

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания

по проведению самостоятельной работы
по дисциплине «Биология животной клетки в культуре»
для студентов направления подготовки 06.04.01 Биология
Направленность (профиль): «Клеточные и генетические технологии»

ВВЕДЕНИЕ

Цель и задачи освоения дисциплины (модуля)

Цель освоения дисциплины «Биология животной клетки в культуре» - дать теоретические представления о культурах эукариотических клеток, а также практические навыки о приемах и оценке культивирования животных клеток.

Основными **задачами** изучения дисциплины являются:

- изучить морфологию, физиологию и поведение животных клеток в культуре;
- дать информацию о подготовке помещений, оборудования, лабораторной посуды для культивирования клеток;
- вооружить студентов знаниями о разновидностях питательных сред и растворов для культивирования клеток, используемых на практике;
- освоить знания о способах создания и поддержания культур клеток полученных из разных источников;
- развить умения управления процессом культивирования;
- на уровне, необходимом для исследователя, обучить студентов основным навыкам работы по культивированию животных клеток;
- изучить приемы идентификации и методы оценки состояния культивируемых клеток;
- развить способности к самостоятельному анализу, сопоставлению и обобщению теоретических основ биотехнических методов культивирования

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

При изучении дисциплины «Биология животной клетки в культуре» предусмотрено изучение теоретического материала из курса лекций и других рекомендуемых источников при подготовке к лекциям, самостоятельному изучению литературы.

Все типы заданий, выполняемых студентами, в том числе в процессе самостоятельной работы, так или иначе, содержат установку на приобретение и закрепление определенного объема знаний, а также на формирование в рамках этих знаний некоторых навыков мыслительных операций - умения оценивать, анализировать, сравнивать, комментировать и т.д.

Важной составляющей самостоятельной внеаудиторной подготовки является работа с литературой ко всем видам занятий: практическим, собеседованию, написанию доклада. Умение работать с литературой означает научиться осмысленно пользоваться источниками. Прежде чем приступить к освоению научной литературы, рекомендуется чтение учебников и учебных пособий.

В процессе изучения теоретического материала студент должен изучить и законспектировать ответы для раскрытия вопроса для самостоятельного изучения. Конспектирование выполняется на бумаге стандартного формата А4 (210х297мм) или в тетради учащегося.

Конспект – сложная запись содержания исходного текста, включающая в себя заимствования (цитаты) наиболее примечательных мест в сочетании с планом источника, а также сжатый анализ записанного материала и выводы по нему. Для работы над конспектом следует:

- 1) определить структуру конспектируемого материала, чему в значительной мере способствует письменное ведение плана по ходу изучения оригинального текста;
- 2) в соответствии со структурой конспекта произвести отбор и последующую запись наиболее существенного содержания оригинального текста в форме цитат или в изложении, близком к оригиналу;

3) выполнить анализ записей и на его основе – дополнение записей собственными замечаниями, соображениями, «фактурой», заимствованной из других источников и т. п. (располагать все это следует на полях тетради для записей или на отдельных листах-вкладках);

4) завершить формулирование и запись выводов по каждой из частей оригинального текста, а также общих выводов.

Систематизация изученных источников позволяет повысить эффективность их анализа и обобщения. Итогом этой работы должна стать логически выстроенная система сведений по существу исследуемого вопроса. Необходимо из всего материала выделить существующие точки зрения на проблему, проанализировать их, сравнить, дать им оценку. Этой процедуре должны подвергаться и материалы из Интернета во избежание механического скачивания готовых текстов. В записях и конспектах студенту очень важно указывать названия источников, авторов, год издания. Это организует его, а главное, пригодится в последующем обучении. Студент должен взять за правило активно работать с литературой в библиотеке не только СКФУ, но и в других, библиотеках, используя, в том числе, их компьютерные возможности (электронная библиотека в сети Интернет).

Методические рекомендации по подготовке к лабораторным занятиям

При подготовке к лабораторным занятиям рекомендуется изучить контрольные вопросы по данному занятию, теоретический материал из собственных конспектов. Основная форма работы на занятиях – собеседование. Каждый студент должен быть готовым к выступлению по всем поставленным в плане вопросам, проявлять максимальную активность при их рассмотрении. Выступление должно строиться свободно, убедительно и аргументировано. Преподаватель следит, чтобы выступление не сводилось к репродуктивному уровню (простому воспроизведению текста), не допускается и простое чтение конспекта.

Необходимо, чтобы выступающий проявлял собственное отношение к тому, о чем он говорит, высказывал свое личное мнение, понимание, обосновывал его и мог сделать правильные выводы из сказанного. При этом студент может обращаться к записям конспекта, непосредственно к первоисточникам, использовать знание ранее изученных дисциплин и т. д.

