

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**



**ОТРИМАННЯ ТА КРІОКОНСЕРВУВАННЯ
КЛІТИННОЇ КУЛЬТУРИ**

Методичні рекомендації для практичних робіт
аспірантів 1 курсу
галузь знань 09 Біологія
спеціальність 091 Біологія
дисципліна «Загальні проблеми та конкретні підходи до кріоконсервування
клітин і тканин»

Харків 2023

Рецензенти:

Т.М. Гуріна – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник; провідний науковий співробітник відділу кріомікробіології; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

Ю.Г. Кот – кандидат біологічних наук, доцент кафедри біохімії біологічного факультету, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна.

Затверджено до друку рішенням освітньо-наукової секції вченої ради Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 5 від 23.03.2023р.)

Отримання та кріоконсервування клітинної культури: Методичні рекомендації для практичних робіт аспірантів 1 курсу (галузь знань 09 Біологія, спеціальність 091 Біологія) з дисципліни «Загальні проблеми та конкретні підходи до кріоконсервування клітин і тканин» / *Петренко О.Ю., Пахомов О.В., Божкова Ю.О., Сидоренко О.С., Божок Г.А.* / [Електронний ресурс]– Х.: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 2023. – 17 с.

У методичних рекомендаціях викладені основні методи роботи з клітинною культурою, а саме наведені приклади отримання культури мезенхімальних клітин, зміни середовища, та пересіву, кріоконсервування і розморожування клітинної суспензії. Посібник спрямовано на здобуття базових навичок роботи з клітинними культурами під час проведення експериментів.

Для здобувачів вищої освіти на третьому освітньо-науковому рівні (доктор філософії).

ЗМІСТ

<i>Практична робота 1. Отримання культури мезенхімальних клітин із кісткового мозку миші.</i>	<i>4</i>
<i>Практична робота 2. Зміна середовища у культуральному флаконі.</i>	<i>7</i>
<i>Практична робота 3. Пересів клітин.</i>	<i>9</i>
<i>Практична робота 4. Кріоконсервування клітинного матеріалу.</i>	<i>11</i>
<i>Практична робота 5. Розморожування та пересів кріоконсервованих клітин.</i>	<i>14</i>

Практична робота 1. Отримання культури мезенхімальних клітин із кісткового мозку миші.

Мета роботи: оволодіти практичними навичками отримання культури мезенхімальних клітин.

Принцип методу.

Використовуючи метод культивування клітин, можна отримати гомогенну популяцію генетично однорідних клітин та повністю контролювати умови, в яких вони знаходяться, що забезпечує високу відтворюваність результатів у ході експерименту. Величезною перевагою методу є можливість спостерігати за клітинами прижиттєво.

Культивування клітин проводиться у культуральних середовищах, які повинні містити всі компоненти, необхідні для нормального функціонування та проліферації клітин. Середовища складають на основі збалансованих буферних сольових розчинів, які є джерелом фізіологічно важливих іонів, що забезпечують необхідний осмотичний тиск, а також амінокислот, вітамінів, глюкози та безлічі інших речовин. Для нормального зростання клітини також потребують специфічних ростових факторів. Тому в культуральне середовище додають сироватку крові ссавців (найчастіше великої рогатої худоби, а саме ембріональні сироватки в концентрації від 5 до 10%). Перед початком роботи з середовищем до нього необхідно додати L-глутамін, оскільки ця амінокислота нестійка і швидко розпадається у водному розчині. Для забезпечення стерильності в середовище додають антибіотики, інколи ж і антимікотики. Таким чином, приготування повного середовища для культивування клітин зводиться до змішування комерційного культурального середовища потрібного складу (вибраного в залежності від типу клітин), сироватки, L-глутаміну та антибіотиків.

Головним правилом роботи з клітинами, що культивуються, є дотримання стерильності.

Матеріали та обладнання.

Ножиці, пінцети, стерильні рукавички, середовище DMEM, фетальна теляча сироватка (ФТС), пеніцилін, стрептоміцин, L-глутамін, розчин трипанового синього, етанол 70%, шприци, пробірки, одноразові піпетки Пастера об'ємом 1,5-3 мл, автоматичні дозатори, камера Горяєва, культуральні флакони, центрифуга СМ-3М (Micromed) або ОПН-ЗУ4.2 або аналогічна зі схожими параметрами, ламінарний бокс, інвертований мікроскоп, CO₂-інкубатор.

