің клеткасын организмнен бөлу және одан кейін олардың өсуіне жағдай жасау оларды *in vitro* өндіру идеясы Клод Бернардың концепциясында пайда болды. Ол ішкі жағдайда қоршаған ортада өзгеріске тәуелсіз, ішкі ортаның тұрақтылығын сақтауға қабілетті тек тірі организмдер ғана емес деген пікірде болды. Организмнен тыс жануар клеткасы өзінің ішкі жағдайларын сақтауға тырысады. Егер ішкі және сыртқы жағдайлар арасындағы ерекшелік елеусіз болып, өсу мен клетканың бөлінуінің мүмкіншілігі артады. Мұндай құбылыстың түсінігі қолдауға қабілетті және клетканың организмнен тыс өсуін стимульдейтін орта құрылымын жасау болып табылады.

Одан кейінірек 1885 жылы **У. Рукс** организмнен тыс тірі организмдерді сақтайыу мүмкіншілігін практика жүзінде көрсетті. Ол тауық эмбрионының қабықшасын физиологиялық ерітіндіде тіршілікке қабілетті күйде сақтады. Кейінірек 1897ж **Леб** жалғағыш тіндермен қан клеткаларын сарысу мен қант плазмасы бар пробиркаларда тіршілікке қабілетті күйде сақтады. **Льонгрэн** (1898ж) реиплантацияға қабілетін сақтаған қышқылды ортада адам терісінен алынған экспланттарды тіршілікке қабілетті күйде ұстады. Қосымша эксперименттерді **Джолли** (1903) саламандра лейкоциттері бпар ілмелі тамшыларда клетканың бөлінуін бақылады., ал **Биб** және **Эвинг** (1906) бұл ит тінінің лимфосаркомасын қайта отырғызу деп бекітті. **Ру** және **Росс Харрисон** жұмысты жалғастыру барысында ілмелі тамшылар әдістемесін жетілдірді. 1907 жылы камераның көмегімен бірнеше апта ішінде нерв клеткаларының өсуін бақылай алды: ол бұл клеткалардың өсу жылдамдығы 25 минутта 20мкм болатынын бекітті.

- 1913ж **Алексис Каррель** эмбрион экстрактысымен байытылған қан плазмасын қолданды. Бұл әдістеме үлкен жетістікті қамтамасыз етті. **Рид** теңіз шошқасының сүйек миынан культура дайындап және белгілі химиялық құрамдық ортада экспланты өсіруге талпынды. **Левис (1911)** және **Рид (1908)** қолданған. Каррельдің жұмысы «өлмейтін» клеткаларды культивирлеу деген атпен жариялағандықтан көпшіліктің үлкен назарын аудартты. 1912 жылдың 17 қаңтарының басы тауық эмбрионының жүрегінің клеткаларының инкубациясын алу кезеңі болды. Клеткаларды қайтара егуді 34 жыл бойында Эблинг жалғастырды.



Каррель хирург болғандықтан және асептика жөнінде білгендіктен жануарлардың клеткаларын *in vitro* культивирлеуге үлкен үлесін тигізді. Каррель өзінің әріптестеріне клеткаларды қайтадан өткізу процесі кезінде жасалатын бақылаулар туралы демонстрация жасады. Істелінген жұмыс барысында культивирлеу ортасы рецептурасына бірқатар өзгертулер енгізді. **Тирод Ренгердің** ерітіндісін модифицирледі және тауық сарысуымен эмбриональды экстракты толтыруда фибрин коагулятын қолдана бастады. Бөлініп жатқан жануарлар клеткаларын бақылау үшін 1928ж **Канти** кинофотомикрография тәсілін шығарды. Осы кезеңде клеткалық жұмыс техникамына қосымша және түбірлі өзгерістер болды. Ең бірінші жалғыз клетка культуралар клонын 1948 **Эрли** мен оның әріптестері алды.