Подготовка к экзамену

Перед экзаменом студенту необходимо полностью выполнить все лабораторные работы. При наличии задолженностей по текущей аттестации по данной дисциплине студент к экзамену не допускается. Экзамен по дисциплине предусмотрен в устной форме. Вопросы для подготовки к экзамену.

Вопросы к экзамену (2 семестр)

При ответе на экзамене по дисциплине «Биология животной клетки в культуре» студент должен:

Знать:

- содержание разделов и историю дисциплины;
 - четко представлять перспективу, цели и задачи дисциплины;
 - иметь представление об основных питательных средах и их компонентов необходимых для клеточного культивирования;
 - правила работы в стерильных помещениях;
- области применения клеточных технологий в медицине и научной деятельности.

Вопросы для проверки уровня обученности

Базовый уровень

1. Животная клетка как объект культивирования. История культивирования.
2. Классификация культур животных клеток (по способу культивирования, происхождению, продолжительности культивирования).
3. Иммутизированные клеточные линии (получение, применение).
4. Применение культур клеток в биотехнологии, фармации, медицине.
5. Особенности культивирования животных клеток.
6. Оборудование, необходимое для работы с животными клеточными культурами. Системы и условия.
7. Преимущества культур клеток в качестве модельных объектов.

Повышенный уровень

1. Опухолевые клетки: особенности, культивирование, использование. Культура Hela.
2. Стволовые клетки: особенности, культивирование, использование. Эмбриональные, фетальные, гемопоэтические стволовые клетки.
3. Российское и международное законодательство о биомедицинских и клеточных технологиях.
4. Этические проблемы клеточной инженерии.

Уметь:

- самостоятельно приобретать знания в процессе работы с литературными источниками и выполнении практических заданий;
- самостоятельно ставить опыты, проводить наблюдения, анализировать полученные результаты и формулировать выводы;
- применять полученные теоретические знания и навыки практических исследований в процессе работы в области изучения клеточных технологий;
- использовать полученные знания из области клеточных технологий для углубленного освоения смежных дисциплин;
- пользоваться лабораторным оборудованием и микроскопическим оборудованием.

Владеть:

- техникой приготовления питательных сред для культивирования клеток;
- навыками использования методов микроскопии для изучения клеточного материала;
- цитологическими методами для оценки клеточных культур;
- основными терминами и понятиями в области клеточных технологий;
- навыками работы с общелабораторным и специальным оборудованием.

Вопросы для проверки умений и навыков

Базовый уровень

1. Типы питательных сред для культивирования клеток животных.
2. Выделение первичной культуры клеток на примере фибробластов куриного эмбриона.
3. Замораживание и размораживание клеточных линий (условия, оборудование, среды).

4. Методы определения жизнеспособности животных клеток.
5. Методы окраски культур животных клеток, виды красителей.

Повышенный уровень

1. Субкультивирование адгезивной культуры.
2. Основные типы культуры тканей по методу создания (органная, эксплантная, клеточная культура).
3. МТТ-тест - колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток (принцип, применение).
4. Обеспечение асептических условий в технологии культур клеток животных.

Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций

Процедура проведения экзамена осуществляется в соответствии с Положением о проведении текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации обучающихся по образовательным программам высшего образования в СКФУ. Порядок организации приема экзамена предусматривает обязательное прослушивание курса, выполнение лабораторных работ, участие в учебной работе.

При подготовке к ответу студенту предоставляется право пользования рабочей программой.

Текущая аттестация студентов проводится преподавателями, ведущими лекционные занятия по дисциплине в форме собеседования.

Рекомендуемая литература

Перечень основной литературы:

1. Бажанова, Е. Д. Клеточная гибель – виды, фазы, сигнальные пути. Современные методические подходы к исследованию торможения и стимуляции программированной клеточной гибели: учебное пособие / Е. Д. Бажанова, Д. Л. Теплый. — Астрахань: Астраханский государственный университет, Издательский дом «Астраханский университет», 2019. — 62 с. — ISBN 978-5-9926-1125-0. — Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/99499.html> (дата обращения: 15.04.2022). — Режим доступа: для авторизир. пользователей
2. Кузнецова, Т. А. Морфология и физиология объектов биотехнологии: учебно-методическое пособие / Т. А. Кузнецова, О. Б. Иванченко, Н. Т. Жилинская. — Санкт-Петербург: Троицкий мост, 2020. — 206 с. — ISBN 978-5-6043433-9-5. — Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/99731.html> (дата обращения: 15.04.2022). — Режим доступа: для авторизир. пользователей
3. Попова, И. А. Основы цитологии: учебное пособие для СПО / И. А. Попова. — Саратов: Профобразование, 2019. — 122 с. — ISBN 978-5-4488-0319-2. — Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/86145.html> (дата обращения: 15.04.2022). — Режим доступа: для авторизир. пользователей
4. Соколов, В. И. Цитология, гистология и эмбриология / В. И. Соколов, Е. И. Чумасов, В. С. Иванов. — 3-е изд. — Санкт-Петербург: Квадро, 2021. — 400 с. — ISBN 978-5-906371-15-5. — Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR

SMART: [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/103152.html> (дата обращения: 15.04.2022). — Режим доступа: для авторизир. пользователей

5. Теплый, Д. Л. Основы клеточной физиологии: учебное пособие / Д. Л. Теплый. — Астрахань: Астраханский государственный университет, Издательский дом «Астраханский университет», 2019. — 103 с. — ISBN 978-5-9926-1126-7. — Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/99509.html> (дата обращения: 15.04.2022). — Режим доступа: для авторизир. пользователей

Перечень дополнительной литературы:

1. Зафранская, М. М. Эффект мезенхимальных стволовых клеток при клеточной терапии рассеянного склероза / М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Ю. Е. Демидчик. — Минск: Белорусская наука, 2016. — 214 с. — ISBN 978-985-08-1978-9. — Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/61126.html> (дата обращения: 15.04.2022). — Режим доступа: для авторизир. пользователей
2. Наумова, А. А. Основы клеточной инженерии растений: практикум / А. А. Наумова, Т. А. Наумова, С. А. Кусачева. — Саратов: Вузовское образование, 2019. — 45 с. — ISBN 978-5-4487-0511-3. — Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/86301.html> (дата обращения: 15.04.2022). — Режим доступа: для авторизир. пользователей
3. Зафранская, М. М. Эффект мезенхимальных стволовых клеток при клеточной терапии рассеянного склероза / М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Ю. Е. Демидчик. — Минск: Белорусская наука, 2016. — 214 с. — ISBN 978-985-08-1978-9. — Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/61126.html> (дата обращения: 15.04.2022). — Режим доступа: для авторизир. пользователей
3. Наумова, А. А. Основы клеточной инженерии растений: практикум / А. А. Наумова, Т. А. Наумова, С. А. Кусачева. — Саратов: Вузовское образование, 2019. — 45 с. — ISBN 978-5-4487-0511-3. — Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/86301.html> (дата обращения: 15.04.2022). — Режим доступа: для авторизир. пользователей

Перечень учебно-методического обеспечения самостоятельной работы обучающихся по дисциплине (модулю)

1. Животная клетка в культуре (методы применения в биотехнологии) / Под общ. ред. Проф. Дьяконова Л.П. — М: Изд-во «Спутник+», 2009. — 656 с.
2. Тимченко Л.Д., Вакулин В.Н. Основы микроскопии биообъектов: Учебное пособие. — Ставрополь: Изд-во ИП Светличная С.Г., 2014. — 184
3. Тимченко, Л.Д. (СКФУ). Клеточные технологии: учебное пособие / Л.Д. Тимченко, Г.Н. Блажнова, И.В. Ржепаковский; Сев.-Кав. федер. ун-т. — Ставрополь: ИП Светличная С.Г., 2016. — 132 с.: ил., табл. — Библиогр.: с. 179-183. — ISBN 978-5-9908904-4-2.

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», необходимых для освоения дисциплины (модуля)

1. <http://dlib.eastview.com> - Электронная база данных.
2. <http://elibrary.rsl.ru> — Научная электронная библиотека.
3. <http://www.sciencedirect.com> — Электронная база данных - Эльзевир.
4. <http://www.rsl.ru> — Российская государственная библиотека (отдел диссертаций).
5. <http://www.interscience.wiley.com/> - Полнотекстовые электронные версии журналов по тематикам.

6. <http://search.ebscohost.com> - Электронная база данных EBSCO - (Academic Search Premier - самое крупное в мире собрание научных журналов на английском языке. (Область естественные науки).
7. <http://www.sagepub.com> Sage_STM – это более 100 журналов в области естественных наук.
8. <http://www.maikonline.com/maik/showIssues.do?juid=REN9XPR7W&lang=ru> - Журнал «Онтогенез».
9. <http://idbras.comcor.ru> - Институт биологии развития им. Кольцова РАН

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания

по выполнению лабораторных работ
по дисциплине «Биология животной клетки в культуре»
для студентов направления подготовки 06.04.01 Биология
Направленность (профиль): «Клеточные и генетические технологии»

Цель и задачи освоения дисциплины (модуля)

Цель освоения дисциплины «Биология животной клетки в культуре» - дать теоретические представления о культурах эукариотических клеток, а также практические навыки о приемах и оценке культивирования животных клеток.