Хід дослідження:

1. Тварину знерухомити за допомогою анестезії: 7,5 мг/кг маси тварини тілетаміну гідрохлориду; 7,5 мг/кг маси тварини золазепаму гідрохлориду (Препарат Золетил, Virbac, Франція); 20 мг/кг маси тварини ксилазину гідрохлориду (Препарат Седазин, «Biovet», Польща). Виконати цервікальну дислокацію шийних хребців. Витягнути стегнові та великі гомілкові кістки, звільнити їх від м'яких тканин. Епіфізи отриманих кісток відокремити.

2. Приготувати ростове середовище. Для цього до середовища DMEM додати 15% ФТС, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 12 мМ L-глутаміну.

3. Діафізи стегнових і великих гомілкових кісток промити ростовим середовищем.

4. Виділені з діафізів кісток клітини зібрати у конічні пробірки, що містять 5 мл ростового середовища, центрифугувати їх 10 хвилин при 400 g.

5. Надосадову рідину видалити. До осаду додати ростове середовище, доводячи об'єм до 1 мл (якщо потрібно, до 5 чи 10 мл).

6. Здійснити підрахунок клітин у 5-ти великих квадратах сітки камери Горяєва (див. Рисунок 1) та розрахувати концентрацію клітин в клітинній суспензії за формулою:

кількість клітин у 5-ти великих квадратах $\cdot 5 \cdot 10^4$ = Концентрація клітин (Кількість клітин / мл).

7. Після цього концентрацію клітин довести середовищем до $1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ клітин у 1 мл.

8. Отримані клітини висадити в культуральні флакони з площею поверхні 25 cm^2 (7 мл суспензії на флакон).

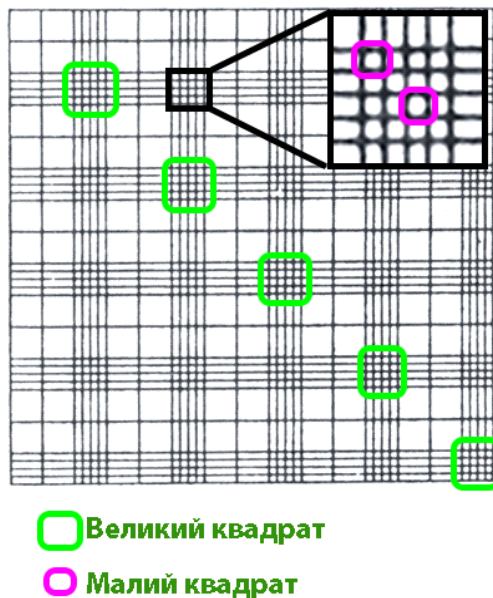


Рисунок 1. Камера Горяєва

9. Культивування проводити у CO_2 -інкубаторі при 5% CO_2 та температурі 37°C .

10. Через 48 годин клітини, що не прикріпилися, видалити, а у флакони додати 7 мл свіжого ростового середовища.

11. Клітини, що прикріпилися, культивувати, змінюючи ростове середовище кожні 3-4 дні.

Контрольні питання:

1. Назвіть основні етапи отримання клітинної культури.
2. Які компоненти додають до культурального середовища? Яку функцію вони виконують?
3. Як підрахувати кількість клітин в 1 мл суспензії?
4. Які морфологічні особливості мають клітини безпосередньо після посіву та після декількох діб культивування?

Практична робота 2. Зміна середовища у культуральному флаконі.

Мета роботи: отримати практичні навички зміни культурального середовища.

Принцип методу.

Оскільки при культивуванні клітин поживні речовини поглинаються із середовища, а продукти клітинного метаболізму, у тому числі токсичні сполуки, навпаки, накопичуються, необхідно проводити заміну середовища культивування клітин мінімум раз на тиждень, бажано двічі на тиждень, з інтервалом 3–4 дні. Більшість клітин добре ростуть при рН 7,4, а незначні його коливання можуть спричиняти уповільнення їх росту або загибель. Найчастіше в якості індикатора рН на виробництві до середовища додають феноловий червоний, який надає йому, відповідно, червоного кольору при рН 7,4. Якщо рН знижується, середовище набуває жовтого кольору, якщо підвищується – малинового. При кожній заміні середовища необхідно контролювати стан клітинного моношару та колір середовища.

