



**БАЛТИЙСКИЙ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ ИММАНУИЛА КАНТА**

**А. Г. Гончаров, В. В. Шуплецова,  
Л. С. Литвинова**

**ПРОТОКОЛЫ ПОЛУЧЕНИЯ,  
ВЕДЕНИЯ И ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР  
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

**Часть 3**

**Калининград  
2025**

БАЛТИЙСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. ИММАНУИЛА КАНТА

А. Г. Гончаров, В. В. Шуплецова,  
Л. С. Литвинова

ПРОТОКОЛЫ ПОЛУЧЕНИЯ,  
ВЕДЕНИЯ И ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР  
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Часть 3

Учебно-методическое пособие

Издательство  
Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта  
2025

УДК 576.36(075.8)

ББК 28.05я73

Г657

*Рецензенты*

*А. С. Симбирцев*, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН,  
научный руководитель ФГУП «Государственный НИИ  
особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;

*М. Б. Раев*, д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией клеточной  
иммунологии и нанобиотехнологии ИЭГМ Уро РАН — филиала ФГБУН  
Пермского федерального исследовательского центра Уро РАН

**Гончаров, А. Г.**

Г657 Протоколы получения, ведения и оценки клеточных культур человека и животных. Часть 3 : учебно-методическое пособие / А. Г. Гончаров, В. В. Шуплецова, Л. С. Литвинова. — Калининград : Издательство БФУ им. И. Канта, 2025. — 68 с.

ISBN 978-5-9971-1020-8

Изложены основные принципы организации работ с клеточными культурами, методологические основы проведения культуральных работ и приведены основные протоколы культуральных работ.

Разработано в соответствии с магистерской программой «Клеточные и молекулярные технологии», учебным планом специалитета «Биоинженерия и биоинформатика» и предназначено для студентов, магистров, аспирантов биологических специальностей, специализирующихся в области клеточных технологий.

УДК 576.36(075.8)

ББК 28.05я73

ISBN 978-5-9971-1020-8

© Гончаров А. Г., Шуплецова В. В.,  
Литвинова Л. С., 2025

© Оформление. БФУ им. И. Канта,  
2025

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	5
<b>Глава 1. Организация работ с клеточными культурами</b> .....	7
1.1. Современные дезинфекционные средства. Дезинфекция в лабораторной диагностике .....	7
1.2. Стандартизация лабораторных исследований .....	14
1.3. Утилизация биоматериалов. Правила и методы утилизации медицинских отходов в Российской Федерации .....	16
<b>Глава 2. Методологические основы проведения культуральных работ</b> .....	26
2.1. Шаблон протокола .....	26
2.2. Методические указания по приготовлению основных растворов и дифференцировочных сред .....	26
2.3. Клеточные культуры для проведения экспериментальных работ .....	29
2.4. Методические указания и протоколы выделения основных видов культур клеток .....	33
2.4.1. Выделение мононуклеарных клеток на градиенте плотности .....	33
2.4.2. Технологии клеточного сортирования: фракционирование лимфоцитов методом иммуномагнитной сепарации, сортировка клеток с активацией флуоресценции, сортировка клеток на основе микрофлюидных технологий .....	35
2.4.3. Выделение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека .....	38
2.4.4. Смена среды при культивировании мультипотентных мезенхимальных клеток жировой ткани человека .....	41
2.4.5. Принципы направленной дифференцировки клеток в условиях <i>in vitro</i> . Способы детекции результатов дифференцировки .....	42

2.4.6. Протокол получения культур из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани с заданным направлением дифференцировки (адипо-, хондро- и остеокультуры) .....	43
2.5. Методические указания и протоколы криоконсервации и размораживания культур клеток.....	46
2.6. Методы тестирования биоматериалов на культурах клеток....	49
2.7. Оценка жизнеспособности культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в тесте с трипановым синим .....	56
2.8. Оценка апоптоза клеточной культуры методом проточной цитометрии .....	58
2.9. Определение иммунофенотипа клеток, полученных из культуры .....	62
2.10. Оценка продукции цитокинов клеточной культурой методом иммуноферментного анализа .....	64
2.11. Оценка влияния ростовых факторов на культуру клеток (на примере лизата тромбоцитов) .....	64
<b>Список рекомендуемой литературы.....</b>	<b>66</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Успехи в области экспериментальной эмбриологии, цитологии, молекулярной генетики и генной инженерии привели к формированию новой области биомедицины — регенеративной медицины, включающей в себя научно обоснованные подходы, методы и технологии сохранения, восстановления и управляемой регенерации тканей и органов, структур и функций. Регенеративная медицина является ярким примером стирания граней между фундаментальными и прикладными исследованиями, взаимодействия различных научных дисциплин. Определяющую роль в данном медицинском направлении играет биологическая база исследований. Технологии клеточной биологии лежат в основе регенеративной медицины, поскольку являются одним из основных инструментов, позволяющих восстанавливать структуру и функции травмированных органов и тканей или пораженных заболеванием. Технологии выделения, ведения и оценки клеточных культур лежат в основе получения биомедицинских клеточных и тканеинженерных продуктов, клеточных систем для доставки терапевтических препаратов, оценки биосовместимости новых биоматериалов.

В настоящем учебном пособии изложены основные принципы организации работ с клеточными культурами, методологические основы проведения культуральных работ и приведены основные протоколы культуральных работ. Сведения, приведенные в пособии, основываются на методических материалах, санитарных правилах, отечественных и международных стандартах, предъявляемых к проведению работ с культурами клеток. В пособии обобщен собственный опыт работы с клеточными культурами и использованы наработки других клеточных лабораторий.

Учебно-методическое пособие подготовлено по итогам выполнения фрагментов работ, реализованных в рамках программы «Приоритет-2030» БФУ им. И. Канта и Государственного задания (FZWM-2024-0012).

## Глава 1

### ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТ С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ

#### 1.1. Современные дезинфекционные средства. Дезинфекция в лабораторной диагностике

Согласно СанПиН 2.1.3.2630-10, которые устанавливают санитарно-эпидемиологические требования к размещению, устройству, оборудованию, содержанию, противоэпидемическому режиму, профилактическим и противоэпидемическим мероприятиям, условиям труда персонала, организации питания пациентов и персонала организаций, осуществляющих медицинскую деятельность, во всех лабораториях нужно соблюдать строгий санитарно-гигиенический режим, проводить дезинфекционные мероприятия. Это связано с необходимостью исключить заражение инфекциями от биоматериала сотрудников, окружающих предметов и препаратов, а также обеспечить чистоту и точность исследований.

#### *Антисептики и дезинфицирующие вещества.*

Антисептики и дезинфицирующие вещества относятся к противомикробным средствам, лишенным избирательности противомикробного действия (активны в отношении большинства микроорганизмов, простейших и грибов и не вызывают развития резистентности). Дезинфицирующие средства используются для борьбы с возбудителями, находящимися во внешней среде (обработка помещений, воды, инструментов, белья и т. д.).

Антисептики используются для уничтожения возбудителей, находящихся на поверхности тканей человека. Их наносят на кожу и слизистые (в том числе желудочно-кишечного тракта и

мочевыводящих путей), в стоматологии применяют для обработки патологических зубодесневых карманов при парадонтозе, корневых каналов и полостей зуба.

Механизм действия большинства антисептиков и дезинфицирующих средств связан с их способностью денатурировать белки (структурные и ферментативные) и оказывать таким образом бактерицидное действие. В связи с отсутствием избирательности антисептики и дезинфицирующие средства обладают органотропностью в отношении макроорганизма).

***Характеристика отдельных групп дезинфицирующих веществ:***

I. *Галоидосодержащие соединения (производные хлора, йода и др.)*. Антисептики этой группы обладают выраженным бактерицидным, спороцидным, фунгицидным и дезодорирующим действием. Наиболее активны препараты, содержащие элементарные галогены или освобождающие их (раствор хлорной извести, хлорамин Б, раствор йода спиртовый, раствор Люголя, йодиол, йодокам, йодоформ, пантоцид).

II. *Окислители (калия перманганат, раствор перекиси водорода, гидроперит)*. Принцип действия препаратов этой группы заключается в освобождении кислорода и окислении органических компонентов протоплазмы микроорганизмов. Оказывают дезодорирующее действие. Раствор перекиси водорода способствует механическому очищению раны и остановке кровотечений.

III. *Антисептики группы фенола (фенол чистый, резорцин, трикрезол, ферозол, резорцин, бензонафтол, ваготил)*. Фенол оказывает бактерицидное, спороцидное и фунгицидное действие. Раздражает ткани, легко всасывается с места нанесения, токсичен. Как антисептик применяется в стоматологии при обработке корневых каналов и некротизации пульпы зуба. Ваготил оказывает местное бактерицидное и трихомонацидное действие. Резорцин как антисептик уступает фенолу. В малых концентрациях оказывает кератопластическое, а в больших — кератолитическое и прижигающее действие. К группе фенола

относится также эвгенол (аллилгваякол), являющийся главной составной частью гвоздичного масла и оказывающий дезинфицирующее и местноанестезирующее действие.

*IV. Антисептики алифатического ряда из группы спиртов и альдегидов (раствор формальдегида, гексаметилентетрамин (метенамин), спирт этиловый, бета-1-лизоформ, циминаль).* Препараты формальдегида обладают противомикробным, спороцидным, дезодорирующим, дегидратирующим и мумифицирующими свойствами. Применяются для обработки кожи при потливости, в стоматологии — для некротизации и мумификации пульпы зуба. Противомикробная активность этилового спирта повышается с увеличением его концентрации. На споры он не влияет. Гексаметилентетрамин применяют как антисептик при инфекциях мочевых путей (способность препарата разлагаться в кислой среде с образованием формальдегида). Входит в состав таблеток «Уросал», «Уробесал», «Кальцекс». Лизоформ (смесь формалина и калийного мыла в спирту) применяется для спринцеваний в гинекологии. Циминаль местно подавляет грамположительную и грамотрицательную флору, способствует заживлению и эпителизации ран.

*V. Соединения тяжелых металлов (цинка окись, серебра нитрат, меди сульфат, ртути дихлорид, ртути амидохлорид, ртути монохлорид, протаргол, колларгол, цинка сульфат, цинка окись, пластырь свинцовый — простой и сложный).* Кроме антибактериального эффекта, антисептики этой группы оказывают выраженное местное действие. Из препаратов ртути используют ртути дихлорид как дезинфицирующее средство (водным раствором обрабатывают помещения, посуду, перчатки, неметаллические предметы), ртути амидохлорид — как антисептик в виде мазей при инфекциях кожи и глаз. При применении ртути содержащих препаратов следует помнить об их токсичности. Препараты цинка обладают вяжущим, антисептическим, подсушивающим действием. Препараты свинца применяют местно при гнойно-воспалительных заболеваниях кожи. Препараты меди — при отравлениях белым фосфором, ожогах кожи фосфором (образуют нерастворимые соединения), конъюнктивитах и уретритах.

VI. *Красители (бриллиантовая зелень, метиленовый синий, этакридина лактат)*. Бриллиантовый зеленый и метиленовый синий — высокоактивные и относительно быстродействующие антисептики, применяющиеся при пиодермиях. Этакридина лактат не раздражает ткани, малотоксичен, не теряет антибактериальной активности в присутствии белка и тканевых жидкостей, действует постепенно. Раствор метиленового синего вводят в вену при отравлении цианидами, окисью углерода и сероводородом («Хромосмон»).

VII. *Детергенты (церигель, роккал, дегмицид, этоний)*. Эти катионные мыла обладают мощным антибактериальным и фунгицидным действием, которое снижается в присутствии органических веществ и при сочетании с анионными мылами. Применяются для обработки рук хирурга, стерилизации инструментов и аппаратуры. Дегмицид обладает выраженными дезинфицирующими свойствами, применяется для обработки рук хирурга.

VIII. *Бигуаниды (хлоргексидин)*. Обладают выраженным антибактериальным и фунгицидным действием. Применяют 0,1—1%-ные водные и спиртовые растворы для обработки рук хирурга, операционного поля, ран, а также для стерилизации инструментов.

IX. *Кислоты и щелочи (кислота борная, кислота надуксусная, раствор аммиака)*. 2—4%-ный раствор борной кислоты назначают для промывания слизистых оболочек, полоскания полости рта, входит в состав мазей и присыпок (противомикробная активность ее достаточно низкая). Кислота надуксусная (0,5%-ный раствор) — очень сильный антисептик, обладает спороцидным действием и не нуждается в последующей нейтрализации. Нашатырный спирт содержит 9,5—10,5 % аммиака. Его 0,5%-ный раствор применяют для обработки рук хирурга.

X. *Производные нитрофурана — фурацилин (нитрофуран)*. Препараты этой группы нарушают эндогенное дыхание и синтез белка в бактериальной клетке. Их применяют для полоскания слизистой оболочки полости рта, промывания ран, серозных и суставных полостей. Иногда могут вызывать сенсibilизацию и дерматит.

XI. *Другие препараты*. Дегти (деготь березовый, линимент бальзамический по А. В. Вишневскому) обладают антисепти-

ческими свойствами и ускоряют процессы регенерации. Ихтиол — производное сланцевого масла — оказывает противовоспалительное, антисептическое и обезболивающее действие. Применяется наружно. Широко используются также производные нефти: нефть нафталанская рафинированная (мазь нафталанная и др.), парафин твердый, озокерит. Нефть нафталанная обладает смягчающим, рассасывающим и дезинфицирующим действием. Применяется местно. Парафин и озокерит обладают высокой теплопроводностью и применяются в виде компрессов для тепловых процедур. Препараты серы (сера осажденная, сульсен) обладают противомикробным и противопаразитарным действием (чесотка). Винилин (бальзам Шостаковского) и винизоль применяют для очищения, регенерации и эпителизации ран. Кроме того, используются различные препараты природного происхождения: хлорофиллипт, экстеридид, лизоцим, полифенан, настойка чеснока, настойка софоры японской и др.