Трансплантация в эксперименте

1902	Э.Ульман	Аутотрансплантация собаке	почки
1902	А.Каррель	Аутотрансплантация щитовидной железы собаке	
1905	А.Каррель	Гетеротрансплантация собаке – жила 2.5 года	почки
1905	А.Каррель	Подсадка второго сердца собаке	
1925	С.Броханенко	АИК	
1928	В.Шамов	Мысль о возможности переливания трупной крови	
1939	Н.Синицын	Успешная пересадка лягушке	сердца
1947	В.Демихов	Аллотрансплантация легкого	
1951	В.Демихов	Аллотрансплантация собаке	сердца
1962	В.Демихов	Подсадка второго сердца собаке (прожила больше 4 мес.)	

Культураға клетканы енгізу

Экспериментальды жұмыстың мақсаты мен тапсырмаларына қатысты жануар клеткаларының 2 бағытта культивирленуін шығаруға болады:

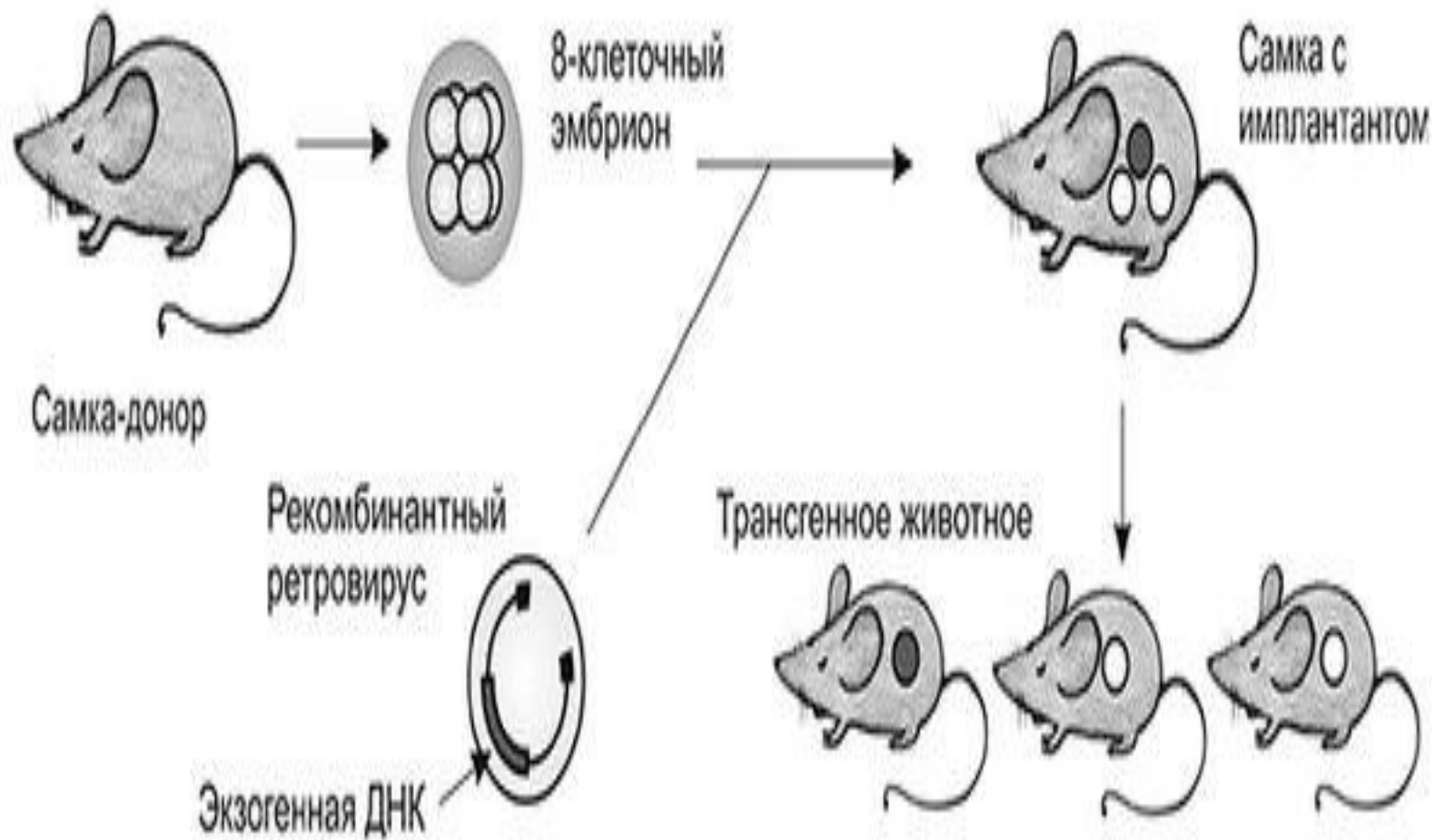
Клеткалар
культурасы

Ағза мен тін
культуралары
(ағзалық
культуралар)

Клеткалар культуралары құрылымдық мекемелерден алыстатылған гистиотипикалық архитектураға тән қасиетін биохимиялық белгілерін жоғалтады және олар арнайы жағдайлардың болмауы кезінде тепе-тең жағдайда көбінесе жетпейді. Клеткалар культурада көбееді, олар клетканың үлкен массасын алуды қамтамасыз етеді, одан оларды идентифицерлейді, идентикалық параллельдерде бөледі және қажет болса сақтайды. Осымен байланысты кейбір зерттеулер берілген тіннің құрылымдық біртұтастығын сақтайтын клеткалық жүйелерді қолданады.

Клеткалар түрінің культураға кірген тізімі жетерліктей көп. Олар:

- адамның қосалқы тін элементі (фибробластар),
- скелет тіндері (сүйек және сіңір),
- жүрек және тегіс бұлшықеттер,
- эпителий тіндері (бауыр, бүйрек т.б.),
- нерв жүйесінің клеткалары,
- эндокринді клеткалар (бүйрек үсті, гипофиз),
- меланоцит
- ісік клеткалары.