Матеріали та обладнання:

Ламінарний бокс, стерильні рукавички, етанол 70%, водяна баня, ростове середовище, одноразові піпетки Пастера об'ємом 3 мл, стерильна ємність для зливів старого середовища, культуральний посуд, інвертований мікроскоп.

Хід дослідження:

1. Перевірити наявність у ламінарному боксі стерильних піпеток, пінцетів, штативів, культуральних флаконів, пробірок та іншого необхідного культурального посуду.
2. Простерилізувати бокс, увімкнувши бактерицидну лампу на 40-60 хв.
3. Флакон з культуральним середовищем прогріти до 37°C на водяній бані.

4. Одягти гумові рукавички та обробити їх 70% розчином етилового спирту.

5. У ламінарну шафу внести, попередньо обробивши 70% розчином етилового спирту, флакон з культуральним середовищем і флакон з клітинами, що культивуються. Надалі обробляти 70% розчином етилового спирту будь-який посуд, інвентар, що вноситься до ламінарної шафи.

6. Візуально перевірити колір середовища та оцінити стан клітинного моношару під мікроскопом. Колір середовища повинен бути приблизно таким же, як у нового середовища або трохи жовтіший. Якщо середовище жовте, а клітини відкріпилися від дна флакона – це свідчить про його закислення внаслідок мікробіологічної контамінації або загибелі клітин. Встановити точну причину можна за допомогою мікроскопа. Типова ознака зараження – наявність великої кількості бактерій у середовищі, які під мікроскопом виглядають як чорні рухливі точки. У випадку контамінації грибами під мікроскопом можна побачити довгі ниткоподібні утворення. Заражений флакон рятувати марно і небезпечно, його необхідно вилучити з роботи, піддати автоклавуванню, а потім викинути.

7. Якщо ознак контамінації немає, здійснити заміну середовища. Злити з усіх флаконів старе середовище у підготовлену ємність для зливів, перевернувши флакон шийкою вниз або відібравши середовище піпеткою Пастера. Прикрити флакони кришками.

8. Відкрити ємність зі свіжим стерильним середовищем. Набрати середовище піпеткою Пастера, вилити у флакон, не торкаючись піпеткою країв. Повторити процедуру до отримання необхідного об'єму середовища у культуральному флаконі.

9. Дану процедуру повторити по черзі для всіх флаконів. Після того, як середовище у всіх флаконах змінено, слід закрити ємність із середовищем. Після цього необхідно розмістити флакони в інкубаторі, стежачи, щоб вони стояли горизонтально.

Контрольні питання:

1. Яка мета заміни культурального середовища?
2. Які умови під час культивування клітин потрібно виконувати?
3. Яку функцію виконує барвник-індикатор у складі культурального середовища? Як візуально можна оцінити стан культури?

Практична робота 3. Пересів клітин.

Мета роботи: отримати практичні навички пересіву клітин.

Принцип методу.

Через постійний поділ клітин може виникнути їх надлишок у культурі, що має негативний вплив на клітинний цикл. При цьому ріст і поділ клітин уповільнюються, вони починають старіти та відмирати (контактне інгібування зростання). Також може початися процес клітинного диференціювання.

Пересівання клітин (пасування) - це перенесення невеликої кількості клітин у свіже поживне середовище для подальшого культивування в іншому культуральному посуді.

Матеріали та обладнання:

Ламінарний бокс, центрифуга, інвертований мікроскоп, водяна баня, культуральне середовище DMEM, ФТС, пеніцилін, стрептоміцин, розчин трипсину 0,5% (необхідну кількість сухого трипсину розчинити у фізіологічному розчині), розчин Версена, культуральні флакони, одноразові піпетки Пастера об'ємом 3 мл, автоматичні дозатори, стерильні пробірки об'ємом 15 мл, шпатель для клітин, стерильна ємність для зливу, стерильні рукавички, етанол 70%.

Хід дослідження:

1. Виконати пункти 1-5 Практичної роботи № 2.
2. Відкріпити клітини від поверхні культивування ферментативним методом. Для цього розчин трипсину нагріти до температури 37°C на водяній бані. У стерильній пробірці змішати 0,5% розчин трипсину з розчином Версена у співвідношенні 1:1. Зберігати готовий розчин у холодильнику.

Розчин зберігає свою ферментативну активність протягом принаймні 1 місяця.

3. У ламінарній шафі злегка похитати культуральний флакон для того, щоб загиблі клітини відокремилися від субстрату. Відкривши культуральний флакон, акуратно злити культуральне середовище в склянку для зливу, не торкаючись її країв.