#### ***Особенности дезинфицирующих препаратов нового поколения.***

Дезинфектанты нового поколения — это смесь нескольких активных веществ в сбалансированной пропорции. Их применение дает возможность получить максимальный эффект в отношении практически всех устойчивых, вредных и опасных микроорганизмов. Допускается многократное использование некоторых из них. Такие дезинфекторы характеризуются полной безопасностью для людей, высокой бактерицидностью и эффективностью. Некоторые из них допускается использовать в домах в качестве очищающих средств — они отличаются низкой токсичностью.

***Достоинства дезсредств нового поколения.*** Современные дезинфицирующие средства имеют ряд преимуществ: активность в отношении большинства опасных микроорганизмов; широкий спектр действия; экономичность — средства могут храниться продолжительное время и использоваться многократно; низкая токсичность или ее полное отсутствие — их применение не опасно для людей и домашних животных; отсутствие взрыво- и пожароопасности; удобство в использовании и хранении; сохранность обработанных материалов и поверхностей;

параллельно они обладают моющими и дезодорирующими качествами. Все это делает дезинфектанты нового поколения одним из самых эффективных способов борьбы с заражением и профилактики инфекционных заболеваний. Они представляют собой действенные средства против опасных инфекций.

***Антисептики для рук последнего поколения.*** Дезсредства для обработки рук выпускаются в виде геля, спрея или салфеток. Не рекомендуется для этих целей выбирать спиртосодержащие средства — кожа рук достаточно чувствительна и плохо реагирует на агрессивное воздействие спирта. Необходимо обращать внимание на форму выпуска и хранения средств. Частое их использование может негативно сказаться на водно-жировом балансе кожи, когда кроме вредных микроорганизмов уничтожается и полезная микрофлора.

***Регулярная уборка и дезинфекция поверхностей.*** Текущая влажная уборка в лаборатории проводится ежедневно в конце рабочей смены. Персонал надевает специальную одежду, защитные перчатки и маску, наводит рабочий раствор дезсредства, протирает стены на высоту до 1,5 м, подоконники, ручки дверей, раковины, рабочие поверхности влажными тряпками с моюще-дезинфицирующим раствором (можно использовать «Проклин Универсал плюс», «Септолит Лайт»). Затем моет и дезинфицирует пол и кварцует помещение бактерицидными лампами. Генеральная уборка проводится один раз в неделю. Отмывают (например, средством «Проклин Стриппер») и обрабатывают дезинфектантами все поверхности: мебель, двери, окна, радиаторы, оборудование, стены, пол. После этого также обеззараживают воздух кварцеванием и проветривают помещение. В специальных журналах ведется учет уборок, использования дезсредств и бактерицидных ламп. Уборочный инвентарь обрабатывают дезраствором путем замачивания, промывают водой и высушивают. Хранят его в специальном помещении.

### ***Дезинфицирующие средства для лабораторий.***

Современные дезинфектанты, которые используются в лечено-профилактических учреждениях (ЛПУ), а также в клинико-диагностических лабораториях, должны быть широкого

спектра действия; безопасными для персонала и материалов обрабатываемых поверхностей; хорошо растворимыми в воде; с мощными свойствами; экономичными; разрешенными санитарными службами.

***Санитарно-эпидемиологический режим в клинко-диагностической лаборатории.***

Объектами дезинфекции в лаборатории являются:

- 1) руки и открытые участки кожи медперсонала;
- 2) лабораторная посуда и инструментарий;
- 3) поверхности мебели и лабораторного оборудования;
- 4) поверхности помещения;
- 5) биологический материал и твердые отходы.

***Дезинфекция лабораторной посуды и инструментов.***

Все лабораторные инструменты (иглы, шпатели и пр.) и лабораторная посуда (предметные стекла, пипетки, пробирки и пр.) после использования подвергаются дезинфекционной обработке. Лабораторную посуду и инструменты дезинфицируют путем погружения в дезраствор. По окончании времени экспозиции проводят предстерилизационную очистку путем очищения инструментов и посуды в растворе дезсредства с помощью щеточек. После этого изделия промывают проточной водой, просушивают. В завершение лабораторные изделия отправляют на стерилизацию паровым или воздушным методом. Одноразовый инструментарий обеззараживают в растворе дезинфицирующего средства, а затем утилизируют.

***Дезинфекция биологических материалов.***

Отобранный биологический материал (кровь, моча, кал, мокрота) после проведения исследования подлежит дезинфекции. Для обеззараживания биоматериалов необходимо использовать хлорсодержащие дезинфицирующие средства, например «Септолит ДХЦ», рабочий раствор которого готовят путем растворения хлорных таблеток в воде. Находящиеся в емкостях кал, рвотные массы, мочу заливают раствором «Септолит ДХЦ» в соотношении 1:2. После окончания экспозиции выделения утилизируют. По такому же принципу в отдельных емкостях дезинфицируют и кровь. Емкости, используемые под

выделения, также необходимо дезинфицировать путем погружения их в дезраствор. После дезобработки емкости ополаскивают водой.

### ***Дезинфекция мебели и оборудования.***

Рабочие столы и оборудование в конце смены обязательно протирают ветошью, смоченной дезсредством. Для дезинфекции мебели и медоборудования рекомендуется использовать следующие современные средства дезинфекции: 1) дезсредство с моющими свойствами «Септолит Лайт»; 2) концентрированное средство с моющими свойствами «Септолит Плюс»; 3) хлорсодержащее дезсредство «Септолит ДХЦ». При разлитии крови на стол необходимо моментально обработать его поверхность хлорсодержащим дезсредством, например «Септолит ДХЦ». Для этого пролившуюся кровь промокают ветошью, смоченной в дезрастворе. Использованную ветошь погружают в емкость с дезсредством. Затем поверхность вытирают чистой ветошью, смоченной в дезсредстве. Также медперсонал лаборатории должен четко знать, как нужно действовать в случае возникновения аварийных ситуаций. Так, в ситуации с разрушением пробирок с материалами во время центрифугирования к осуществлению аварийных мероприятий приступают спустя 40 мин, когда аэрозоль полностью осядет на поверхность оборудования. В гнездо ротора центрифуги на один час заливают раствор дезсредства, после чего содержимое гнезда переливают в сосуд с дезсредством. Затем центрифугу полностью протирают ветошью, смоченной в растворе дезсредства.

## **1.2. Стандартизация лабораторных исследований**

Основным документом, регулирующим стандартизацию лабораторных исследований, является федеральный закон «О техническом регулировании» (2002); Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53022.2-200 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специ-

фичность)» (утв. и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии 18 декабря 2008 г. № 555-ст). Положения, изложенные в этом законе, устанавливают единые требования при оценке правильности, прецизионности, чувствительности, специфичности клинических лабораторных исследований, выполняемых в клиничко-диагностических лабораториях медицинских организаций. Также следует руководствоваться принципами лабораторной практики, изложенными в Межгосударственном стандарте ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», призванном гармонизировать отечественные нормы и правила с международными правилами и стандартами.

***Стандартные операционные процедуры.*** Лаборатория должна иметь письменно оформленные стандартные операционные процедуры, утвержденные руководством лаборатории, которые предназначены для обеспечения качества и достоверности данных, полученных лабораторией в ходе проведения исследований. Внесение изменений в стандартные операционные процедуры должно быть одобрено руководством лаборатории.

В каждом отдельном подразделении или участке лаборатории должна быть копия действующих стандартных операционных процедур, имеющих отношение к видам деятельности, осуществляющимся в лаборатории. В качестве дополнительных материалов к этим стандартным операционным процедурам можно использовать опубликованные учебники, аналитические методы, статьи и руководства.

Отклонения от стандартных операционных процедур, имеющих отношение к исследованию, должны быть документально оформлены, утверждены руководителем исследования и ведущим(-и) исследователем(-ями) в установленном порядке.

Стандартные операционные процедуры должны быть разработаны для основных видов деятельности в лаборатории. Перечень видов стандартных операционных процедур разрабатывается индивидуально в каждой лаборатории.

### **1.3. Утилизация биоматериалов. Правила и методы утилизации медицинских отходов в Российской Федерации**

Одна из проблем медицины — утилизация медицинских отходов. Устаревшее оборудование и инструменты с истекшим сроком годности подлежат утилизации. За время эксплуатации на аппаратах и инструментах скапливаются бактерии. Использованное оборудование — возможный источник распространения инфекции. Выбрасывать медицинские отходы в обычном порядке недопустимо. Ликвидация медицинского оборудования происходит под контролем государственных органов по принятой и утвержденной схеме. Правовое регулирование утилизации биомедицинских отходов закреплено в ряде нормативно-правовых актов: ст. 49 федерального закона от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан Российской Федерации» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2011, № 48, ст. 6724; 2013, № 48, ст. 6165; 2018, № 32, ст. 5116); постановление Правительства Российской Федерации от 04.07.2012 г. № 681 «Об утверждении критериев разделения медицинских отходов на классы по степени их эпидемиологической, токсикологической, радиационной опасности, а также негативного воздействия на среду обитания» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2012, № 28, ст. 3911) СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» (с изм. от на 26.06.2021 г.). До последнего времени обращение с медицинскими отходами регламентировалось санитарными правилами и нормами № 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 г. «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». В соответствии с санитарными правилами и нормами медицинские отходы в зависимости от степени их эпидемиологи-

ческой, токсикологической и радиационной опасности, а также негативного воздействия на среду обитания подразделяются на пять классов опасности.

**Класс А** — эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам (далее — ТБО). Отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными. Пищевые отходы всех подразделений организации, осуществляющей медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, кроме инфекционных, в том числе фтизиатрических.

**Класс Б** — эпидемиологически опасные отходы. Инфицированные и потенциально инфицированные отходы. Материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями. Патологоанатомические отходы. Органические операционные отходы (органы, ткани и т. д.). Пищевые отходы из инфекционных отделений. Отходы из микробиологических, клинико-диагностических лабораторий, фармацевтических, иммунобиологических производств, работающих с микроорганизмами 3—4-й групп патогенности. Биологические отходы вивариев (здание или отдельное помещение для содержания (иногда и разведения) лабораторных животных). Живые вакцины, непригодные к использованию.

**Класс В** — чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы. Материалы, контактировавшие с больными инфекционными болезнями. Отходы лабораторий, фармацевтических и иммунобиологических производств, работающих с микроорганизмами 1—2-й групп патогенности. Отходы лечебно-диагностических подразделений фтизиатрических стационаров (диспансеров), отходы микробиологических лабораторий, осуществляющих работы с возбудителями туберкулеза.

**Класс Г** — токсикологически опасные отходы 1—4-го классов опасности. Лекарственные (в том числе цитостатики), диагностические, дезинфицирующие средства, не подлежащие использованию. Ртутьсодержащие предметы, приборы и оборудование. Отходы сырья и продукции фармацевтических производств. Отходы от эксплуатации оборудования, транспорта, систем освещения и др.

**Класс Д** — радиоактивные отходы. Все виды отходов, в любом агрегатном состоянии, в которых содержание радионуклидов превышает допустимые уровни, установленные нормами радиационной безопасности. К отходам, в зависимости от их класса, предъявляются различные требования по сбору, временному хранению и транспортированию. Система сбора, временного хранения и транспортирования медицинских отходов должна включать следующие этапы:

- сбор отходов внутри организаций, осуществляющих медицинскую и/или фармацевтическую деятельность;
- перемещение отходов из подразделений и временное хранение отходов на территории организации, образующей отходы;
- обеззараживание / обезвреживание;
- транспортирование отходов с территории организации, образующей отходы;
- захоронение или уничтожение медицинских отходов.

Сбор отходов класса А осуществляется в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного. Одноразовые пакеты располагают на специальных тележках или внутри многоразовых контейнеров. Емкости для сбора отходов и тележки должны быть промаркированы «Отходы. Класс А». Заполненные многоразовые емкости или одноразовые пакеты доставляют с использованием средств малой механизации и перегружают в маркированные контейнеры, предназначенные для сбора отходов данного класса, установленные на специальной площадке (помещении). Многоразовая тара после опорожнения подлежит мытью и дезинфекции. Транспортирование отходов класса А организуют с учетом схемы санитарной очистки, принятой для данной территории, в соответствии с требованиями санитарного законодательства к содержанию территорий населенных мест и обращению с отходами производства и потребления.

Для организаций, осуществляющих медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, имеющих выпуск хозяйственно-бытовых сточных вод в общегородскую систему канализации, предпочтительной системой удаления отходов пище-

вого сырья и готовой пищи от пищеблоков и буфетов является сброс пищевых отходов в систему городской канализации путем оснащения внутренней канализации измельчителями пищевых отходов (диспоузерами).

Временное хранение пищевых отходов при отсутствии специально выделенного холодильного оборудования допускается не более 24 ч.

Крупногабаритные отходы класса А собирают в специальные бункеры для крупногабаритных отходов. Поверхности и агрегаты крупногабаритных отходов, имевшие контакт с инфицированным материалом или больными, подвергают обязательной дезинфекции перед их помещением в накопительный бункер.

Отходы класса Б собирают в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или имеющие желтую маркировку.

Для сбора острых отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокальваемые влагостойкие емкости (контейнеры). Емкость должна иметь плотно прилегающую крышку, исключаящую возможность самопроизвольного вскрытия.

Для сбора органических, жидких отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокальваемые влагостойкие емкости с крышкой (контейнеры), обеспечивающей их герметизацию и исключаящей возможность самопроизвольного вскрытия.

Мягкая упаковка (одноразовые пакеты) для сбора отходов класса Б должна быть закреплена на специальных стойках-те-лежках или контейнерах.

После заполнения пакета не более чем на  $\frac{3}{4}$  сотрудник, ответственный за сбор отходов в данном медицинском подразделении, завязывает или закрывает пакет с использованием бирок-стяжек или других приспособлений, исключаящих высыпание отходов класса Б. Твердые (непрокальваемые) емкости закрывает крышками. Перемещение отходов класса Б за пределами подразделения в открытых емкостях не допускается.