Клеткалар популяциясы үнемі гомогенді болмайды және фиксирленген фенотипі бар. Культураға енгізуге қандай ті алуға болады, ересек немесе эмбриональды, калыпты немесе ісіктік? Эмбриональды тіннен алынған культуралардың тіршілікке қабілеттілігімен және ересек тіндерге қарағанда белсенді өсу қабілетімен сипатталады. Мұның себебі болып, мамандандырудың төменгі деңгейі қызмет етеді. Ересек тіндерді **пролиферативті** қабілеті болып, олардың бөлінбейтін маманданған клеткалардың көп болуы. Үлкен тіндердің біріншілік клетка культураларын алу және олардың көбеюі қиын болғандықтан, мұндай клеткалардың өмірі ұзақ емес. Ісіктен алынған культуралар үздіксіз ұзақ уақыт пролиферленгенде қалыпты тіндер культуралар өміріне белгілі бір уақыт береді. Ісік клеткалары культурасында пролиферацияға қабілеттілікті сақтауда аздаған бөлікте **дифференцировка** болуы мүмкін.

Жаңа бөлінген культуралар пассирлеу мен субкультурлеубасталғанға дейін **біріншілік культура** деген атқа ие болады.

Біріншілік культуралар клеткалары әдетте *гетерогенді* және *төменгі пролиферациямен* сипатталады. пассерлеу культураның өмір сүруін ұзартып, клонирлеу мүмкіндігін зерттеу және клетканың сақтау қасиетін қамтамасыз етеді. Бұдан неғұрлым *біртекті популяция* пада болады, сонымен қатар специфирленген клеткалар жоғалады. Бірнеше егуден кейін клеткалар линиялары өледі неме трансформацияланады және тұрақты клеткалар линияларына айналады. Өлмейтін қасиетке ісіктен алынған клеткалар ие. Тұрақты клеткалар линиялар морфологиялық өзгерістерімен, сарысуға тәуелділігінің төмендеуімен, эффектісінің жоғарлауымен субстратқа тәуелділігінің төмендеуімен гетероплоидтылықтың жоғарлауымен анеуплоидтықпен және ісіктектіліктің көбеюімен констатирленеді.