4. Налити у флакон 1 мл суміші розчинів трипсину та Версена та залишити на 5-10 хвилин при температурі 37°C.

5. Під мікроскопом контролювати ступінь дезагрегації клітинного моношару, клітини мають відокремитися одна від одної та від поверхні культивування, набути округлої форми (див. Рисунок 2). Додати у флакон 5 мл середовища з 10% ФТС для інактивації трипсину.

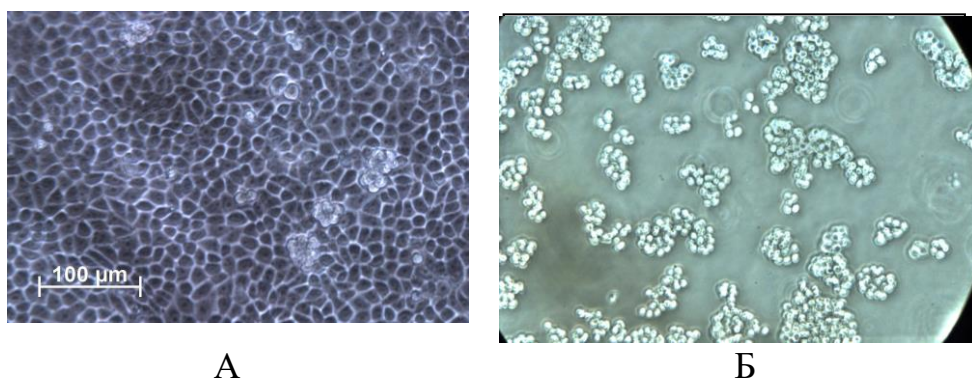


Рисунок 2. Клітинна лінія L929. А - клітинний моношар, який потребує пасування, Б – клітини, дезагREGOVANІ під дією трипсин/Версена.

6. Якщо клітини не відкріплюються, можна скористатися спеціальним пластиковим шпателем, який перед застосуванням потрібно протерти етанолом та ретельно просушити. Знімати клітини потрібно акуратно, трохи натискаючи на шпатель. Оскільки клітини знімаються великими ділянками моношару, їх потрібно дезагРЕГУВАТИ за допомогою піпетки Пастера.

7. Отриману суспензію клітин перенести у центрифужну пробірку та центрифугувати 3 хв при 145 g, далі супернатант злити та ресуспендувати клітини у невеликій кількості ростового середовища (1 мл).

8. Здійснити підрахунок клітин у камері Горяєва та визначити концентрацію клітин в 1 мл клітинної суспензії.

9. Перенести необхідний об'єм клітинної суспензії (залежно від кількості клітин) в нові флакони та додати у кожний необхідну кількість поживного середовища.

Контрольні питання:

1. Яка мета пересіву клітин?
2. Які умови є оптимальними для культивування клітин?
3. Що таке контамінація? Перерахуйте основні джерела контамінації культури клітин?
4. Яка дія розчинів трипсину та Версену на культуру клітин?

Практична робота 4. Кріоконсервування клітинного матеріалу.

Мета роботи: отримати практичні навички кріоконсервування культури клітин.

Принцип методу:

Важливою задачею кріоконсервування клітин є створення оптимальних умов охолодження та нагрівання клітин, за яких досягається їх мінімальне пошкодження.

Важливе значення має процес оптимізації середовища для кріоконсервування, концентрації кріопротектора та режиму охолодження клітин різного походження. Застосування кріопротекторів, як правило, в концентрації від 2 до 10 % від об'єму дозволяє знизити шкідливу дію фізико-хімічних факторів, зокрема, внутрішньоклітинної кристалізації води, «ефекту розчину» та інших. Це забезпечує не тільки вищу життєздатність клітин після відтавання, але й збереження їх морфо-функціональних властивостей. Сироватка крові також має кріопротекторні властивості, тому іноді до середовища для кріоконсервування додають від 10 до 20% сироватки крові тварин.

При кріоконсервуванні клітинної суспензії необхідно забезпечити оптимальну швидкість охолодження, яка може відрізнятися для клітин різного походження. З цією метою використовують програмні заморожувачі.

Після охолодження до певної температури (наприклад, до -40°C або -80°C) ампули з клітинами переносять у рідкий азот для довгострокового зберігання.