При окончательной упаковке отходов класса Б для удаления их из подразделения (организации) одноразовые емкости (па-

кеты, баки) маркируют надписью «Отходы. Класс Б» с нанесением названия организации, подразделения, даты и фамилии ответственного за сбор отходов лица.

Медицинские отходы класса Б из подразделений в закрытых одноразовых емкостях (пакетах) помещают в контейнеры и затем их перемещают на участок по обращению с отходами или помещение для временного хранения медицинских отходов, до последующего вывоза транспортом специализированных организаций к месту обеззараживания / обездвреживания. Доступ посторонних лиц в помещения временного хранения медицинских отходов запрещается.

Патологоанатомические и органические операционные отходы класса Б (органы, ткани и т. д.) подлежат кремации (сжиганию) или захоронению на кладбищах в специальных могилах на специально отведенном участке в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации. Обеззараживание таких отходов не требуется.

Работа по обращению с медицинскими отходами класса В организуется в соответствии с требованиями к работе с возбудителями 1—2-й групп патогенности, к санитарной охране территории и профилактике туберкулеза.

Отходы класса В подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) физическими методами (термические, микроволновые, радиационные и др.). Применение химических методов дезинфекции допускается только для обеззараживания пищевых отходов и выделений больных. Вывоз необеззараженных отходов класса В за пределы территории организации не допускается.

Отходы класса В собирают в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) красного цвета или имеющую красную маркировку. Жидкие биологические отходы, использованные одноразовые колющие (режущие) инструменты и другие изделия медицинского назначения помещают в твердую (непрокальваемую) влагостойкую герметичную упаковку (контейнеры).

Мягкая упаковка (одноразовые пакеты) для сбора отходов класса В должна быть закреплена на специальных стойках (тележках) или контейнерах.

После заполнения пакета не более чем на  $\frac{3}{4}$  сотрудник, ответственный за сбор отходов в данном медицинском подразделении, завязывает или закрывает пакет с использованием бирок-стяжек или других приспособлений, исключающих высыпание отходов класса В.

Твердые (непрокальваемые) емкости закрывают крышками. Перемещение отходов класса В за пределами подразделения в открытых емкостях не допускается.

При окончательной упаковке отходов класса В для удаления их из подразделения одноразовые емкости (пакеты, баки) маркируют надписью «Отходы. Класс В» с нанесением названия организации, подразделения, даты и фамилии ответственного за сбор отходов лица.

Медицинские отходы класса В в закрытых одноразовых емкостях помещают в специальные контейнеры и хранят в помещении для временного хранения медицинских отходов.

Использованные ртутьсодержащие приборы, лампы (люминесцентные и др.), оборудование, относящиеся к медицинским отходам класса Г, собирают в маркированные емкости с плотно прилегающими крышками любого цвета (кроме желтого и красного) и хранят в специально выделенных помещениях.

Сбор, временное хранение отходов цитостатиков и генотоксических препаратов и всех видов отходов, образующихся в результате приготовления их растворов (флаконы, ампулы и др.), относящихся к медицинским отходам класса Г, без дезактивации запрещается. Отходы подлежат немедленной дезактивации на месте образования с применением специальных средств.

Лекарственные, диагностические, дезинфицирующие средства, не подлежащие использованию, собирают в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного).

Сбор и временное хранение отходов класса Г осуществляется в маркированные емкости «Отходы. Класс Г». Вывоз этих отходов для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности.

Сбор, хранение, удаление отходов класса Д осуществляется в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации к обращению с радиоактивными веществами и другими источниками ионизирующих излучений, нормами радиационной безопасности.

Вывоз и обезвреживание отходов класса Д осуществляется специализированными организациями по обращению с радиоактивными отходами, имеющими лицензию на данный вид деятельности.

Смешение отходов различных классов в общей емкости недопустимо.

### ***Способы обработки медицинских отходов.***

*Химическая дезинфекция* чаще всего производится с использованием хлорсодержащих веществ; часто сочетается с механическими процессами, например измельчения или растворения, чтобы обеспечить полное проникновение химических веществ.

*Сжигание с использованием инсинераторов.* Инсинерация — это контролируемый процесс сжигания медицинских отходов в специальной печи (инсинераторе). Отходы, предназначенные для сжигания в инсинераторе, можно не сортировать, так как все отходы подвергаются полному уничтожению.

*Стерилизация водяным паром под давлением и при температуре более 100 °С с использованием автоклавов.* Медицинские отходы, подвергшиеся дезинфекции в автоклаве, необходимо дополнительно обработать — спрессовать, измельчить или раздробить так, чтобы отходы были неидентифицируемы и не могли быть повторно использованы в других целях. После стерилизации и уплотнения медицинские отходы могут быть объединены с бытовыми отходами для утилизации на общей свалке.

*Использование микроволн* для дезинфекции медицинских отходов одно из недавних новшеств в этой области. Микроволновая обработка может быть осуществлена как стационарно, так и на передвижных объектах. Для этого типа дезинфекции отходы обычно предварительно измельчают, затем смешивают с водой и подвергают микроволновому излучению. Тепло и пар, образующиеся в ходе обработки, обеспечивают их равномерный

нагрев и эффективно нейтрализуют все биологические препараты. Измельчение уменьшает объем отходов до 80 %, при этом они могут быть утилизированы на обычной свалке.

Альтернативный метод стерилизации медицинского оборудования, материалов и медицинских отходов — стерилизация с помощью ионизирующего, радиоактивного или инфракрасного излучения. Стерилизационный эффект ионизирующего излучения является результатом воздействия на обменные процессы клетки, тогда как радиоактивное и инфракрасное излучение, высокочастотные колебания оказывают свое бактерицидное действие с помощью тепла, развиваемого в обрабатываемом предмете. Однако не все медицинские отходы можно подвергнуть стерилизации этим способом (некоторые микроорганизмы радиостойчивы). Риск облучения персонала, хотя и минимальный, также является недостатком этого способа.

#### ***Обеззараживание и утилизация отходов медицинских лабораторий.***

Отходы, образующиеся в медицинских лабораториях, требуют проведения процедур обеззараживания и утилизации. Емкости и инструменты, загрязненные биожидкостями, согласно санитарным нормам, необходимо обрабатывать. Обеззараживание проводится физическими и химическими методами. На предметы воздействуют паром под давлением, высокой температурой, излучением. Наиболее часто в практике клеточной лаборатории необходимо утилизировать одноразовые шприцы, иглы, системы для взятия крови, пробирки, флаконы, планшеты.

#### ***Методы обеззараживания пробирок.***

После окончания исследований изделия подвергают физическому воздействию. Согласно СанПиН, перед утилизацией вакуумных пробирок с кровью производят автоклавирование — воздействие паром под высоким давлением при температуре 1210 °С и давлении 1,2 атмосфер. Емкости, содержащие кровь, собирают в контейнеры или пакеты, предотвращающие вытекание, и помещают в автоклав. После процедуры отходы относятся к группе опасности «Б». Их помещают в место для временного хранения с последующим вывозом и утилизацией. Работать с

автоклавом могут сотрудники, прошедшие обучение правилам эксплуатации оборудования. Если нет возможности применения автоклавирования, пробирки с кровью перед утилизацией подвергают воздействию СВЧ-поля. Специальные установки воздействуют на потенциально опасные лабораторные отходы в условиях влажной среды. Оборудование оснащено системой очистки воды перед выводом в канализацию. В результате достигают эффекта дезинфекции. Предметы используют однократно, повторное использование запрещено.

### ***Дезинфекция шприцев и игл однократного применения.***

Шприцы для медицинских манипуляций после использования подлежат дезинфекции. Для процедуры необходимы емкости для обеззараживания игл и шприцев. Тара должна быть непрокальваемой, с оснащением иглосъемником. В процессе дезинфекции игл одноразового использования применяют средства, эффективно воздействующие на возбудителей инфекций.

#### *Алгоритм дезинфекции шприцев и игл:*

1. Емкости для обеззараживания шприцев и игл на  $\frac{2}{3}$  заполняют средством для дезинфекции.
2. После инъекции иглы не накрывают колпачком, производят раздельное обеззараживание иглы и шприца.
3. В шприц набирают дезинфицирующий раствор.
4. Иглу отсоединяют иглосъемником, отсечением иглоотсекателем или деструктором и помещают в емкость с дезраствором. Корпус шприца помещают в тару для обеззараживания.
5. Проводят дезинфекцию в соответствии с инструкцией с соблюдением экспозиционной выдержки.
6. Из сосуда для обеззараживания игл, который на  $\frac{3}{4}$  наполнен иглами, сливают раствор и закрывают крышкой. Емкость помещают в контейнер, промаркированный как опасные отходы «Б» класса.
7. В таре, где обрабатывались шприцы, поднимают поддон и выпускают раствор посредством поршня. Предметы упаковывают в пакет и выполняют маркировку как опасных отходов «Б» класса.
8. Мини-контейнеры с пакетами шприцев и игл хранят в специальном помещении до конца рабочей смены.

9. Транспортируют до места утилизации.

***Утилизация вакуумных систем для взятия крови.***

Современные приспособления для взятия крови — высокотехнологичные изделия, включающие вакуумную пробирку, держатель и иглы. Продукция изготавливается из специальных материалов, содержит вещества для стабилизации проб и пробоподготовки.

Использование в медицинской практике новых систем улучшило качество результатов исследований, повысило безопасность работы персонала. Благодаря универсальности продукции она получила широкое распространение в лабораторной практике.

Одним из преимуществ применения вакуумных систем является экономия на дезсредствах. Предметы не требуются дезинфицировать, после использования они относятся к категории отходов «Б» класса опасности. Вакуумные системы подвергают процедуре обеззараживания и утилизации в соответствии с нормами и правилами. Согласно нормативам, системы для забора крови утилизируют аналогично одноразовым шприцам. Медперсоналу, занимающемуся сбором, обеззараживанием, хранением и транспортировкой медицинских отходов запрещено:

- собирать отходы без резиновых перчаток и санитарной одежды;
- пересыпать детали вакуумных систем из одной тары в другую;
- оставлять контейнер рядом с электронагревательными устройствами;
- выполнять утилизацию отходов руками.

Для сбора опасных отходов используют специальные контейнеры, баки или пакеты, которые должны отвечать требованиям и иметь свидетельство о государственной регистрации.

## Глава 2

### МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОВЕДЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ РАБОТ

#### 2.1. Шаблон протокола

При подготовке экспериментов с использованием клеточных культур рекомендуется предварительно составить план и список расходных материалов предстоящей работы, включающий название работы, описание источника биологического материала (объекта), перечень выполняемых работ, рекомендуемую прединкубацию, список реактивов, расходных материалов и оборудования.

#### 2.2. Методические указания по приготовлению основных растворов и дифференцировочных сред

В любой лабораторной практике, в том числе и лабораториях клеточной биологии, самостоятельно готовят растворы, в состав которых входят два или более компонентов. В качестве растворителя чаще всего используется вода, реже — органические растворители. Главной характеристикой раствора является количество вещества, содержащегося в определенном количестве раствора. Как правило, в лабораторной практике необходимо, чтобы в растворе имелось строго заданное количество вещества. Как правило, в лаборатории в основном пользуются тремя видами растворов: приблизительные, молярные и реже точные растворы.

*Приблизительные растворы* — это растворы, концентрация которых выражается в процентах (массовых или объем-

ных). Обычно это растворы, не требующие высокой точности определения концентрации, предназначенные, например, для простых лабораторных опытов или применения в повседневной жизни. Один из способов выражения количества вещества в таких растворах — задание *массовой доли растворенного вещества*. Массовая доля растворенного вещества — это отношение массы растворенного вещества  $m_1$  к общей массе раствора  $m$ , выраженное в процентах. Массовую долю растворенного вещества называют также *процентной концентрацией* раствора.

$$w = \frac{m_1}{m} \cdot 100 \%$$

Пример. Приготовить 25%-ный раствор желатина. Это означает, что в 100 г такого *раствора* содержится 25 г желатина. Здесь выделено слово «раствора». Действительно, если взвесить 25 г желатина и просто растворить в 100 г воды, то нужный раствор не получится. Необходимо взвесить на весах 25 г сухого желатина и отмерить мензуркой 75 мл воды (либо взвесить на весах 75 г воды, что одно и то же). Затем желатин надо высыпать в воду и перемешать до полного растворения. Получится 100 г раствора (25+75=100 г), в котором массовая доля желатина составляет точно 25 %.

$$w = \frac{25}{100} \cdot 100 \% = 25 \%$$

**Молярные растворы** — это растворы, содержащие в 1 л одну грамм-молекулу или 1 моль растворенного вещества. Например, одномолярные (1 М) растворы содержат 1 граммоль вещества в 1 дм<sup>3</sup> раствора, двумолярные (2 М) — 2 граммоль в 1 дм<sup>3</sup> и т. д. Молярная концентрация  $C$  — это отношение количества растворенного вещества  $\nu$  (в молях) к объему раствора  $V$  в литрах.

$$C = \frac{\nu \text{ МОЛЬ}}{V \text{ Л}}$$

Единица молярной концентрации — моль/л. Зная число молей вещества в 1 л раствора, легко отмерить нужное количество молей для реакции с помощью подходящей мерной посуды.

Чтобы приготовить молярный раствор, необходимо определить вес формулы используемого соединения. Обычно он указан на боковой стороне флакона с химическим веществом в г/моль. Если не удастся найти вес формулы на флаконе, можно посмотреть соединение в Интернете. Например, молекулярный вес NaCl составляет  $23 + 35,5 = 58,5$  г/моль. Затем определить объем раствора в литрах. В зависимости от его назначения может потребоваться сделать больше или меньше литра раствора. Рассчитать количество граммов, необходимое для приготовления молярного раствора, используя формулу: количество граммов = (желаемый объем) × (желаемая молярность) × (формула веса). Желаемый объем должен быть в литрах, молярность — в молях на литр, а молекулярная масса вещества — в граммах на моль. Взвесить необходимую массу вещества на правильно откалиброванных весах. Развести NaCl в соответствующем объеме жидкости. Большинство растворов разбавляется водой, если не указано иное. Объем используемой жидкости такой же, какой использовался для расчета.