Основными **задачами** изучения дисциплины являются:

- изучить морфологию, физиологию и поведение животных клеток в культуре;
- дать информацию о подготовке помещений, оборудования, лабораторной посуды для культивирования клеток;
- вооружить студентов знаниями о разновидностях питательных сред и растворов для культивирования клеток, используемых на практике;
- освоить знания о способах создания и поддержания культур клеток полученных из разных источников;
- развить умения управления процессом культивирования;
- на уровне, необходимом для исследователя, обучить студентов основным навыкам работы по культивированию животных клеток;
- изучить приемы идентификации и методы оценки состояния культивируемых клеток;
- развить способности к самостоятельному анализу, сопоставлению и обобщению теоретических основ биотехнических методов культивирования

СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 1

Тема: Обработка лабораторной посуды, инструментов и режимы стерилизации. Подготовка ламинарного бокса к работе с культурой клеток. Техника работы в ламинарном боксе.

Цель: Отработать методы обработки лабораторной посуды, инструментов и режимы стерилизации. Научиться подготовить ламинарный бокс к работе с культурой клеток. Техника работы в ламинарном боксе.

Теоретическая часть.

Для работы в лаборатории работающей с культурой клеток используют *лабораторную посуду*: чашки Петри, пробирки различного размера, колбы, инструменты, предметные и покровные стекла, стерилизаторы, дистилляторы и т.п.

Посуду моют в специально оборудованных мойках. Новую посуду кипятят в 1 %-ном растворе пищевой соды или мыльной воде в течение 15-20 мин, промывают водой, помещают на несколько часов в слабый раствор соляной кислоты, затем тщательно ополаскивают дистиллированной водой. Посуду, бывшую в употреблении, выдерживают в течение 2 ч в смеси серной кислоты с дихроматом калия (100 частей кислоты, 50 частей дихромата калия на 1000 частей воды), затем моют ершами в горячей воде, кипятят в мыльной воде или в 1 %-ном растворе гидрокарбоната натрия и тщательно прополаскивают. Вымытую посуду помещают в сушильный шкаф. Предметные стекла после мойки протирают чистой полотняной салфеткой и хранят в склянках с притертой пробкой в смеси спирта и эфира или хорошо завернутыми в чистую бумагу.

Посуду для стерилизации готовят следующим способом. Пробирки, колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, завертывают по 10— 15 шт. в бумагу. На колбы надевают бумажные колпачки, перевязывают от попадания пыли.

В один конец градуированных пипеток вставляют ватный тампон, затем вращательным движением обматывают длинной тонкой полоской бумаги шириной 4-5 см. При этом концы пипеток должны быть тщательно завернуты бумагой.

Чашки Петри завертывают по 3-4 шт. в бумагу и стерилизуют в сушильном шкафу или в автоклаве.

Колбы и пробирки, закрытые ватно-марлевыми пробками помещают в стерилизующий аппарат.

Лабораторную посуду и инструменты стерилизуют.

Стерилизация — это полное уничтожение всех микроорганизмов (патогенных и сапрофитных) на стерилизуемом объекте.

Стерилизацию проводят различными методами: кипячением, паром под давлением (в автоклавах), текучим паром (в аппаратах Коха), сухим жаром (в печах Пастера), фильтрованием материала через бактериальные фильтры, прокаливанием на пламени горелки и др.

Стерилизацию кипячением производят в стерилизаторах. Кипячением обычно стерилизуют инструменты в течение 30-40 мин. Однако при этом методе не всегда достигают полного уничтожения микробов. Прокаливание на пламени применяют для стерилизации игл, скальпелей, ножниц, пинцетов и др.

Воздушный метод стерилизации (в сухожаровом шкафу) рекомендуется применять для сухих изделий из металла, стекла и силиконовой резины. Стерилизацию проводят в упаковке из бумаги мешочной непропитанной, бумаги мешочной влагопрочной, бумаги для упаковывания продукции на автоматах марки Е и крафт-бумаге или без упаковки (в открытых емкостях).

В соответствии с ОСТ 42-21-2-85 выделяют два режима стерилизации: 60 минут при 180°C и 150 минут при 160°C. При стерилизации в сухожаровом шкафу необходимо соблюдать несколько правил.

1. Изделия, подлежащие стерилизации, загружают в шкаф в количестве, допускающем свободную подачу горячего воздуха к стерилизуемому предмету.
2. Горячий воздух должен равномерно распределяться в стерилизационной камере.
3. Большие предметы следует класть на верхнюю металлическую решетку, чтобы они не препятствовали потоку горячего воздуха.
4. Стерилизуемые изделия необходимо укладывать горизонтально, поперек пазов кассет, полок, равномерно их распределяя.
5. Недопустимо загружать стерилизатор навалом. Не допускается перекрывать продувочные окна и решетку вентилятора.

После стерилизации в открытой емкости медицинский инструментарий не хранится, а используется сразу. Шприцы в разобранном виде и две иглы укладывают в крафт-пакеты из пергамента или влагопрочной бумаги. Свободный конец пакета дважды подворачивают и заклеивают. На пакете указывают вместимость шприца и дату стерилизации. Стерильность в крафт-пакетах сохраняется в течение 3 суток.