Матеріали та обладнання:

Ламінарний бокс, центрифуга, інвертований мікроскоп, кріосховище, пластиковий посуд, кріоконтейнери об'ємом 1,5-2 мл, одноразові піпетки Пастера об'ємом 3 мл, автоматичні дозатори, стерильні рукавички, етанол 70%, культуральне середовище DMEM/F-12 з ФТС та антибіотиками, 0,5% розчин трипсину, розчин Версена.

Правила роботи з рідким азотом

- Рідкий азот - безбарвна рідина питомою вагою 0.8 кг/л, яка кипить при температурі -196°C . При попаданні рідкого азоту на шкіру потрібно забезпечити якнайшвидше його стікання зі шкіри. Перед початком роботи необхідно одягнути спецодяг та інші засоби індивідуального захисту, що оберігають від попадання низькотемпературної рідини на відкриті ділянки шкірних покривів та очі, а також уникати дотику відкритих поверхонь тіла до обладнання та металевих деталей, охолоджених рідким азотом (або його парами).
- Необхідно перевірити стан загального та місцевого освітлення, вентиляції. Приміщення повинні бути обладнані припливно-витяжною вентиляцією, що забезпечує вміст кисню в повітрі не менше ніж 19%.
- Температура рідкого азоту підтримується на належному рівні (-196°C) тільки при його безперервному повільному випаровуванні. Категорично забороняється щільно закривати резервуар з рідким азотом, оскільки його часткове випаровування сприяє утворенню всередині резервуара надлишкового тиску і цим створює небезпеку його пошкодження та викиду рідкого азоту.

Хід дослідження:

1. Виконати пункти 1-5 Практичної роботи № 2.
2. Виконати пункти 2-8 Практичної роботи № 3.
3. Підписати кріоконтейнери маркером, стійким до дії води та низьких температур.
4. Довести отриману клітинну суспензію до необхідного об'єму в залежності від потреб та бажаної концентрації клітин. Дозатором розподілити клітинну суспензію по 0,5 мл на кріоконтейнер.
5. По краплях додати рівний об'єм (0,5 мл) кріозахисного середовища з подвійною концентрацією кріопротектора. Наприклад, для того, щоб досягти кінцевої концентрації ДМСО 5% (або 0.7 М) та сироватки 10%, до 0,5 мл суспензії клітин необхідно додати 0,5 мл середовища з 10% ДМСО та 20% сироватки. Процедуру здійснювати на холоді.
6. Кріоконтейнери помістити в програмний заморожувач та вибрати необхідну програму охолодження. Після закінчення процесу охолодження помістити кріоконтейнери у рідкий азот та перенести до кріобанку.
7. Занести номери кріосховищ, до яких поміщені кріоконтейнери з замороженими клітинами, в лабораторний журнал, вказавши тип культури, джерело, дату заморожування та прізвище співробітника, який виконував процедуру заморожування клітин.

Контрольні питання:

1. В чому полягає принцип кріоконсервування клітинного матеріалу?
2. Навіщо до складу кріозахисного середовища вводиться кріопротектор?
3. Навіщо до складу кріозахисного середовища вводиться ФТС?
4. Чим відрізняються програми заморожування різних клітин та чому?

Практична робота 5. Розморожування та пересів кріоконсервованих клітин.

Мета роботи: отримати практичні навички нагріву клітин, видалення кріопротектора та оцінки збереженості біологічного матеріалу.

Принцип методу:

Для більшості клітин високі швидкості нагрівання сприяють їх кращій збереженості після кріоконсервування. Найбільш прийнятним залишається спосіб швидкого нагрівання кріоконтейнера з клітинами у водяній бані при температурі $+37 \dots +40^{\circ}\text{C}$. Важливо дотримуватись режиму видалення кріопротектора. Додавання свіжого культурального середовища по краплі в середовище з клітинами дозволяє поступово виводити кріопротектори з клітин, що сприяє кращій життєздатності клітин після розморожування.

Матеріали та обладнання

Ламінарний бокс, водяна баня, світловий інвертований мікроскоп, пластиковий посуд, повне культуральне середовище DMEM з ФТС та антибіотиками, одноразові піпетки Пастера об'ємом 3 мл, автоматичні мікропіпетки, камера Горяєва.

Хід дослідження:

1. Кріоконтейнери дістати зі сховища у кріобанку та опустити у водяну баню ($+37 \dots +40^{\circ}\text{C}$) до повного зникнення твердої фази у кріоконтейнерах (приблизно 1-3 хв).