**Точные растворы** — это растворы с точной, заранее установленной концентрацией, которые служат для определения точной концентрации других растворов. Концентрацию точных растворов выражают в виде молярной, или нормальной концентрации, или титром. Для приготовления точных растворов используют дистиллированную или деионизированную воду. Навеску сухого вещества отвешивают на аналитических весах с точностью до 0,0001 г, затем растворяют в мерной колбе. Возможны варианты приготовления точных растворов из фиксана-ла (ампула, содержащая точно известное количество вещества в виде раствора или кристаллов) или разведением концентрированного раствора.

*Пример протокола приготовления рабочего раствора фактора роста фибробластов.*

Процедура позволяет получить рабочий раствор фактора роста фибробластов. Основной фактор роста фибробластов (FGF-Базовый) находится в базальных мембранах и суб-эндотелии внеклеточного матрикса. FGF-Basic индуцируется на ранних стадиях развития эмбриона, где он необходим для поддер-

жания плюрипотентности и самообновления эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и определения линии дифференцировки стволовых клеток.

*Способы измерения, реактивы, материалы и оборудование.*

• 20мМ Трис-буфер:

— питательная среда  $\alpha$ MEM 25 мл;

— Trizma® base (T1503 SIGMA) 0,061 г;

— шприц 20-мл — 1 шт. и 2-мл — 1 шт.;

— микропробирка 1,5 мл (эппендорфы) — 1 шт.;

— стерильные фильтры с диаметром пор 0,2/0,22 мкм — 1 шт.;

— стерильные пластиковые центрифужные пробирки 15-мл — 2 шт., 50-мл или стерильный флакон;

— стерильные пробирки 5-мл — 1 шт.;

• b(basic)FGF № F0291 «SIGMA» 25UG.

*Условия выполнения процедуры:*

— бокс биологической безопасности класса IIА;

— температура окружающей среды —  $22 \pm 2$  °С);

— атмосферное давление — 84,0—106,7 кПа.

*Принцип процедуры.*

Процедура основана на разведении сухого вещества hbFGF № F0291 «SIGMA» в буфере для достижения биоактивной концентрации 0,05—0,6 нг/мл.

### **2.3. Клеточные культуры для проведения экспериментальных работ**

Выбор клеточных объектов для экспериментальных работ *in vitro* в первую очередь определяется целями исследования. Культуры клеток, представляющие собой генетически однородную популяцию, широко используются в биотехнологии, иммунологии, фармакологии и др. в качестве исследования токсических эффектов, тестирования лекарственных средств, биосовместимости материалов. Например, логично тестировать новый противоопухолевый препарат на культуре опухолевых клеток или культуры клеток с трехмерным каркасом, имитирующие архитектуру тканей *in vivo*, рационально использовать

для исследований на биосовместимость. При тестировании искусственно (экзогенного) матрикса наиболее оптимальным является использование стромальных клеток. Кроме того, необходимо учитывать наличие специфических маркеров, характерных для того или иного типа клеток, принадлежность к тому или иному типу ткани. Для проведения исследований могут использоваться как самостоятельно полученные культуры клеток и клеточные линии, так и клеточные культуры, хранящиеся в центрах коллекций клеточных культур. Такие коллекции включают в себя клеточные культуры разных типов клеток, полученных из различных тканей животных и растений. Важно подчеркнуть, что в коллекциях имеются не только клетки, полученные от здоровых доноров, но и образцы, полученные от больных с той или иной патологией. Широкое применение клеточных линий в фундаментальных, фармакологических, биомедицинских исследованиях привело к созданию большого количества клеточных коллекций по всему миру. За рубежом созданы национальные и континентальные коллекции клеточных культур: в США — American Type Culture Collection (ATCC); Европе — European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC); в Германии — Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ); Японии — Riken BRC Cell Engineering Division — Cell Bank. Такие коллекции насчитывают тысячи клеточных линий. Каждая клеточная линия в данных коллекциях идентифицируется с применением современных методов, и на каждую заводится паспорт. В соответствии с требованиями GLP, WHO, FDA такой паспорт должен включать следующие сведения: название клеточной культуры, ее происхождение, морфологию, способ и условия культивирования, уровень жизнеспособности после размораживания, видовую идентичность, специфические особенности культуры и рекомендуемую область применения. Указывается происхождение клеточной линии — из коллекции какого учреждения. Самыми большими коллекциями в РФ обладают Институт цитологии РАН (создана в 1978 г.), НИИ гриппа РАН, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН и др. Основные задачи центров: сбор клеточных линий, включая получение но-

вых культур на базе коллекции для сохранения и расширения генофонда; хранение клеточного материала (криоконсервация); паспортизация (характеристика клеточных линий, контроль качества); депонирование клеточных линий в связи с патентованием; создание информационного банка данных по клеточным культурам; распространение образцов клеточных линий. В Российской Федерации коллекция клеточных культур насчитывает девять специализированных коллекций. Кроме того, существует несколько биобанков, где помимо получения и хранения стволовых клеток сохраняются различные биологические образцы (кровь, плазма, сыворотка, ткани): Покровский банк стволовых клеток, Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины, Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии и др. Для подбора целевой культуры используют паспорта линий, имеющиеся на сайтах правообладателя коллекции, где указывают основные характеристики линии, геномные особенности, основные секретлируемые молекулы, рекомендации по использованию линии в отдельных видах исследований. Ниже приведены паспорта наиболее часто применяемых клеточных культур.

***Паспорт культуры фибробластов.***

**Происхождение:** человек, фибробласты больных пигментной ксеродермой, трансформированные SV 40.

Mol. Cell Biol. 1987. 7: 3353-3357.

**Морфология:** фибробластоподобная.

**Способ культивирования:** монослойный.

**Условия культивирования:**

- среда — DMEM;
- сыворотка — эмбриональная бычья 10%-ная;
- процедура посева — снятие клеток, используя трипсин 0,25 %: версен 0,02 % (1:3), кратность посева 1:3;
- криоконсервация — ростовая среда, 5—8 % DMSO,  $1,0 \cdot 10^6$  клеток/мл в ампуле.

**Жизнеспособность после криоконсервации:** 90 % (окраска трипановым синим на нулевом пассаже).

**Контроль контаминации:** бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены.

**Контроль видовой идентичности:** кариологический, изоферментный (ЛДГ и Г6ФДГ) анализ.

**Кариология:**  $2n=46$ , пределы изменчивости по числу хромосом — 64—75, модальное число — 68—70, количество маркеров — 19 % дицентриков (рутинная окраска), 7 % клеток содержат микрохромосому, количество полиплоидов 5 %.

**Область применения:** генетика, канцерогенез, клеточная биология.

**Коллекция клеточных культур:** Институт цитологии РАН.  
*Паспорт культуры Нер G2.*

**Происхождение:** человек, карцинома печени.

Nature 1979. 282: 615—616; Science 1980. 209: 497—499.

**Морфология:** эпителиоподобная.

**Способ культивирования:** монослойный.

**Условия культивирования:**

— среда — ЕМЕМ;

— сыворотка — эмбриональная бычья 10 %;

— др. компоненты — NEAA 1 %, пируват натрия 0,1 %;

— процедура посева — снятие клеток, используя трипсин 0,25 %: версен 0,02 % (1:3), кратность посева 1:3—1:6, оптимальная плотность  $2,0—3,0 \cdot 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>;

— криоконсервация — ростовая среда, 10 % DMSO,  $1,0 \cdot 10^6$  клеток/мл в ампуле.

**Жизнеспособность после криоконсервации:** 98 % (окраска трипановым синим на нулевом пассаже).

**Контроль контаминации:** бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены.

**Контроль видовой идентичности:** кариологический и изоферментный (ЛДГ, Г6ФДГ) анализ.

**Кариология:**  $2n=46$ , пределы изменчивости по числу хромосом — 49—57, модальное число хромосом — 55, количество полиплоидов — 5,6 %.

**Туморогенность:** не туморогенны в мышцах nude.

**Другие характеристики:** продукция  $\alpha$ -фетопротеина, альбумина,  $\alpha 2$ -макроглобулина,  $\alpha 1$ -антитрипсина, трансферрина,  $\alpha 1$ -антихимотрипсина, гаптоглобина, церулоплазмينا, плаз-

миногена, комплемента (C3, C4), C3-активатора, фибриногена, а1-кислый гликопротеина, а2-HS-гликопротеина, b-липопротеина, ретинол связывающего белка.

**Область применения:** биотехнология, биохимия, вирусология, изучение рецепторов, энзимология, дифференцировка, клеточная биология.

**Коллекция клеточных культур:** ATCC HB 8065; ECACC 85011430; Институт цитологии РАН.

## **2.4. Методические указания и протоколы выделения основных видов культур клеток**

### **2.4.1. Выделение мононуклеарных клеток на градиенте плотности**

Мононуклеарные клетки выделяют из периферической крови человека по методу Воуин (1968), основанному на седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина. Фиколл в данной смеси выступает как агент, агрегирующий эритроциты, а изопак (или урографин) нужен для создания изотоничности и плотности 1,077 г/см<sup>3</sup>.

*Принцип метода.* Гепаринизированную кровь разводят в 3 раза культуральной средой и аккуратно наслаивают на градиент фиколл-урографина. Кровь задерживается над фиколлом и не смешивается с ним. Наслоенную кровь центрифугируют 45 мин при 400 g (примерно соответствует 1500 об/мин). Постепенно эритроциты склеиваются фиколлом и опускаются на дно пробирки. Гранулоциты, имеющие плотность большую, чем седиментирующий раствор, оседают вместе с эритроцитами. Лимфоциты вместе с моноцитами остаются в интерфазе («облачко»), их собирают, переносят в другую пробирку и отмывают центрифугированием. Метод не дает выхода более 90 % клеток. Обычно состав отмывтых клеток состоит из 83—85 % лимфоцитов, 13—15 % моноцитов и 0,5—1 % нейтрофилов.

*Материалы и оборудование.* Для работы необходимы центрифуга с охлаждением, бакет-ротатор, градиентный смеситель, вещества для формирования градиента, такие как альбумин,

сыворотка эмбрионов коров, фиколл, лимфопреп, перколл (Pharmacia, Швеция), визотраст или другие рентгеноконтрастные вещества.

*Протокол методики.*

1. 10 мл гепаринизированной крови человека (20—25 ЕД гепарина на 1 мл крови) разводят в 3 раза (1 часть крови и 2 части питательной среды 199).

2. Разведенную кровь наслаивают на раствор фиколл-урографина (плотность 1,077 г/см<sup>3</sup>) в соотношении 1:3 (1 часть фиколла и 3 части разведенной крови). Кровь остается над раствором фиколла и не смешивается с ним.

3. Проводят центрифугирование при комнатной температуре в течение 45 мин на центрифуге с горизонтальным ротором при 400 g.

Следует иметь в виду, что для определения необходимого числа оборотов в конкретных условиях центрифугирования или получения соответствующего центробежного ускорения одну из необходимых величин (ускорение или число оборотов) находят по формуле

$$g=1,1 \cdot n^2 \cdot r \cdot 10^5,$$

где  $g$  — центробежное ускорение;  $n$  — число оборотов в минуту;  $r$  — радиус от центра оси до границы разделяемых сред.

4. После центрифугирования собирают интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки, в отдельную пробирку. Эритроциты склеиваются фиколлом и оседают на дно пробирки вместе с гранулоцитами.

5. Суспензию мононуклеарных клеток трижды отмывают средой 199, центрифугируя по 10 мин при 200 g.

6. Клетки ресуспендируют в 1 мл культуральной среды. Подсчет клеток осуществляют в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяют с помощью 0,1%-ного раствора трипанового синего. Необходимо подсчитать процент выхода жизнеспособности клеток (более 90 %). Для этого подсчитывают начальное количество клеток и количество выделенных клеток.

**2.4.2. Технологии клеточного сортиinga:  
фракционирование лимфоцитов методом  
иммуномагнитной сепарации, сортировка клеток  
с активацией флуоресценции, сортировка клеток  
на основе микрофлюидных технологий**

Получение чистых популяций клеток имеет принципиальное значение для проведения биомедицинских исследований, диагностики и терапии. Основными современными технологическими подходами являются фракционирование клеток методом иммуномагнитной сепарации, сортировка клеток на основе флуоресценции и методы, основанные на микрофлюидных технологиях.

*Имуномагнитная сепарация.*

Магнитная сепарация клеток является стандартным и широко используемым методом, дающим надежные и воспроизводимые результаты, применяемые как для научных исследований, так и в клинической лабораторной практике.

*Принцип метода.* Магнитная сепарация клеток основана на использовании парамагнитных бус (микросфер), покрытых моноклональными антителами (монАТ), против поверхностного антигена, специфичного для интересующих клеток. Магнитные бусы имеют диаметр около 50 нм, невидимы при световой микроскопии, подвергаются биodeградации и не травмируют клетки. Поскольку размер микросфер чрезвычайно мал, то для удержания меченых клеток необходимо наличие высокоградиентного магнитного поля. Для успешного разделения клеток чрезвычайно важно, чтобы микробусы после воздействия магнитного поля не проявляли остаточной намагниченности. Использование однородных по размеру и форме микробус обеспечивает быстрое и эффективное связывание клеток; минимизацию неспецифического связывания; хорошо воспроизводимые результаты.

Метод позволяет осуществлять выделение интересующей популяции клеток из цельной крови, образцов клеток костного мозга или моноклеарной суспензии, что обеспечивает быстрый и прямой доступ к максимальному числу целевых

клеток. Частицы добавляют непосредственно к образцу биологической жидкости. После 10—20-минутной инкубации пробирку с образцом помещают в магнитный сепаратор, где клетки интересующей популяции, связанные с магнитными частицами, улавливаются, а в супернатанте остаются не связавшиеся с микробусами клетки. При этом поддерживаются оптимальные условия жизнеспособности и функционирования клеток. Выделенные целевые клетки ресуспендируют в солевом буферном растворе и анализируют согласно протоколу исследования. При необходимости магнитные частицы впоследствии отделяют от исследуемых клеток.