In vitro жағдайында культивирленетін клеткалар сипаттамасы

Бір типтегі клеткалар ұстап тұру үшін тіндерде әрекеттеседі және бөліну жылдамдығын келіседі. Бұндай тектің **«әлеуметтік»** бақылауы бұзылу реакциясында байқаланады. Ұқсастықты культуралардың дисоциирленген клеткаларынан байқауға болады.

Адгезивті қатынастар клеткалар мембраналарын беткі рецепторларынан комплекстердің түзілуін қамтамасыз етеді. Гликопротеиндердің көлденең қозғалысының нәтижесінде мембранада гликопротеин комплексінің электронды тығыз белгілер (бляшки) түзіледі. Бұндай белгілер **аглютинерлі агенттер** немесе **көрші клеткалар** антиденесінің әрекетіне жауап ретінде түзіледі.

Адгезияда субстрат көпвалентті антидене ретінде әсер етеді. Ал көп түзілген белгілерді **«адгезивті дақ»** деп атайды. Бұл дақтар адгезивт ақуыздарға бай және гликопротеидті ұстап тұратын ситос скелет элементтері шығарады. Осы қызметтердің көмегімен мембрананың күйі (разжижение) азаяды және домаланудан алдын-ала сақтанады. Клетка түзілген адгезивті дақтар шошақтарын (выступы) құрайды. Олардың көмегімен орын ауыстырады. Цитоплазма шошақтары көрші мембраналармен қатынасында қозғалысты ингибирлейді. Осы жағдайда клеткалар өздерінің псевдоподияларын басқа бағытқа ауыстырады. Ондай клеткалар көпқабатты болған жағдайда жалған аяқтылардың белсенділігі және клеткалардың қозғалысы тоқтайды.

Қалыпты клеткалар бөлінуді тоқтатса, бұл құбылыс тығыздыққа байланысты пролиферацияның тоқтауымен түсіндіріледі. Егер мұндай моноқабат атбақшада клеткадан бос сызық пайда болуы үшін инемен «жараланса (поранить)» клеткалар бұл сызықтың шетімен бос орынға жылжи бастайды және бөліне бастайды. Клетка популяциясының тығыздығы ортада өсу факторларының жоғарылауымен үлкееді, бұдан басқа егер культуральды сұйықтық табақша бетімен клетка шеттерімен ағатын болса, онда ортамен жуылған, басқа клеткалар үстімен өткен клеткалар, бос клеткалар бөлімдері үстімен өткен, ортамен жуылған клеткаларға қарағанда баяу бөлінеді. Клетка үстімен аққан ротада, кейбір қоректік заттар немесе өсу факторлары болмайды.

Яйцеклетка

Эпителий молочной железы

Клонированная овца

Микро-
пипетка



Удаление
ядра



Слияние
Активация



Выращивание клеток
в культуре



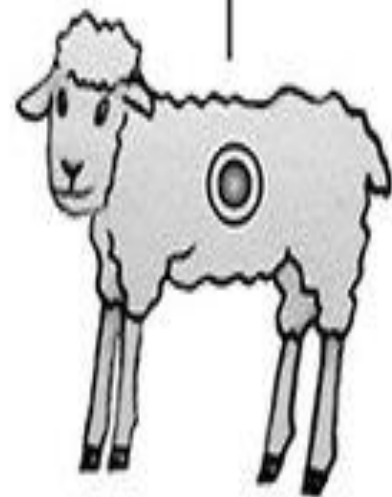
Индукция G₀
фазы



Культивирование



Имплан-
тация



Суррогатная мать

- Өсу факторы әдетте концентрациясы 10^{-10} М болатын ортада болады. Өсу факторы бір фибробласта 10^5 рецепторлы өсу факторы болады, олардың әрқайсысы оған өте жоғары типтілікке ие. Осылайша әрбір клеткаларды 150 мкм диаметрлі сфера көлемінде өсу факторларының барлық молекулаларын байланыстыру үшін рецепторлары жеткілікті.
- Осыдан басқа клетка бетінің рецепторларымен байланысқан өсу факторларының көп мөлшері эндоцитоз жолымен бұзылып, жойылады. Бұдан көршілес клеткалар бір-бірімен өсу факторының азғана мөлшері үшін бәсекелеседі. Бәсекелесудің бұндай түрі тіндегі клетка үшін де, культивирленген клеткалар үшін де маңызды. Ол тығыздықтың кейбір деңгейінен жоғарғы популяцияның өсуіне айналады.