Паровой метод стерилизации. При паровом методе (автоклавировании) стерилизация осуществляется увлажненным воздухом (паром) при повышенном давлении в специальных паровых стерилизаторах (автоклавах). В соответствии с ОСТ 42-21-2-85 выделяют два режима стерилизации:

- 1) 2 атм — 132 °C — 20 мин — рекомендуется для изделий из коррозионно-стойкого металла, стекла, текстильных материалов;
- 2) 1,1 атм — 120°C — 45 мин — рекомендуется для изделий из резины (катетеры, зонды, перчатки), латекса и некоторых полимерных материалов (полиэтилен высокой плотности, поливинил-хлорид).

Резиновые перчатки перед стерилизацией пересыпают тальком для предупреждения их склеивания. Между перчатками прокладывают марлю и каждую пару заворачивают отдельно. Простерилизованные материалы хранят в крафт-пакетах, двухслойной бязевой упаковке или стерилизационных коробках с фильтром (биксах) не более 3 суток.

Материал укладывают в бикс при стерилизации паром под давлением и хранении после стерилизации перевязочного материала, белья, шприцев или резиновых изделий (перчаток, систем для переливания инфузионных растворов). Нельзя подвергать стерилизации паром под давлением режущие инструменты, приборы с оптической системой.

Закладка в бикс осуществляется в определенной последовательности.

1. Отдвигают бандаж, открывают боковые отверстия бикса.
2. Протирают поверхность бикса изнутри и снаружи салфеткой, смоченной 0,5 % раствором аммиака.
3. Выстилают дно и стенки бикса пленкой.
4. Необходимый материал укладывают рыхло в определенном порядке: в вертикальном положении, послойно или секторально.
5. В середину бикса кладут флакон с небольшим количеством бензойной кислоты или другого индикатора для контроля стерильности.
6. Углами пленки закрывают содержимое бикса, сверху кладут еще один флакон с индикатором, несколько марлевых салфеток.
7. Плотнo закрывают крышку бикса и привязывают к его ручке бирку из клеенки, на которой указывают номер отделения, количество и наименование предметов, находящихся в биксе.

8. После стерилизации боковые отверстия бикса закрывают.

При получении бикса обращают внимание на его принадлежность, дату стерилизации и температуру. Стерильные биксы хранят в чехлах. Неоткрытый бикс без фильтра стерильен в течение 3 суток. Если бикс открывают для изъятия части материала, то оставленный материал считается относительно стерильным в течение рабочей смены. Следует помнить, что в биксе со стерильным материалом боковые отверстия должны быть закрыты, а с нестерильным — открыты.

Качество автоклавирования проверяют с помощью бензойной кислоты. В автоклав помещают флакон с кристаллами бензойной кислоты, которая плавится при температуре 132 °С и давлении 2 атм за 20 мин. Можно использовать термоиндикаторную ленту, которая при данном режиме меняет окраску.

Химический метод стерилизации (применение химических препаратов-дезинфектантов и антисептиков). Этот метод используют для изделий из полимерных материалов, резины, стекла, металлов. Стерилизация проводится в закрытых емкостях из стекла, пластмассы или покрытых эмалью (эмаль должна быть без повреждений) при полном погружении изделия в раствор. После этого изделие промывают стерильной водой. Простерилизованное изделие хранится в стерильной емкости (стерилизационной коробке), выложенной стерильной простыней, в течение 3 суток. Для химической стерилизации в соответствии с ОСТ 42-21-2-85 применяют следующие режимы:

- 1) 6% раствор перекиси водорода:
 - при 18 °С в течение 360 мин;
 - 50°С в течение 180 мин;
- 2) 1 % раствор дезоксона-1 при 18 °С в течение 45 мин. Необходимо соблюдать правила химической стерилизации.
 1. Температура растворов в процессе стерилизации не поддерживается.
 2. Раствор перекиси водорода можно использовать в течение 7 суток со дня приготовления при условии хранения в закрытой емкости в темном месте. Далее раствор можно применять только при условии контроля содержания активно действующих веществ.
 3. Раствор дезоксона-1 можно использовать в течение 1 сут.
 4. Стерилизующие растворы применяют однократно.

В качестве модификации химического метода стерилизации применяются способы обработки изделий медицинского назначения газами или парами химических соединений.

В соответствии с ОСТ 42-21-2-85 предусмотрены три метода химической (газовой) стерилизации. Смесь ОБ (окись этилена с бромистым метилом в соотношении 1,0: 2,5). Метод пригоден для стерилизации изделий из полимерных материалов, резины, стекла, металла, кардиостимуляторов, медицинской оптики.

Стерилизация смесью паров воды и формальдегида. Проводится в специальных стационарных формалиновых стерилизаторах. Метод пригоден для изделий из резины, полимерных материалов, металла и стекла. Стерилизацию проводят в упаковке из полиэтилена толщиной 0,06 - 0,20 мм, пергаменты или крафт-бумаги. В качестве стерилизующего агента применяется раствор формалина (по формальдегиду). Режим стерилизации - 300 мин при 75 °С.