Метод магнитной сепарации предоставляет неограниченные возможности по выделению любой интересующей клеточной популяции. Иммуномагнитные микробусы позволяют осуществить либо положительную, либо отрицательную селекцию нужных клеток (как из клеточной суспензии, так и из цельной крови).

Существует несколько типов парамагнитных бус:

— частицы, конъюгированные с первичными антителами, — это готовые к использованию микробусы, связанные с моноклональными антителами, высокоспецифичными к определенным поверхностным маркерам клеток человека и мыши;

— частицы, конъюгированные с вторичными антителами, — это частицы, связанные с очищенными вторичными антителами, позволяющие использовать любые мышинные, крысиные или кроличьи первичные антитела для выделения целевой популяции клеток;

— неконъюгированные бусы — частицы для прямого ковалентного связывания специфических антител и лигандов.

Метод позволяет получить высокоочищенные фракции как меченых, так и немеченых клеток с гарантированным оптимальным выходом. При этом клетки по параметрам жизнеспособности готовы для последующих экспериментов. Очистка клеточной суспензии занимает сравнительно мало времени (30—40 мин). Полученные клетки можно исследовать с помощью микроскопии, метода проточной цитометрии, культивирования *in vitro* и использовать для других методов иммунного анализа.

*Сортировка клеток с активацией флуоресценции.*

Сортировка клеток с активацией флуоресценции также известна как сортировка клеток с помощью проточной цитометрии или широко известна под аббревиатурой FACS. Сортировка клеток с активированной флуоресценцией использует проточную цитометрию для разделения клеток на основе морфологических параметров и экспрессии множества внеклеточных и внутриклеточных белков. Этот метод позволяет проводить многопараметрическую сортировку клеток и включает инкапсуляцию клеток в небольшие капли жидкости, которым избирательно придают электрические заряды и которые сортируются внешним электрическим полем. Сортировка клеток с активированной флуоресценцией имеет несколько систем, которые работают для достижения успешной сортировки интересующих событий (то есть таргетных, целевых клеток). К ним относятся жидкостные, оптические и электростатические системы.

*Сортировка клеток на основе микрофлюидных технологий.*

Ограничения флуоресцентно-активируемых и иммуномагнитных устройств для сортировки клеток привели к созданию нового технологического подхода на основе микрожидкостных устройств для сортировки клеток. Некоторые из них сейчас коммерчески доступны или находятся в коммерческой разработке. В разработках конструкций микрофлюидных сортировщиков клеток используются методы мягкой литографии с применением таких материалов, как полидиметилсилоксан. Микрофлюидные сортеры клеток можно разделить на две категории: активные и пассивные. Активные устройства отклоняют отдельные клетки за счет цитометрических измерений клеток, производимых в режиме реального времени. Пассивные устройства используют физические различия между клетками в том, как они взаимодействуют с потоком жидкости или поверхностями. Ключевым преимуществом микрофлюидных сортеров клеток является возможность выполнять флуоресцентно-активированную сортировку клеток в закрытом одноразовом стерильном картридже.

### **2.4.3. Выделение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека**

Процедура позволяет выделить ферментативным методом мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) из липоасpirата или биоптата пациента или донора для дальнейшего культивирования *in vitro* с целью увеличения количества клеток. Культивированные ММСК жировой ткани предназначены для применения в медицинских и/или исследовательских целях.

*Способы измерения, реактивы, материалы и оборудование:*

1) консервант для биоптатов / липоасpirата;

2) питательная среда DMEM или 199, содержащая:

— NEPES 10 mM;

$m = M_r \cdot M \cdot V$ :

— амфотерицин В, 10 мкг/мл;

— пенициллин, 1000 МО/мл;

— стрептомицин, 1000 мкг/мл;

3) раствор для отмывки биоптатов:

раствор Хэнкса, содержащий:

— амфотерицин В, 10 мкг/мл;

— пенициллин, 1000 МО/мл;

— стрептомицин, 1000 мкг/мл;

4) полная (ростовая) питательная среда:

Вариант № 1 общепринятый (conventional):

питательная среда DMEM/F12 или  $\alpha$ MEM (450 мл), содержащая:

— эмбриональную телячью сыворотку, 50 мл;

— пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл);

— L-глутамин — рабочая концентрация 2—4 mM.

Вариант № 2 для долговременной пролиферации (long-term proliferative):

питательная среда DMEM/F12 или  $\alpha$ MEM (450 мл), содержащая:

— эмбриональную телячью сыворотку, 50 мл;

— пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл);

— L-глутамин — рабочая концентрация 2—4 mM;

— рекомбинантный основной фактор роста фибробластов (bFGF, FGF-2) в концентрации 0,5—2 нг/мл.

Вариант № 3 без субстанций животного происхождения для клинического применения (animal origin component free for clinical use):

— пулированный тромбоцитарный лизат, 50 мл (закупается или готовится из образцов донорской крови по общепринятым методикам);

— L-глутамин — рабочая концентрация 2—4 мМ;

— пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл);

— для повышения скорости пролиферации ММСК среда № 3 также может содержать рекомбинантный основной фактор роста фибробластов (bFGF, FGF-2) в концентрации 0,5—2 нг/мл; однако это не является обязательным при использовании пулированного тромбоцитарного лизата.

Реактивы и расходные материалы для получения стромально-сосудистой фракции из липоаспирата:

— 0,2%-ный раствор коллагеназы IA (СОП №) (или 0,2%-ный раствор проназы, или смесь 0,1%-ного раствора коллагеназы IA и 0,1%-ного раствора проназы);

— 0,4%-ный раствор трипанового синего;

— 3%-ный раствор уксусной кислоты;

— или 1%-ный раствор метиленового синего в 3 % уксусной кислоты;

— стерильные пластиковые серологические пипетки объемом 5, 10 и 25 мл;

— автоматические дозаторы разного объема со стерильными пластиковыми наконечниками;

— автоматический насос-пистолет Easypet;

— стерильные пластиковые культуральные флаконы «tissue culture treated» площадью 25, 75 и 175 см<sup>2</sup>;

— стерильные чашки Петри диаметром 35, 60 и 100 мм;

— стерильные пластиковые центрифужные пробирки 15 и 50-мл;

— стерильные фильтры с диаметром пор 0,2/0,22 мкм;

— бокс биологической безопасности класса ПА;

— инвертированный микроскоп с фазово-контрастной оптикой;

- орбитальный шейкер-инкубатор;
- криоцентрифуга;
- водяная баня;
- 96-луночный круглодонный планшет;
- камера Горяева;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор;
- емкости для утилизации (для слива и для пластика).

*Условия выполнения процедуры.*

Для выполнения данной процедуры необходимо:

- бокс биологической безопасности класса ПА;
- температура окружающей среды  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ;
- атмосферное давление 84,0—106,7 кПа.

*Принцип процедуры.*

Процедура основана на способности протеолитических ферментов разрушать компоненты внеклеточного матрикса жировой ткани, что приводит к высвобождению в суспензию клеток стромально-сосудистой фракции обрабатываемого липоаспирата или биоптата жировой ткани.

*Подготовка к проведению процедуры.*

Все манипуляции должны проводиться в стерильных условиях бокса биологической безопасности класса ПА с соблюдением правил и техники асептики.

*Ход процедуры*

1. Только для биоптатов жировой ткани!!! Биоптаты подкожной жировой ткани исследуют на примесь фрагментов кожи и/или мышечной ткани, при наличии очищают от них и тщательно измельчают на мелкие кусочки при помощи скальпеля или ножниц в чашке Петри подходящего диаметра.

2. Полученный в консерванте (100 мл) липоаспира́т объемом 100 мл трижды отмывают по 200 мл раствора для отмывки в стерильном флаконе (количество липоаспи́рата 100 мл приведено в качестве примера — для других объемов липоаспи́рата / измельченного биоптата жировой ткани все растворы и реактивы используют с сохранением указанных здесь пропорций).

3. После отмывки к липоаспи́рату добавляют 100 мл 0,2%-ного раствора коллагеназы IA, или 100 мл 0,2%-ного раствора проназы, или 100 мл смеси 0,1%-ного раствора коллагеназы IA и 0,1%-ного раствора проназы.

4. Флакон с липоаспиратом и раствором фермента помещают в орбитальный шейкер-инкубатор на 60 мин при 37°C и 200 об/мин для получения клеток стромально-сосудистой фракции.

5. После окончания инкубации непереваренный остаток жировой ткани тщательно пипетируют, отбирают водную фазу, содержащую суспензию клеток, от жировой фазы и промывают раствором Хэнкса в соотношении 1:1 центрифугированием в 50-мл пробирках при 800 g и +4°C в течение 10 мин.

6. После первой промывки супернатант сливают, клеточный осадок в каждой 50-мл центрифужной пробирке ресуспендируют в 40 мл раствора Хэнкса и центрифугируют при 400 g и +4°C в течение 5 мин.

7. После второй промывки супернатант сливают, клеточный осадок ресуспендируют в 5 мл полной (ростовой) среды и пулируют в одну 50-мл пробирку.

8. Количество ядросодержащих клеток (ЯСК) стромально-сосудистой фракции и их жизнеспособность определяют путем подсчета в камере Горяева с 0,4%-ным раствором трипанового синего (или 1%-ный раствор метиленового синего в 3%-ной уксусной кислоте).

9. Полученную суспензию клеток стромально-сосудистой фракции жировой ткани для дальнейшего культивирования засевают в культуральные флаконы площадью 25, 75 или 175 см<sup>2</sup> с плотностью посева 10—50·10<sup>3</sup> ЯСК/см<sup>2</sup> в соответствующем объеме полной (ростовой) питательной среды.

#### **2.4.4. Смена среды при культивировании мультипотентных мезенхимальных клеток жировой ткани человека**

Процедура позволяет производить смену среды для успешного культивирования *in vitro* из ММСК жировой ткани пациента или донора. Культивированные ММСК жировой ткани предназначены для применения в медицинских и/или исследовательских целях.

*Принцип процедуры.*

Процедура состоит в смене полной (ростовой) среды, которая содержит гормоны, витамины, факторы роста, питательные вещества и микроэлементы, каждые 2—5 суток в зависимости от скорости роста культуры, для удаления токсических метаболитов и внесения питательных веществ в культуру клеток (контроль — по смене цвета входящего в состав среды рН-индикатора фенолового красного с красного на оранжево-желтый).

*Подготовка к проведению процедуры.*

Все манипуляции должны проводиться в стерильных условиях бокса биологической безопасности класса ПА с соблюдением правил асептики.

*Ход процедуры.*

1. Старую питательную среду удаляют из культурального флакона при помощи серологической пипетки.

2. Клеточную культуру в 25, 75 или 175 см<sup>2</sup> культуральном флаконе промывают при помощи серологических пипеток дважды по 3,5 или 10 мл раствора PBS соответственно.

3. После промывки в культуральный флакон площадью 25, 75 или 175 см<sup>2</sup> пипеткой вносят свежую (ростовую) среду, подогретую на водяной бане до температуры 37°C, в количестве 5, 15 или 35 мл соответственно.

4. Флакон с клеточной культурой помещают в СО<sub>2</sub>-инкубатор для дальнейшего культивирования.

**2.4.5. Принципы направленной  
дифференцировки клеток в условиях *in vitro*.  
Способы детекции результатов дифференцировки**

Направленная дифференцировка клеток — важнейший компонент в работе клеточного биолога. Целью такой дифференцировки — получение их исходного материала, состоящего из малодифференцированных стволовых клеток, специализированных клеточных фракций *in vitro* для дальнейшего применения в экспериментальной и клинической практике. Основными методологическими подходами к направленной дифференцировке стволовых клеток являются генетические модификации

клеток, применение генетически модифицированных в качестве фидера определенных типов клеточной дифференцировки и использование факторов роста и дифференцировки. Будучи самым доступным, последний подход получил наибольшее распространение. Инструментами для проведения таких процедур служат добавки в культуральную среду комбинаций ростовых факторов и индукторов дифференцировки, которые направляют созревание клеток в ту или иную сторону. При решении подобных задач необходимо стараться получить максимально возможное количество клеток определенного типа. Важным компонентом таких процедур является стандартизация метода с целью дальнейшего получения воспроизводимых результатов. Для контроля направленной дифференцировки необходимо детектировать полученные результаты методами флюоресцентной микроскопии (выявление специфических белков), проведением качественного окрашивания (на наличие характерных включений), проточной цитометрии (оценка пролиферативного и дифференцировочного потенциала). Ниже приведен примерный обобщенный протокол получения адипо-, хондро- и остеокультур клеток из мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани.

**2.4.6. Протокол получения культур  
из мультипотентных мезенхимальных  
стромальных клеток жировой ткани  
с заданным направлением дифференцировки  
(адипо-, хондро- и остеокультуры)**

При проведении дифференцировочного теста используют стволовые клетки 5—7-го пассажа.

1. Провести экспансию базальной культуры в стандартной ростовой среде (например, DMEM+10 % FBS), чтобы обеспечить серединную плотность культуры (60—80 %). Аспирировать среду и дебрис из флакона.

2. Добавить 5—10 мл DPBS. Осторожно промыть клеточный монослой.

3. Удалить DPBS, добавить 5—7 мл подогретого трипсина в объеме, соответствующем культуральной площади. Инкубировать 5—8 мин при 37°C до полного отслоения клеток от подложки.

4. Снять клеточную суспензию с флакона, перенести в центрифужную пробирку и центрифугировать клетки при 300—400 g в течение 5—10 мин.

5. Определить жизнеспособность клеток и общую клеточность с окрашиванием трипановым синим, используя счетчик или камеру Горяева.

6. Посадить МСК во флаконы для культивирования в количестве  $1 \cdot 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>. Для классического анализа дифференцировки сажают в 12-луночный планшет. Для исследования профиля экспрессии генов сажают в T-75 флакон. Для исследований иммуноцитохимии сажают в 16-луночный CultureWell™ на покрывное стекло или 96-луночный планшет.