- Өсу факторы мен қоректік орта бәсекелестігі клетка культурасындағы бөлу жылдамдығына әсер ететін жалғыз фактор емес. Субстрат бетіндегі олады распластауымен, бос орындарға қозғалысының клеткалар формасы олардың бөліну қабілетіне тағы да күшті әсер береді. Қатты бетке бекітілген қалыпты клеткаларды культивирлегенде, олар тіпті бөлінбейді. Сондықтан дөңгелек пішінді иемденеді. Клетканың бөліну жиілігі олардың распластау дәрежесінің үлкеюіне байланысты өседі. Қатты распластанған клеткалар көптеген өсу факторының көп молекуласын ұстауы мүмкін және өзінің үлкен жоғарғы қабатының арқасында көп мөлшерде қоректік ортаны қалғиды (поглощать).

Бірақ та субстрат аймағымен байланысқа түсе сала, клетка распластай алмайтындай бұл аймақ өте кішкентай болса да суспензияда пролиферацияға қабілетсіз клеткалар типі белсенді бөлінеді. Бұндай фокальды байланыстар сыртқы клеткалық матрикстар молекуласымен клеткадан тыс актинді филаминттер қосылысының орны болып табылады. Осы және басқа да байқаулар клетканың бөлінуін бақылау қалайда цитоскелеттік ұйымдасумен байланысты деген ойды туындатады. Механизм мен функция бұл ретте түсініксіз клетканың байланысы оның бекітілуіне байланысты деп ойлауға болады, шындығында тіндер клетка пролиферациясын, оның бүтіндігін сақтайды. Қатерлі ісік клеткаларында өсуді басқарудың жоғарылауы әрқашан клетканың адгезивтіктің азаюымен байланысты.

Қоректік орта

Тіннен немесе ағзадан клеткаларды алып оларды культураға орналастырған соң, культуральды орта клеткалары *in vivo* иеленетін барлық сыртқы жағдайларды қамтамасыз етуі керек. Бұл клетканың өмір сүруін, олардың пролиферациясын дифференцировкасын қамтамасыз етеді. Сыртқы клеткалық орта клеткаларды қоректік және гормональды факторлармен, яғни өсу үшін және клетканың өмір сүруі үшін барлық қажеттілікті қамтуы керек.

- Адам және жануарлардың клетка культурасы сұйық (қоректік орта) *газообразды* (газ концентрациясы) және *қатты* (субстрат беті) фазада, нақтыланған талаптарды көрсетеді. Қоректік орта түсіндірілмеген биологиялық түзілу компоненттері қосылатын, анықталған құрам ерітіндісін құрайды (плазма қоспасы, қан сарысуы, тіндік экстракт және т.б.). Қоректік ортаның негізін тұз ерітіндісі құрайды. бұл ерітіндіде минералдық компоненттер культивирлеу процесінде ортаның тұрақты қышқыл сілтілі балансын қолдайтын буферлік функцияны орындайтын ерітінді таңдалған. Ортаның рН тұрақтылығы культивирлеу шартының негізгі талаптарының бірі болып саналады.

- Қоректік ортаны дайындау үшін **Эрл** мен **Хенкстің** тұ ерітіндісі қолданылады. Бұл ерітінділер фосфаттұзды буфер **Дубленко** мен
- сияқты культураны пассирлеуде, клетка линияларын бөлуде, клетка культурасымен басқа манипуляцияда өсіру және жуу үшін қолдалынады. Культивирлеудің басқа маңызды шарты осмотикалық қысым болып табылады. Ол 1кг еріткіште (осмолярлы) немесе 1 ерітіндіде (осмолярлы) ерітілген заттардың осмотикалық белсенді бөлігінің (иондар мен ионсызданғандырылған молекулалар) мольдерінің санымен анықталады. араластырылған су ерітіндісінде бұл шамалар жақын. ерітіндінің осмолярлығы $(\text{осмоль/кг}) = \sum m_i \cdot x_i$, мұндағы m_i – ерітілген заттардың 1-ші концентрациясы (моль/кг), x_i – молекулалары диссоцирленген бөліктер саны.