2. Кріопротекторні сполуки необхідно видалити, але слід зауважити, що для деяких протоколів кріоконсервування видалення кріопротекторів не є необхідним. Це залежить від конкретних завдань дослідження.

Якщо потребується видалення кріопротекторів, то вміст кріоконтейнера необхідно перенести стерильною мікропіпеткою у пробірку об'ємом 15 мл. Поступово (протягом 3-5 хв) додати 5 мл культурального середовища та центрифугувати при 1500 об/хв (близько 400 g) протягом 1 хв. Надосад видалити. До осаду додати 5 мл середовища, ресуспендувати та при необхідності повторити попередню процедуру. Наприкінці, осад

ресуспендувати, довести до необхідного об'єму середовищем з ФТС та перенести у флакон для культивування.

Якщо видалення кріопротектора не потрібно, вміст кріопробірки можна перенести стерильною мікропіпеткою в культуральний флакон, заповнений відповідним середовищем із додаванням 20% ФТС.

3. Помістити флакон з суспензією розморожених клітин у CO₂-інкубатор або термостат.

4. Через 4-6 годин за допомогою інвертованого мікроскопа оцінити кількість прикріплених і розпластаних клітин для дослідження їхніх адгезивних характеристик.

5. При задовільних результатах у ламінарній шафі замінити середовище на середовище з 10%-м вмістом ФТС.

6. Перенести культуральний флакон із розмороженими клітинами в CO₂-інкубатор чи термостат для подальшого культивування.

7. За потреби здійснити підрахунок збереженості та/або життєздатності клітин методом забарвлення з трипановим синім. Для цього аліквоту клітинної суспензії змішати з розчином 0,4% трипанового синього у фізіологічному розчині з фосфатним буфером (1:1). У камері Горяєва підрахувати кількість клітин враховуючи розведення та відсоток клітин, що не забарвлені трипановим синім (умовно непошкоджені або живі клітини). Ця додаткова процедура дає змогу порівняти не тільки кількість клітин до кріоконсервування та після кріоконсервування, а також додатково оцінити пошкодженість клітин після процедур їх отримання та кріоконсервування (забарвлені клітини – пошкоджені або нежиттєздатні, незабарвлені – непошкоджені, або життєздатні).

Контрольні питання:

1. Які фактори кріоконсервування є пошкоджуючими для клітин?
2. Як оцінити ефективність кріоконсервування клітин?
3. За яких температур зберігаються заморожені культури?

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Основи кріобіології і кріомедицини. Підр. для студентів-біологів і медиків / [Г. Ф. Жегунов та ін.] ; під ред. проф. Г. Ф. Жегунова і О. А. Нардида ; Харків. гос. зооветеринар. акад. МОН України, Ін-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, ННЦ "Ін-т експеримент. і клін. ветеринар. медицини" НААН України. - Харків : Бровін А. В. [вид.], 2019. - 614 с. : рис., табл. - Бібліогр. в кінці гл. - 150 прим. - ISBN 978-617-7738-35-9.
2. Freshney, R. Ian. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications/ R. Ian Freshney. – 6th ed. – Published by John Wiley & Sons, Inc., 2010. – 732 p.
3. Davis J. M. BasicCellCulture. Practicalapproach. Secondedition. — Oxford: UniversityPress, 2001. — 381 p.
4. Erol OD, Pervin B, Seker ME, Aerts-Kaya F. Effects of storage media, supplements and cryopreservation methods on quality of stem cells. World J Stem Cells. 2021 Sep 26;13(9):1197-1214. doi: 10.4252/wjsc.v13.i9.1197.
5. Taylor MJ, Weegman BP, Baicu SC, Giwa SE. New Approaches to Cryopreservation of Cells, Tissues, and Organs. Transfus Med Hemother. 2019 Jun;46(3):197-215. doi: 10.1159/000499453. Epub 2019 Jun 4.

Петренко О.Ю.
Пахомов О.В.
Божкова Ю.О.
Сидоренко О.С.
Божок Г.А.

**Отримання та кріоконсервування
клітинної культури**

Методичні рекомендації для практичних робіт
аспірантів 1 курсу
галузь знань 09 Біологія
спеціальність 091 Біологія
дисципліна «Загальні проблеми та конкретні підходи до
кріоконсервування клітин і тканин»

Електронний ресурс. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, 2023.