7. Инкубируют клетки в стандартной ростовой среде для МСК при 37°C в увлажненной атмосфере CO<sub>2</sub> 4—6 % в течение от 2 часов до 4 дней.

8. После полной адгезии или предварительного наращивания (конфлуэнтность не более 60 %) заменить среду на дифференцировочную и продолжать инкубацию. Рост культуры замедлится, но МСК будут продолжать проходить ограниченную экспансию. Смену среды проводить каждые 3—4 дня (*состав дифференцировочных сред приведен в разделе 2.2. Методические указания по приготовлению основных растворов и дифференцировочных сред*).

9. Наращивать культуру в дифференцировочной среде от 14 до 28 дней (зависит от конкретного протокола дифференцировки).

10. В конце эксперимента провести процедуры отмыва от среды, фиксацию, окрашивание и микроскопию.

*Окрашивание на детекцию остеогенной дифференцировки.*

Рабочий раствор Alizarin Red S (2 %) готовят растворением красителя в дистиллированной воде (100 мл) и доведением pH до 4,1—4,3 с использованием 0,1 % гидроксида аммония. (Соблюдение значений pH очень важно для предотвращения образования крупных хлопьев!!! Гидроксид аммония вносят акку-

ратно, мелкими каплями, используя дозаторы малых объемов.) Затем раствор фильтруют через 0,22-мкм фильтр для удаления не растворившихся частиц.

*Окрашивание на детекцию остеогенной дифференцировки:*

1. Аккуратно аспирировать среду, не повреждая клеточный монослой.

2. Промыть культуру 2 мл PBS.

3. Фиксировать клетки 20—60 мин в 1 мл 10%-ного забуференного формалина при комнатной температуре.

4. Дважды отмыть в 1,5 мл фосфатно-солевого буфера без ионов кальция и магния. ВАЖНО: не повредить монослой в процессе манипуляций!

5. Окрашивать клетки 2%-ным раствором Alizarin red S 15—20 мин (1 мл красителя) при комнатной температуре.

6. Через 15 мин аспирировать раствор красителя и дважды промыть деионизованной водой (2 мл).

7. Добавить финальные 2 мл деионизованной воды, провести качественную и количественную оценку окрашенных участков минерализованного матрикса.

*Окрашивание на детекцию адипогенной дифференцировки:*

1. Аккуратно аспирировать среду, не повреждая клеточный монослой.

2. Промыть культуру 2 мл PBS.

3. Фиксировать клетки 20—60 мин в 1 мл 10%-ного забуференного формалина при комнатной температуре.

4. Дважды отмыть в 1,5 мл фосфатно-солевого буфера без ионов кальция и магния. ВАЖНО: не повредить монослой в процессе манипуляций!

5. Стоковый 0,5%-ный раствор Oil Red в изопропиловом спирте развести до рабочей концентрации 3:2 с PBS (3 части 0,5%-ного Oil Red и 2 части PBS), через 10 мин фильтровать через 0,22-мкм фильтр, использовать через 10—30 мин.

6. Окрашивать клетки готовым рабочим раствором 15—20 мин (1 мл красителя) при комнатной температуре.

7. Через 15 мин аспирировать раствор красителя и дважды промыть деионизованной водой (2 мл).

8. Добавить финальные 2 мл деионизованной воды и микро-скопировать.

*Окрашивание на детекцию хондрогенной дифференцировки:*

1. Аккуратно аспирировать среду, не повреждая клеточный монослой.
2. Промыть культуру 2 мл PBS.
3. Фиксировать клетки 20—60 мин в 1 мл 10%-ного забуференного формалина при комнатной температуре.
4. Дважды отмыть в 1,5 мл фосфатно-солевого буфера без ионов кальция и магния. ВАЖНО: не повредить монослой в процессе манипуляций!
5. Стоковый 0,5%-ный раствор Oil Red в изопропиловом спирте развести до рабочей концентрации 3:2 с PBS (3 части 0,5%-ного Oil Red и 2 части PBS), через 10 мин фильтровать через 0,22-мкм фильтр, использовать через 10—30 мин.
6. Окрашивать клетки готовым рабочим раствором 15—20 мин (1 мл красителя) при комнатной температуре.
7. Через 15 мин аспирировать раствор красителя и дважды промыть деионизованной водой (2 мл).
8. Добавить финальные 2 мл деионизованной воды и микроскопировать.

## **2.5. Методические указания и протоколы криоконсервации и размораживания культур клеток**

Проблема сохранения живых клеток вне организма человека, *in vitro* или *ex vivo*, является весьма актуальной как для исследовательских работ, так и для регенеративной медицины. За последние десятилетия разработано достаточно много протоколов криоконсервирования и размораживания различных типов клеток. Задачей криоконсервации является длительное хранение клеток при ультранизких температурах с целью в последующем восстановить их биологические функции. Замороженные клетки хранятся в низкотемпературных холодильниках при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  или в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ . Ниже приведены стандартные протоколы криоконсервации и размораживания мезенхимальных мультипотентных

стволовых клеток, полученных из жировой ткани. Качество хранения оценивается после размораживания в тесте с трипановым синим.

***Криоконсервация клеточных культур (адгезивные культуры).***

1. Слить среду из культуральной посуды.
2. Промыть флакон от остатков ППС (полная питательная среда) солевым раствором без ионов Са и Mg (ингибируют действие трипсина).
3. Добавить раствор трипсина соответственно объему культурального флакона.
4. Инкубировать в CO<sub>2</sub>-инкубаторе 5—10 мин. Аккуратно «отхлопнуть» флакон для стимуляции открепления клеток.
5. Собрать клеточную взвесь в центрифужную пробирку и добавить солевой раствор / базовую среду, содержащий фекальную бычью сыворотку (FBS) 10—20 % и 15—25 мМ HEPES, в соотношении 1:2.
6. Открутить в центрифуге 5—10 мин со скоростью 1200—1500 об/мин.
7. Слить супернатант, ресуспендировать осадок в 1 мл ППС. Определить показатели жизнеспособности культуры с использованием трипанового синего и камеры Горяева или автоматических методик.
8. Подготовить криосреду (лучше приготовить заранее):
  - базовая среда с HEPES — 70 %;
  - FBS — 20 %;
  - DMSO — 10 %.
9. Осадить клетки центрифугированием (см п. 6). Полностью убрать супернатант и осторожно, по каплям добавить криосреду, ресуспендировать клетки.
10. Внести клеточную взвесь в криовиалу.
11. Криовиалу поместить в криобокс с изопропиловой «рубашкой» / или аналог.
12. Криобокс поместить на 24 ч в низкотемпературный холодильник (–80°C), затем перенести криовials в криостатив и поместить в азотное криохранилище.
13. Маркировать криовиалу (пример):

**ADSC hIS 005Lia P5 (обозначение номера пассажи)**

**L —  $1 \cdot 10^6$  кл/мл**

**V — 95 %**

**21.20.24**

**ИВАНОВ И. И.**

***Размораживание клеток.***

1. Достать ампулы с клетками и выдержать 2 мин при комнатной температуре, затем поместить в водяную баню ( $37^\circ\text{C}$ ) на 1,5—2 мин.

2. После достижения жидкого состояния и исчезновения льда ампулу осторожно вскрыть (блокируя крышку салфеткой для предотвращения разбрызгивания содержимого в момент выхода скопившихся газов!!!), предварительно обработав 70%-ным спиртом.

3. Быстро перенести содержимое ампулы в центрифужную пробирку с отмывочным раствором (среда с ФБС 5%-ным и  $\text{HERE}_S$ -буфером 15—20 мМоль). На каждый 1 мл клеточной суспензии взять 3 мл отмывочного раствора.

4. Центрифугировать при 1000—1200 об/мин 5—7 мин.

5. Слить сепарированный супернатант. Залить 1 мл полной питательной среды, тщательно ресуспендировать осадок. Определить количество клеток и жизнеспособность методом микроскопии при окрашивании трипановым синим.

6. Поместить клетки во флакон ( $25/75/175 \text{ см}^2$ ) с заранее (!) согретой и подготовленной в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе средой.

8. Оптимальная концентрация клеток и, соответственно, выбор типа флакона зависит от плотности посева по паспорту клеточной культуры или определяется по заранее отработанному протоколу лаборатории.

Отмывочная среда: основа — любая среда (RPMI-1640) 5%-ной сыворотки, ХЕПЕС (если нет в среде) — 15—25 мМ.

Полная среда: DMEM LG, или DMEM/F12, или  $\alpha$ MEM, 10%-ной сыворотки, L-глутамин (2 мМ), антибиотик (100 ЕД/мкл/мл), EGF — 1 нг/мл, bFGF — 1 нг/мл (факторы роста добавить в среду после 24 ч культивирования, после отмыва культуры от дебриса).

## 2.6. Методы тестирования биоматериалов на культурах клеток

*Оценка биосовместимости материалов медицинского назначения с использованием клеточных культур (на примере культивирования стромальных стволовых клеток (ССК) с трехмерным матриксом, имитирующим регенерирующую костную ткань).*

Трехмерная модель культивирования предполагает создание *in vitro* условий активации ССК под влиянием трехмерного матрикса (микроокружения), имитирующего рельеф минерально-го вещества регенерирующей костной ткани.

Для имитации трехмерной (3D) культуры в модели *in vitro* применяли образцы из коммерчески чистого титана ВТ1.0 с размером  $10 \cdot 10 \cdot 1 \text{ мм}^3$ , несущие двустороннее покрытие из фосфатов кальция методом микродугового оксидирования.

В качестве раздражителей использовались 3D-матрикссы с кальцийфосфатной (КФ) поверхностью.

Оценку адгезии, миграции (таксиса), пролиферации и морфологии стромальных стволовых клеток проводили с использованием интегрированной платформы Cell-IQ® v2 MLF (СМ Technologies, Финляндия) для визуализации живых клеток *in vitro* фазово-контрастным методом в реальном времени.

В 12-луночных стерильных пластиковых культуральных плоскостонных планшетах (Orange Scientific, Бельгия; площадь лунки  $1,86 \text{ см}^2$ ) устанавливали с помощью клипсы титановые подложки с двусторонним КФ-покрытием с одного края лунки. Это способствовало сохранению положения образцов и предотвращало повреждение формирующегося клеточного слоя при передвижении планшета на предметном столике во время съемки. Для формирования начальной клеточной массы в центр каждой лунки помещали 70 мкл клеточной взвеси ( $5 \cdot 10^4$  жизнеспособных клеток). Затем планшет с культурой оставляли на 120 мин во влажной камере для адгезии клеток. Далее смывали не прилипшие клетки фосфатным буфером и вносили в каждую лунку 1,5 мл питательной среды (90 % DMEM/F12 (1 : 1) (Gibco Life Technologies, США), 10 % FBS (Sigma-Aldrich, США), 50 мг/л гентамицина (Invitrogen, Великобритания),

280 мг/л L-глутамин (Sigma-Aldrich, США). При таком объеме 3D-матрикс погружался в культуральную среду наполовину, а металлическая клипса не взаимодействовала со средой. Таким образом, к клеточному слою была обращена  $\frac{1}{4}$  поверхности двустороннего покрытия, клетки в течение длительного времени не контактировали с образцами напрямую, что обуславливало опосредованное влияние (через продукты растворения) на направленную миграцию клеток в направлении к образцам и/или от них. В качестве контроля служила 2D-культура ССК на пластиковой поверхности культуральных планшетов без добавления образцов с КФ-покрытием (гомеостатическая модель). Срок динамического культивирования в Cell-IQ системе составил 14 суток (до образования монослоя) при 100 % влажности, 5 % углекислого газа и 37°C.

Для анализа миграционной активности в каждой лунке выбиралось по четыре точки. Точки старались располагать следующим образом: 01 — на границе клеточного слоя, 02 — равноудалена от клеточного слоя и от матрикса, 03 — рядом с матриксом, 04 — на том же расстоянии от клеточного слоя, что и матрикс, но в противоположной стороне, если такой возможности не было, то ее располагали на том же удалении, но перпендикулярно от образца с КФ-покрытием. Цифровую съемку клеточной культуры проводили каждые 45 мин. Было получено по 1308 снимков для каждой из 4 точек в лунке. Для эффективной идентификации клеток было создано несколько библиотек цифровых изображений, по которым проводился дальнейший автоматизированный анализ с использованием программного обеспечения Cell-IQ Imagen. Для анализа использовался каждый десятый снимок.

Для анализа пролиферативной активности и формирования монослоя был проведен подсчет числа поделившихся клеток, для каждой лунки в точках 03 (вблизи 3D-матрикса) и 04 (наиболее удалена от образца). Для этого были смонтированы видеоролики на основе всех полученных снимков каждой точки (всего 24 видеоролика). При просмотре определялось время деления первой клетки в области наблюдения и численность клеток в этот момент, далее подсчитывалось количество поде-

лившихся клеток до образования монослоя, а также для последней поделившейся клетки определялось время деления и численность клеток в этот момент.

*Оценка морфофункционального состояния (активации, дифференцировки, созревания, пролиферации и гибели) стромальных стволовых клеток в условиях 3D-культивирования.*

Подсчет концентрации и жизнеспособности ССК проводили с помощью автоматического счетчика клеток CountessTMAutomatedCellCounter (Invitrogen, США) с использованием 0,4%-ного раствора трипанового синего (Invitrogen, США).

Для оценки процессов дифференцировки и созревания ССК человека под влиянием 3D-матриксков с КФ-покрытием производили следующие манипуляции:

1. Через 14 суток культивирования клеточные культуры переносили из Cell-IQ системы в CO<sub>2</sub>-инкубатор и продолжали культивировать при 100 % влажности, 5 % углекислого газа и 37°C до 21 суток (при смене среды каждые 3—4 дня) в стандартной культуральной среде DMEM/F12 (см. выше) с тестируемыми образцами или без таковых. Таким образом, фиксировался потенциальный остеогенный эффект продуктов растворения 3D-матриксков, без их прямого контакта с ССК, при окраске клеточной культуры ализариновым красным.