- Мысалы, Эрл ерітіндісі үшін осмолярлықтың есептік шамасы. 310,6 мосмоль/кг шындығында 283 клетка көбеюінен шығатын рН диапазоны мен осмолярлығы жіңішке және клетка типіне байланысты варьирленеді. Мысалы: W138 диплоидты фибробластарының клональды өсуі үшін $pH=7,30+0,15$ оптимальды және осмолярлығы $285+40$ мосмоль/кг, ал балапан эмбрионынан шығатын фибробластар үшін $7,12+0,18$ және $300+20$ сәйкес болады. Көптеген ортада егер көмір қышқыл газы бөлінсе $HCO_3=CO_2+OH$. Көптеген ортада бикарбонатты буфер қолданылады да, OH концентрациясы көбееді. Ерітінділер бикарбонат буферінің аздаған санын ұстауы мүмкін (Хенкс ерітіндісі), олар рН қолдау үшін тығыз жабылған сосудтарға арналған. Басқаларынды (Эрла ерітіндісінде) биарбонат көптеу, олар көтеріңкі парциальды CO_2 қысыммен жүйеде қолданылады. Егер, культура, рН қолдау қиын болған жағдайда CO_2 инкубаторынан тыс жүргізілсе, альтернативтік буферлік жүйе қажет. HEPES4- (2-оксиэтил)-пиперазин этансульфондық қышқыл жақсы буфер болып табылады. HEPES суда жеңіл ериді, еківалентті катионды байланыстырмайды, 0,05 моль концентрациясына дейін цитотоксикалық емес 0,01 0,03M концентрациясында қолданылады.

Жануарлар клеткасы культурасын жүргізу үшін стандарттық орта.

Игл орталары MEM (minimal essential medium) және *BME* (basal medium, Eagle). MEM жиі қолданылады. Олар көмірсулар субстратының міндетін атқаратын минералды заттар, Аминқышқылдары (13 ауыстырылмайтын), 6 суда ерітілген ерітінділер, витаминдер, холин мен инозитті құрайды. MEM тек сарысумен ғана қолданылады, өйткені онда тек қана биотин, B12 витамині, темір ионы және микроэлементтер. Эрл ерітіндісінің негізі.

Дульбекко ДМЕ және *ДМЕМ ортасы* (Игл ерітіндісінің қосарланған модификациясы). Клетка культивирленгенде әртүрлі типтер қолданылады, оның ішінде трансформирленген клеткалар мен гибридтер бар). Марысусыз ортада негіз болып табылады. Амин қышқылының қосарланған концентрациясын, глицин, серин, пируват, темір құрайды. Бұл ортаны қолданғанда 10%-тік CO₂ концентрациясымен инкубатор қажет.

- **Исков IMDM** – Дульбекко ортасы модификациясы. алмастырылмайтын амиқышқылдары, биотин, B12 витамині, натрий селениті қосылады. Ортаға **NEPES** енгізілген және **NaCl** мен **NaHCO₃** концентрациясы азайтылған. Орта сарысусыз лимфоциттер мен қанжасаушы клеткаларды культивирлеу үшін қолданылады.
- **МакКоя 2A** және **RPMI** сериясы ортасы. МакКоя 5A 1958 жылы сарысу қатысымен Уолкер 256 карцинсаркома клеткаларының клональды өсуін қолдау үшін құрылған, одан кейін басқа алғашқы культуралар мен әртүрлі клеткалық линиялар құрылды. Әдетте Ивката мен Грейс (RPMI) модификациясы өндіріледі, сарысу қатысымен лейкоциттерді культивирлеу үшін арналған, гибрид культивирлеуінде де жиі қолданылады. атмосферадағы культивирлеуде ауадағы **CO₂** концентрациясы 5%.