Для нейтрализации формальдегида используют 23 - 25 % водный раствор аммиака. Срок хранения изделий, простерилизованных в упаковке из полиэтиленовой пленки, составляет 5 лет, из пергаменты или крафт-бумаги - 21 сут.

Формальдегид из параформальдегида. Стерилизация проводится в камерах из оргстекла (соотношение площади пола камеры к ее объему 1:20), которые имеют перфорированную полку с отверстиями диаметром 0,6 — 0,7 см (одно отверстие на 1 см²). Слой параформальдегида толщиной 1 см равномерно распределяют по дну камеры. Полку устанавливают на уровне 2 см от поверхности. Метод рекомендуется применять для

цельнометаллических режущих инструментов из нержавеющей стали. Стерилизацию проводят без упаковки, размещая изделия на перфорированной полке не более чем в два слоя во взаимно перпендикулярных направлениях. Применяют два режима стерилизации: 300 мин при 22 °С или 360 мин при 14 °С. Срок хранения простерилизованных изделий в стерильной емкости (стерилизационной коробке), выложенной стерильной простыней, составляет 3 сут.

В специальных комнатах проводят влажную уборку с дезинфицирующими агентами. Для надежности стерилизации перед началом работы помещение лаборатории облучают УФ-лучами. Облучение ультрафиолетовыми лучами (260 нанометров) - наиболее часто используется в лабораториях для стерилизации помещений, настольных боксов. При длительном воздействии эти лучи вызывают гибель всех бактерий. Бактерии погибают очень быстро, а споры грибов значительно медленнее. Поэтому в боксах устанавливают бактерицидные лампы БУФ-15 или БУФ-30, которые включаются на 30 минут за 1 час до работы. Кроме того, рекомендуется проводить профилактическое облучение боксов в течение 2 часов. Ламинарный бокс (ламинар) - приспособление для работы в стерильных условиях. Асептические условия в ламинаре создаются с помощью тока воздуха. Ламинарное движение воздуха - движение, при котором струйки воздуха двигаются параллельно, обтекая препятствие равномерными слоями. Ток воздуха, проходя через ламинар, движется к исследователю, что позволяет освобождать внутреннее пространство ламинара от спор микроорганизмов. Другое название ламинарного бокса - установка обеспыливания с горизонтальными или вертикальными потоками воздуха.

Непосредственно перед работой необходимо протереть внутренние поверхности ламинарного бокса 70 % этиловым спиртом, разложить в нем необходимые инструменты и материалы: спирт в закрытой посуде, спиртовку (горелку), спички, простерилизованный инструмент и посуду.

Через 20 минут выключают УФ и включают биофильтры. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный халат и шапочку, руки обрабатывают 70 % спиртом. Пинцеты, скальпели и препаровальные иглы помещают в стакан с 96 % спиртом. Перед каждой манипуляцией инструменты обжигают на пламени спиртовки.

Оборудование и материалы.

Учебная лаборатория, оснащенная оборудованием и техническими средствами обучения: комплект учебной мебели на 16 посадочных места, учебная доска, компьютер с необходимым комплектом лицензионного программного обеспечения. Шкаф ламинарный; Микроскоп световой бинокулярный; Центрифуга; Термостат; CO₂ инкубатор.

Содержание отчета

Виды стерилизации.

Контрольные вопросы.

1. Какие бывают виды ламинарных боксов.
2. Назовите распространенные виды химических дезинфектантов и асептиков.
3. Назовите режимы стерилизации посуды при автоклавировании.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №2

Тема: Выделение клеток из тканей эмбриона птицы (фибробласты).

Цель: изучить стадии выделения клеток из тканей эмбриона птицы (фибробласты).

Теоретическая часть.

Куриные эмбрионы по сравнению с клеточными культурами и подопытными животными значительно реже бывают контаминированы вирусами и микоплазмами, а также обладают сравнительно высокой жизнеспособностью и устойчивостью к различным воздействиям. Для получения чистых культур риккетсии, хламидий и ряда вирусов в диагностических целях, а также для приготовления разнообразных препаратов (вакцины, диагностикумы) используют куриные эмбрионы в возрасте от 8 до 12 дней. О размножении упомянутых микроорганизмов судят по морфологическим изменениям, которые обнаруживают после вскрытия эмбриона на его оболочках.

Для получения суспензии клеток берут куриные эмбрионы 9-11 суточные, которые просматривают на овоскопе, отбирая яйца с подвижными эмбрионами и с хорошо выраженными сосудами. Яйца помещают на столик и протирают раствором спирта и йода, обжигают в пламени горелки. Ножницами убирают скорлупу, пинцетом достают куриный эмбрион и помещают его в стерильную чашку Петри. Далее у эмбриона отсекают голову, верхние и нижние конечности, а так же убирают внутренние органы.