2. Тестируемые 3D-матрикссы укладывали на дно лунок культуральных планшетов, на образцы и в контрольные лунки вносили по 2 мл суспензии ССК жировой ткани человека в количестве  $1,5 \cdot 10^5$  жизнеспособных клеток. Культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 100 % влажности, 5 % углекислого газа и 37°C до 21 суток (при смене среды каждые 3—4 дня) в стандартной культуральной среде DMEM/F12 (см. выше) либо в дифференцировочных средах StemPro® DifferentiationKit (ThermoFisherScientific, USA) согласно протоколу фирмы-производителя. Окрашивали на остеобласты, хондробласты или адипоциты, как описано выше. Цифровые изображения окрашенных клеток получали в отраженном свете при помощи инвертированного металлографического микроскопа Olympus GX-71 (Япония).

О направлении созревания ССК судили по секреции остеокальцина (ОК) и продуктов деградации коллагена I типа (CrossLaps). ОК, наряду со щелочной фосфатазой, считаются реальными молекулярными маркерами дифференцировки ССК в функционально зрелые секретирующие остеобласты. Увеличение концентрации CrossLaps свидетельствует в пользу остеокластоподобной функции клеток. Для определения метаболитов клеточные супернатанты собирали на 21 сутки и центрифугировали в течение 10 мин при 500 g, применяли стандартную схему иммуноферментного анализа согласно инструкциям фирмы-производителя (Osteometer BioTech A/S N-MID Osteocalcin One Step ELISA test system; Nordic bioscience diagnostics, Дания).

Активацию клеточной культуры оценивали на основе морфологии клеток, изменения антигенного профиля клеточных мембран (CD-детерминант), экспрессии генов (остеогенной дифференцировки, пролиферации (hTERT), цитокинов) и секреции цитокинов.

Для определения спектра антигенных детерминант ССК ферментировали 0,05%-ным трипсином («ПанЭко», Россия) в 0,53 мМ ЭДТА (Sigma-Aldrich, США), дважды отмывали фосфатным буфером. После 30 мин инкубации с 10 мкл антител к CD73, 90, 105, 14, 20, 34, 45, 95, HLA-DR (MSC Phenotyping Kit, human — 130-095-198 (Miltenyi Biotec, США) клетки подвергали анализу на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколу фирмы-производителя. Определяли количество клеток, презентующих изучаемые кластеры дифференцировки, с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США).

Количественное определение факторов роста, хемокинов и цитокинов (IL-1 $\alpha$ , IL-2 $\alpha$ , IL-3, IL-12p40, IL-16, IL-18, STACK, GRO $\alpha$ , HGF, IFN $\alpha$ 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, b-NGF, SCF, SCGF-b, SDF-1 $\alpha$ , TNF-1b, TRAIL) в супернатантах исследуемых культур ССК проводилось методом проточной флюориметрии на автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-PlexProHuman cytokine Group I Assays, Bio-Rad, США). Флюориметрический анализ показал отсутствие

исследуемых цитокинов в исходной среде для культивирования клеток. Исследование уровня экспрессии генов, ассоциированных с дифференцировкой и созреванием ССК в остеогенном направлении (BMP2, BMP6, RUNX2, FGF10, RUNX2, SMURF1, TBX5, ALP), их пролиферативный потенциал (hTERT), а также транскрипции мРНК хемокинов (IL-18, GRO $\alpha$ , HGF, SCGF-b, MIF, MCP3, CTACK), регулирующих активность ССК и/или реагирующих на используемые раздражители, проводили методом количественной полимеразной цепной реакции.

Выделение тотальной РНК из полученных образцов проводили с использованием реагента ExtractRNA kit («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Затем проводили реакцию обратной транскрипции, выделенной тотальной РНК с использованием праймера oligo(dT)23-primer (20 мкМ) («Beagle», Россия) и обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия). Мультиплексный анализ ПЦР проводили в трех повторях с использованием реагентов qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10 пМ («Beagle», Россия) в амплификаторе CFX96 («BioRad», США). В качестве матрицы использовали 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена — ген RPLPO.

Результаты ПЦР анализировали с помощью метода максимума второй производной (Second Derivative Maximum method). Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффла для разных эффективностей амплификации.

Экстракты 3D-матрикса с КФ-покрытием с сопоставимой шероховатостью получали при моделировании биодеградации в синтетической культуральной среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) с низким содержанием кальция в течение 7 и 14 дней при температуре 37°C (2 мл среды на каждый образец согласно рекомендациям ISO 10993-5). Концентрации ионизированного (биологически активного) и общего кальция, фосфатного иона (PO $_4^{3-}$ , неорганический фосфат) определяли стандартным колориметрическим методом. Контролем служил растворитель без исследуемых образцов.

Для анализа морфофункциональных реакций (миграции) ССК на продукты растворения КФ-покрытий 3D-матрикса по

механизму хемотаксиса в качестве хемоаттрактанта применяли наночастицы (диаметр нанокристаллитов 10—30 нм) гидроксипатита (ГАП) в концентрации 1 мг/мл, из которого также формировали покрытия. Порошок синтетического ГАП получен механохимическим способом в планетарной мельнице как описано ранее.

Мониторирование влияния наночастиц ГАП на миграцию ССК через микроотверстия (инвазию) в полимерной мембране, имитирующие поры в базальной мембране кровеносных капилляров, осуществляли с помощью специализированных 16-луночных СИМ-планшет CELLigence RTCADP системы (Roche Applied Science, Канада). Анализ клеток в реальном времени (RTCA) позволяет фиксировать динамическое изменение импеданса при контакте клеток с золотыми электродами с вычислением клеточного индекса, прямо коррелирующего с числом и площадью контакта клеток, прилипших к электроду. Каждая лунка СИМ-планшета состоит из двух камер. В нижнюю камеру (диаметр 6 мм, максимальный объем 162 мкл) помещается хемоаттрактант, в верхнюю камеру (диаметр основания 5 мм, максимальный объем 180 мкл) — тестируемые клетки, которые мигрируют через поры диаметром 8 мкм на обратную поверхность мембраны в верхней камере, покрытую на 80 % ячейками из золотых электродов.

Эксперименты по инвазии-хемотаксису ССК проводили согласно нашей модификации. Все работы проводили в условиях ламинарного потока стерильного воздуха. Штатив для сборки верхней и нижней камеры СИМ-планшета помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 24 ч при 37°C для прогрева.

Вследствие малого объема нижней камеры (не более 162 мкл) RTCADP система не позволяет изучать объемные образцы. В связи с этим в нижнюю камеру помещали нанодисперсию ГАП в концентрации 1 мг/мл в стандартной культуральной среде ( $\alpha$ MEM, 100 ЕД/мл пенициллина / стрептомицина, 0,3 мг/мл L-глутамина; Sigma-Aldrich, США). В качестве контроля нижнюю камеру заполняли 150 мкл соответствующей среды без ГАП.

В верхнюю камеру вносили 30 мкл культуральной среды на основе  $\alpha$ MEM, инкубировали в течение 1 ч в RTCA DP Analyzer

для калибровки прибора. Затем в верхнюю камеру СИМ-планшета добавляли по 150 мкл клеточной взвеси в конечной концентрации  $4 \cdot 10^4$  ССК, инкубировали 10 мин в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе и устанавливали в RTCA DP Analyzer. В контрольных лунках в верхние камеры добавляли по 150 мкл культуральной среды. Для каждой исследуемой группы использовали четыре лунки. Сигналы для определения индекса клеточной миграции (ИКМ) с помощью программного обеспечения RTCA Software фиксировали каждые 15 мин в течение 25 ч.

Полученные данные подвергались проверке статистических гипотез с использованием стандартных пакетов «STATISTICA for Windows 10.0». Нормальность распределения выборки проверялась по критерию Колмагорова — Смирнова. Для оценки распределения рассчитывали медиану (Me), 1-й (25 %) и 3-й (75 %) квартили. Статистическую значимость полученных результатов оценивали с применением непараметрических критериев (U-критерий Манна — Уитни, T-критерий Вилкоксона (PT)). Дополнительно проводились корреляционный и регрессионный анализы данных для установления связей (механизмов взаимодействия) между исследуемыми показателями. Статистически значимыми считались различия при  $P < 0,05$ .

*Микротитрационный тест (МТТ-тест) — колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток.*

НАДФ-Н-зависимые клеточные оксидоредуктазные ферменты могут, при определенных условиях, отражать количество жизнеспособных клеток. В нем используют желтый водорастворимый тетразолиевый краситель, который под действием ферментов превращается в сине-фиолетовый водонерастворимый формазан, количество образовавшегося формазана пропорционально числу клеток с активным метаболизмом. АТФ-тест — анализ на содержание аденозинтрифосфата (АТФ) для оценки жизнеспособности клеток, основан на том, что содержание внутриклеточного АТФ является основным индикатором жизнеспособности клеток. При гибели клеток в первую очередь прекращается синтез АТФ, поэтому содержание внутриклеточного АТФ быстро падает вплоть до нулевых значений. Метод биолюминесцентной АТФ-метрии считается наиболее чувстви-

тельным, быстрым и специфичным. Он позволяет детектировать точное содержание внутриклеточного АТФ в короткие сроки, рассчитать число живых клеток и оценить их метаболический статус. Проточная цитометрия может применяться для анализа жизнеспособности клеток с использованием флуоресцентных красителей (4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI), 5-бром-2-дезоксисуридин и др.), окраска которыми позволяет различать живые и мертвые клетки.

### **2.7. Оценка жизнеспособности культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в тесте с трипановым синим**

Оценка жизнеспособности культуры клеток является рутинной процедурой в практике клеточного биолога.

Наиболее широко распространенный тест, позволяющий оценить жизнеспособность клеток, — тест с трипановым синим. К преимуществам этого варианта можно отнести доступность, информативность и простоту исполнения. В основе метода лежит способность проникать через поврежденную мембрану и связываться с компонентами цитоплазмы. Проникая внутрь клетки, трипановый синий адсорбируется на ядерных белках, окрашивает цитоплазму в синий (голубой цвет).

*Реактивы, материалы и оборудование для теста с трипановым синим:*

- 0,4%-ный раствор трипанового синего;
- физиологический раствор (раствор Эрла, раствор Хэнкса и др.);
- камера Горяева для подсчета клеток;
- пробирки типа Эппендорф;
- световой микроскоп.

*Ход методики.*

В пробирке типа Эппендорф готовят окрашенную суспензию клеток. Для этого к 20 мкл суспензии клеток добавляют 20 мкл 0,4%-ного раствора трипанового синего, тщательно смешивают содержимое пробирки. Инкубируют в течение 5 мин. Трипановый синий окрашивает только мертвые клетки, живые

остаются неокрашенными. Превышение времени инкубации может привести к неспецифическому окрашиванию живых клеток. Затем в подготовленную камеру Горяева заполняют суспензию окрашенных клеток, используя силу капиллярного всасывания. Далее на световом микроскопе производят подсчет окрашенных (мертвых) и неокрашенных (живых) клеток. Подсчет клеток проводится при малом увеличении микроскопа. При подсчете учитывают только целые, неповрежденные клетки. При этом живые клетки не окрашиваются, а мертвые окрашиваются в синий цвет. Учитывают общее количество живых и мертвых. При пересеве культуры учитывают только живые клетки.

Камера Горяева содержит 225 больших квадратов (15 рядов по 15 больших квадратов каждый). Рекомендуется вести подсчет клеток в 15 квадратах по двум диагоналям в двух сетках. Если цифры мало отличаются, то выводится среднее число клеток. При большой разнице заполняют камеру повторно и снова делают подсчет. Относящимися к данному квадрату считают клетки, лежащие внутри или на его левой и верхней границе, конгломераты клеток, количество которых нечетко выражено, принимают за единицу. Число клеток в 1 мл среды определяют по формуле

$$X = a \cdot 15 \cdot 2 \cdot 1111,$$

где  $X$  — число клеток в мл;

$a$  — среднее число клеток в 15 квадратах;

2 — коэффициент разведения суспензии раствором красителя;

1111 — коэффициент пересчета.

Если ведется подсчет клеток во всей сетке (225 больших квадратов), то формула следующая:

$$X = a \cdot 2 \cdot 1111.$$

Если суспензия слишком концентрированная, ее можно предварительно развести культуральной средой, что учитывается в формуле (необходимо увеличить коэффициент разведения суспензии).

## 2.8. Оценка апоптоза клеточной культуры методом проточной цитометрии

Апоптоз — программируемый и хорошо регулируемый процесс клеточной гибели. Биологический смысл апоптоза заключается в поддержании баланса между пролиферацией клеток и гибелью с последующей утилизацией отработавших свой физиологический ресурс старых клеток. Оценка уровня апоптоза, отдельных его стадий в клеточной культуре является важнейшим инструментом, характеризующим ее состояние, степень влияния экзогенных и эндогенных факторов на ее развитие. Апоптоз может быть инициирован как физиологическими, так и патологическими стимулами. Проточная цитофлуорометрия позволяет оценить потенциальную уязвимость клеток со стороны различных факторов и соответственно воздействовать на этапы апоптоза с целью их регуляции и коррекции. Ниже приведен протокол исследования апоптатической активности клеток, полученных из адгезивной (суспензионной) культуры.

### *Материалы и реактивы:*

- реагент Guava® ViaCount™ (кат. № 11-25210, 40 мл; кат. № 11-25209, 240 мл);
- проточный цитометр;
- клеточная суспензия;
- буфер для разбавления: фосфатный буферный раствор (PBS) или эквивалентный сбалансированный солевой раствор, рН от 7,2 до 7,4. Буфер не должен содержать индикатор феноловый красный;
- микропипетки;
- одноразовые наконечники для микропипеток;
- вортекс;
- одноразовые перчатки;
- 100%-ный раствор отбеливателя, содержащий от 5 до 6 % гипохлорита;
- деионизированная (DI) вода;
- 0,5-мл микроцентрифужные пробирки для сбора образцов;
- 1,5-мл микроцентрифужные пробирки для очистки;
- 96-луночные микропланшеты с круглым дном.