После, эмбрион помещают 1:10 в раствор Хенкса и производят четырехкратную отмывку от эритроцитов и слизи. Затем производят цикл трипсинизации с использованием подогретого до 37⁰C 0,25%раствора трипсина с чередованием раствора Хенкса. После каждой трипсинизации клетки осаждают центрифугированием при 1200 об/мин в течение 10 минут. После 10-12 цикла все осажденные клетки сливают в одну колбу через марлевый фильтр, сложенный в 3-4 раза, добавляют антибиотики, питательную среду и факторы роста, эмбриональную сыворотку КРС. Далее полученные клетки разливают по чашкам Петри или в культуральные матрасы.

Культивирование клеток проводят в CO₂ инкубаторе.

В CO₂ инкубаторе, который также называется «газовый инкубатор», создаются максимально естественные условия для культивирования культур клеток и тканей. Такой способ выращивания живых клеток называется *in vitro* и является основной областью применения CO₂ инкубаторов.

Процесс может занять несколько недель, в течение которых наивысший приоритет всегда отдается условиям роста и безопасности образца. Чтобы гарантировать соблюдение указанных условий, температура, влажность и содержание CO₂ должны максимально точно соответствовать требованиям данных клеточных культур.

Внутренняя камера CO₂ инкубатора полностью изолирована от окружающей среды, чтобы на атмосферу внутри устройства не влияли внешние факторы. Чтобы лаборанты могли следить за образцами во время фазы роста, большинство CO₂ инкубаторов оборудованы стеклянной дверцей, помимо обычной дверцы, которая обеспечивает дополнительную защиту от загрязнения.

Внутренняя камера изготовлена из нержавеющей стали, например нержавеющей стали, и должна иметь как можно меньше острых краев и канавок, чтобы избежать возможного скопления загрязнений. В частности, в такой чувствительной к загрязнению области, как культивирование клеток, всего один единственный микроб может свести на нет результаты нескольких недель работы.

Поступающий воздух, пройдя через стерильный фильтр, должен равномерно распределяться по всему пространству внутренней камеры, поскольку образцы обычно размещаются на полках на разной высоте. Задача состоит в том, чтобы создать одинаковые условия во всем внутреннем пространстве, с целью обеспечить равномерное распределение CO₂ для всех образцов при постоянных климатических условиях и влажности.

CO₂ инкубаторы чаще всего используются в медицинских исследованиях и фармацевтической промышленности. Однако они также используются и в других отраслях, когда необходимо обеспечить стерильные условия для культивирования клеток, чтобы клетки росли в среде, полностью свободной от микробов.

Оборудование и материалы

Учебная лаборатория, оснащенная оборудованием и техническими средствами обучения: комплект учебной мебели на 16 посадочных мест, учебная доска, компьютер с необходимым комплектом лицензионного программного обеспечения. Шкаф ламинарный; Микроскоп световой бинокулярный; Центрифуга; Термостат; CO₂ инкубатор.

Содержание отчета

Стадии получения клеток из тканей эмбрионов кур.

Контрольные вопросы.

1. Какие сутки инкубации куриного эмбриона используют для получения культуры клеток?
2. Почему не используют куриные эмбрионы на последних стадиях развития?
3. Техника посева тканей эмбриона на питательную среду.
4. Какие питательные среды используют для получения культуры клеток?
5. Перечислите факторы роста клеток.
6. Режимы CO₂ инкубатора для клеточной инженерии.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №3

Тема: Оценка фибробластов с использованием инвертированного микроскопа. Методы окраски культуры клеток.

Цель: провести оценку фибробластов с использованием инвертированного микроскопа. Ознакомиться с разными типами окраски

Теоретическая часть.

Оперативное исследование состояния культивируемых клеток наиболее удобно осуществлять с помощью инвертированных микроскопов. Инвертированный микроскоп – это оптический прибор с «перевернутой» конструкцией, которая позволяет вести исследование объекта с его нижней стороны.

Для данного вида микроскопов характерно наличие относительно большого предметного стола, удобного для размещения лабораторной посуды любого размера и формы. Увеличенное расстояние конденсора и большое рабочее расстояние между объектом и объективом дает возможность проводить необходимые манипуляции с образцом, располагать руки оператора и инструменты над предметом исследования. Возможность использования микроманипуляторов делает прибор незаменимым в решении широкого круга задач разного профиля. Объективы прибора скорректированы по качеству изображения в зависимости от толщины стекла и фокусного расстояния.

Толщина объекта, имеющая ограничения для прямых микроскопов, для инвертированных микроскопов большой роли не играет. Их конструкция позволяет исследовать крупные объекты или вещества, расположенные в специальной лабораторной посуде (колбы, чашки Петри, планшеты).