*Протокол.*

Подготовьте однородную суспензию клеток для подсчета.

*Подготовка образца клеток, подготовка контролей.*

Независимо от типа используемых клеток (адгезивные или неадгезивные) или культурального сосуда (микропланшет, пробирка или колба) каждый эксперимент должен включать соответствующие отрицательные и положительные контрольные образцы:

— отрицательный контрольный образец: отрицательный контроль должен быть образцом из вашей клеточной культуры, не обработанным для индукции апоптоза. Окрашенный отрицательный контрольный образец должен быть запущен в начале эксперимента и использоваться для регулировки настроек прибора для фонового окрашивания;

— положительный контрольный образец: положительный контроль должен быть образцом апоптотических и мертвых клеток из культуры, обработанной с использованием известного метода индукции апоптоза для вашей клеточной линии;

— подготовка неадгезивных и адгезивных клеток.

Следующие протоколы описывают, как собирать неадгезивные или адгезивные клетки, культивируемые в 96-луночных планшетах, колбах или других сосудах для тканевых культур. Каждое из условий культивирования требует разных протоколов для сбора клеток.

*Подготовка неадгезивных клеток.*

1. Установите начальные условия культивирования, чтобы после культивирования и обработки клетки находились в концентрации от  $1 \cdot 10^5$  до  $1 \cdot 10^7$  клеток/мл в среде, содержащей сыrovотку или альбумин.

2. Подготовка адгезивных клеток.

Для сбора адгезивных клеток используйте свой метод удаления. Такие реагенты, как ЭДТА или трипсин, можно использовать для отделения клеток от колбы, и они должны создавать суспензии из отдельных клеток. Если для отделения клеток используются механические средства, можно использовать дополнительные реагенты, например реагент для диспергирования клеток Guava® (кат. № 4700-0050), чтобы отделить комки. Используя предпочтительный метод для от-

деления, отделите клетки от их культурального сосуда. Добавьте свежую среду, содержащую сыворотку или альбумин, в каждую лунку, чтобы конечная концентрация составила от  $1 \cdot 10^5$  до  $1 \cdot 10^7$  клеток/мл.

*Окрашивание образцов.*

1. Убедитесь, что адгезивные клетки полностью удалены из колб (флаконов) и хорошо перемешаны.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Точный подсчет клеток требует равномерного распределения клеток в суспензии. Аккуратно, но тщательно перемешивайте все суспензии на всех этапах разбавления и окрашивания, а также перед загрузкой образцов в проточный цитометр для анализа. Не перемешивайте образцы энергично, так как образец может выплеснуться или вызвать повреждение клеток, что приведет к ошибочному подсчету клеток.

2. Подготовьте окрашенные образцы клеток, смешав их с реагентом *Guava ViaCount™* в пробирке для образца.

Точный подсчет клеток в системе *Guava* происходит в диапазоне концентраций от  $1 \cdot 10^4$  до  $5 \cdot 10^5$  клеток/мл в окрашенном образце.

Для высококонцентрированных клеточных суспензий ( $>1 \cdot 10^7$  клеток/мл) рекомендуем начать с 40-кратного разбавления исходной клеточной суспензии. Чтобы получить окрашенный образец клеток в диапазоне концентраций для точного подсчета клеток, может потребоваться дополнительно разбавить образец. Например, для клеточных суспензий, таких как цельная кровь, с концентрацией более  $2 \cdot 10^7$  клеток/мл, следует приготовить 80-кратное разбавление исходной клеточной суспензии.

Если вы не знаете приблизительную концентрацию исходной клеточной суспензии, приготовьте окрашенный образец клеток, смешав его с реагентом *ViaCount Reagent* в 20-кратном разбавлении (например, 20 мкл клеточной суспензии на 380 мкл реагента *ViaCount Reagent*). Если образец показывает значение общего количества  $1 \cdot 10^7$  клеток/мл или выше, мы рекомендуем приготовить дополнительные разбавления (например, 40- и 80-кратные разбавления) для анализа, чтобы проверить количе-

ство клеток. Если окрашенный образец клеток для сбора данных слишком концентрирован ( $> 5 \cdot 10^5$  клеток/мл), подсчет клеток может быть неточным.

3. Дайте клеткам окраситься в течение как минимум 5 мин.

*Проведение анализа на проточном цитометре.*

При необходимости можно настроить порог FSC во время анализа. Во время сбора данных порог FSC используется в качестве подсчетного гейта — любое событие, которое проходит порог, включается в События для сбора данных. После завершения сбора данных, если вы перемещаете порог, общее количество клеток изменится. Однако, перемещая порог, можно скорректировать остатки, которые были включены, или клеточные события, которые не были включены во время сбора данных.

- При необходимости отрегулируйте положение и угол красного маркера жизнеспособности, чтобы точнее отличать жизнеспособные клетки от нежизнеспособных (или отделить мертвые клетки от живых и апоптотических клеток).

- Для отрегулирования угла маркера, щелкните и перетащите верхнюю часть линии, чтобы наклонить ее в нужное место.

- Для перемещения всего маркера влево или вправо, щелкните и перетащите нижнюю часть линии, чтобы сместить ее в нужное место.

Чтобы установить маркер апоптоза, нажмите «Включить апоптозный гейт». Маркер апоптоза доступен во время ручного анализа. Чтобы установить маркер апоптоза, следуйте тем же инструкциям, что и для установки маркера жизнеспособности, приведенным выше.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** убедитесь, что маркер апоптоза находится справа от маркера жизнеспособности и они не пересекаются.

Настройка может отличаться на разных приборах.

НО для оценки используются следующие каналы: **FL4 (PerCP-Vio700) против FL3 (PE)**.

Маркер (линия) жизнеспособности (**Viability**), отделяющий жизнеспособные клетки (слева) от апоптотических клеток (справа).

Маркер (линия) апоптоза (**Apoptotic**), отделяющий апоптотические клетки (слева) от мертвых клеток (справа).

В результате получается три гейта:

- 1) правый — живые клетки;
- 2) центральный — апоптотические клетки;
- 3) левый — мертвые клетки.

Таким образом, методы проточной цитометрии могут обеспечить определенную количественную оценку апоптоза.

## **2.9. Определение иммунофенотипа клеток, полученных из культуры**

Определение иммунофенотипа клеток является рутинной процедурой в практике как иммунолога, так и клеточного биолога. Характеристика клеток, полученных в результате культивирования, по наличию тех или иных маркеров позволяет судить о типе полученных клеток и их функциональном состоянии. Ниже приведен вариант протокола определения фенотипа клеток, выделенных из адгезивной или суспензионной культуры.

*Материалы:*

- клеточная суспензия;
- микроцентрифуга;
- проточный цитометр;
- центрифуга LMC-3000 (BioSan, Латвия);
- набор дозаторов;
- наконечники к дозаторам;
- пипетки;
- серологические пробирки;
- микроцентрифужные типа Эппендорф 1,7 мл;
- пробирки центрифужные;
- камера Горяева.

*Реактивы:*

- антитела к CD166 человека (Кат. № 2319515, SONY, США);
- антитела к CD29 человека (Кат. № 102208, BioLegend, США);
- буфер для окрашивания клеток Stain Buffer (Кат. № 554656, BD Biosciences, США);
- готовая среда для культивирования клеток;

- набор Human MSC Analysis Kit (Кат. № 562245, BD Biosciences, США);
- раствор трипсин-ЭДТА 0,25 % (Кат. № 25200072, Invitrogen, США);
- раствор Дюльбекко (Кат. № P060п, DPBS, ПанЭко, Россия).

*Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток специфическими антителами к CD-маркерам (кластерам дифференцировки):*

- Приготовление суспензии клеток: снять клетки с поверхности культурального пластика трипсинизацией. Собрать суспензию клеток в стерильную 50-мл центрифужную пробирку.
- Посчитать количество клеток в камере Горяева.
- Центрифугировать суспензию при 500 g в течение 5 мин при 4°C. Супернатант удалить.
- Осадок клеток ресуспендировать в охлажденном буфере для окрашивания клеток и довести до конечной концентрации  $5 \cdot 10^6$  клеток/мл.
- Внести по 50 мкл суспензии клеток в стерильную 1,7-мл микроцентрифужную пробирку.
- В каждую пробирку добавить необходимое количество соответствующего антитела. Антитела конъюгированы с флуоресцентной меткой.
- Инкубировать клетки с антителами в течение 30—45 мин при 4°C в темноте. Центрифугировать клеточную суспензию при 500 g в течение 5 мин при 4°C. Супернатант удалить.
- После инкубации отмыть клетки дважды буфером для окрашивания клеток. Затем добавить 500 мкл буфера для окрашивания клеток, центрифугировать клеточную суспензию при 500 g в течение 5 мин при 4°C. Супернатант удалить.
- Повторить отмывку клеток еще раз.
- Осадок клеток ресуспендировать в 500 мкл буфера для окрашивания клеток.
- Проанализировать иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на проточном цитометре. В качестве отрицательного контроля (контроль аутофлуоресценции) использовать образец клеток, не окрашенный антителами.

## **2.10. Оценка продукции цитокинов клеточной культурой методом иммуоферментного анализа**

Цитокины представляют собой небольшие информационные пептидные молекулы, обеспечивающие межклеточную кооперацию не только в иммунной системе, но и между всеми клетками организма. Посредством этих молекул регулируется рост, пролиферация, дифференцировка и функциональная активность клеток. Продукция того или иного цитокина, ее уровень дает представление о типе клеток, ее функционале и активности, влиянии на другие клетки. Для оценки продукции отдельных цитокинов, как правило, применяется определение их концентрации в супернатантах культурами клеток методом иммуоферментного анализа (ИФА). Варианты протокола определения цитокинов предоставляются фирмами-производителями наборов.

## **2.11. Оценка влияния ростовых факторов на культуру клеток (на примере лизата тромбоцитов)**

Одним из методов первичного тестирования эффективности любых экзогенных факторов роста и регуляции функциональных процессов живых объектов является метод тестирования на клеточных культурах *in vitro*.

В условиях эксперимента используют различные концентрации испытуемой ростовой добавки. В качестве положительного контроля, как правило, применяют эмбриональную телячью сыворотку; в качестве негативного контроля используется бессывороточная среда. После эксперимента проводят оценку жизнеспособности клеточных культур и их пролиферативной активности.

Для детализированной оценки влияния различных факторов на культуру клеток в план тестирования включают анализ:

- внутриядерных процессов;
- внутриклеточных (цитоплазматического / органоидного) и мембранного процессов;

— клеточного секрета, межклеточных (паракринных / аутокринных) взаимодействий.

Для оценки изменений внутриядерных процессов, в ответ на введение экзогенного фактора, используют различные традиционные и современные методы молекулярных технологий: кариотипирование, ПЦР, секвенирование, FISH-анализ (флуоресцентная гибридизация), микроматричный анализ (ДНК-чипы).

Оценка ответных реакций структур мембраны и клеточных органелл проводится методами микроскопии, прижизненной визуализации в режиме реального времени (Системы All-in-One, Cell-IQ, RTSA и др.) и проточной цитометрии.

Оценка клеточного секрета, межклеточных (паракринных / аутокринных) взаимодействий проводится с использованием методов иммуноблоттинга, проточной флуориметрии в формате мультиплексного анализа и иммуноферментного анализа.

## СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Азаев М. Ш., Дадаева А. А., Ильичева Т. Н.* Биотехнология: практикум по культивированию клеточных культур. М., 2022.
2. *Блажевич О. В.* Культивирование клеток : курс лекций. Минск, 2004.
3. *Введение* в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / В. П. Шахов, И. А. Хлусов, Г. Ц. Дамбаев [и др.]. Томск, 2004.
4. *Вечканов Е. М., Сорокина И. А.* Основы клеточной инженерии : учеб. пособие. Ростов н/Д, 2012.
5. *Дитченко Т. И.* Культура клеток, тканей и органов растений : метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов. Минск, 2007.
6. *Колокольцова Т. Д., Сабурин И. Н., Кубатиев А. А.* Современные способы выделения и культивирования клеток человека и животных : учеб. пособие. М., 2016.
7. *Попов Б. В.* Регенеративный потенциал мезенхимных стволовых клеток : монография. СПб., 2015.
8. *Прилепский А. Ю., Дроздов А. С., Богатырев В. А., Староверов С. А.* Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов. СПб., 2019.
9. *Руководство* по надлежащей практике производства лекарственных средств для человека : метод. рекомендации. М., 2008.
10. *Строганова И. Я., Трухоненко А. А.* Использование в вирусологии культуры клеток : метод. указания. Красноярск, 2013.
11. *Шестопалов Н. В., Пантелеева Л. Г., Соколова Н. Ф. и др.* Федеральные клинические рекомендации по выбору химических средств дезинфекции и стерилизации для использования в медицинских организациях. М., 2015.

12. *Фрешни Р. Я.* Культура животных клеток : практ. руководство. М., 2018.

13. *Черкасова Е. И., Брилкина А. А.* Работа с культурами клеток : учеб.-метод. пособие. Н. Новгород, 2015.

14. *Moniri M. R., Young A., Reinheimer K. et all.* Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA) // *Cytotechnology*. 2015. Vol. 67, №2. P. 379—386.

*Учебное издание*

**Гончаров** Андрей Геннадьевич  
**Шуплецова** Валерия Владимировна  
**Литвинова** Лариса Сергеевна

ПРОТОКОЛЫ ПОЛУЧЕНИЯ, ВЕДЕНИЯ  
И ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР  
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Часть 3

Учебно-методическое пособие

Редактор *В. Е. Москаленко*  
Компьютерная верстка *Е. В. Денисенко*

Подписано в печать 24.12.2025 г.  
Дата выхода в свет 15.01.2026 г.  
Формат 60×90<sup>1/16</sup>. Усл. печ. л. 4,3  
Тираж 300 (1-й завод 40 экз.). Заказ 145

Издательство Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта  
236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14