Оценка фибробластов с использованием инвертированного микроскопа осуществляется при помощи программного обеспечения Zen pro. Оценка включает в себя сформированность монослоя, морфологию, размер клеток, ядро клетки.

Фибробласты (от лат. fibra— волокно и греч. βλάστη — росток)— клетки соединительной ткани организма, синтезирующие внеклеточный матрикс. Фибробласты секретируют предшественников белков коллагена и эластина, а также мукополисахариды. Форма фибробластов разнообразна, зависит от уровня их активности и локализации в организме. Активные фибробласты увеличенного размера, имеют отростки, овальное клеточное ядро, богаты рибосомами. Неактивные фибробласты (фибробциты) размером меньше, имеют веретенообразную форму.

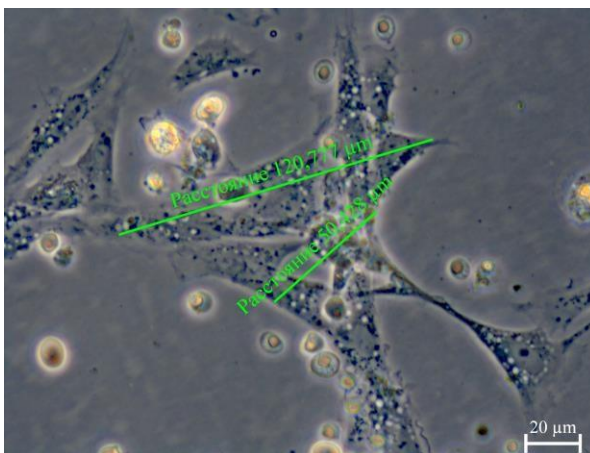


Рисунок 1. Фибробласт куриного эмбриона после первого пассажа

Целью окрашивания является более отчетливое выявление различных компонентов клеток (ядро, хромосомы, цитоплазма, наличие коллагеновых гранул, и т.д.). В основе окрашивания клеток лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция,

абсорбция, растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах. Окрашивание возможно и для мертвых, и для живых клеток. Для живых клеток в настоящее время разработано множество прижизненных красителей, которые позволяют не только окрашивать структуры живых клеток, но и наблюдать динамику внутриклеточных процессов. Окраска живых клеток дает возможность выявлять изменения, происходящие в клетках и тканях при разных внешних воздействиях. По оптическим свойствам различают витальные красители для видимого света и флуоресцентные красители (флуорохромы). По химическим свойствам различают основные и кислотные (кислые) витальные красители. Метод витальной окраски с использованием трипанового синего – это контроль за состоянием проницаемости плазматической мембраны клеток. В случае мертвых клеток они должны быть предварительно законсервированы или зафиксированы, то есть умерщвлены, но так, чтобы по возможности не нарушить естественных морфологических соотношений и не вызвать грубых артефактов. Это возможно сделать с помощью центрифуги специального назначения. Для фиксации культур клеток наиболее распространены фиксаторы на основе формальдегида, спиртов (этанола, метанола), пикриновой кислоты, ацетона. Методы окраски цитологических препаратов следующие: окраска гематоксилин-эозином и по Романовскому-Гимзе позволяет дать характеристику ядер и хроматина клеток; окраска орсеином позволяет выявить хромосомы; окраска по Ван-Гизону позволяет выявить коллагеновые гранулы в фибробластах; дифференциальная окраска хромосом (G- окраска) позволяет определить количество структурного гетерохроматина; Ag-окраска с помощью азотно-кислого серебра позволяет выявить ядрышкообразующие районы хромосом.

Оборудование и материалы

Учебная лаборатория, оснащенная оборудованием и техническими средствами обучения: комплект учебной мебели на 16 посадочных места, учебная доска, компьютер с необходимым комплектом лицензионного программного обеспечения. Шкаф ламинарный; Микроскоп световой бинокулярный; Центрифуга; Термостат; CO₂ инкубатор.

Содержание отчета

Отчет об оценке фибробластов с использованием инвертированного микроскопа.

Отчет о микроморфометрии фибробластов с использованием программного обеспечения Zen pro

Контрольные вопросы.

1. Принцип работы инвертированного микроскопа.
2. Возможности программного обеспечения Zen pro.
3. Какие параметры включает в себя оценка фибробластов.
4. Возможности программного обеспечения Zen pro
5. Микроморфометрия
6. Микрофотография

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №4

Тема: Методики подсчета клеток. Работа на счетчике клеток. Посевная концентрация

Цель: получить навыки подсчета количества клеток в жидкой суспензии.

Теоретическая часть.

Для подсчета клеток и проверки на жизнеспособность производится кратковременная (не более 10 минут) окраска клеток 0,4 мг/мл раствором трипанового синего после разных времен экспозиции клеток с введенным в среду испытуемым веществом. Погибшие клетки окрашиваются в синий цвет, а жизнеспособные остаются неокрашенными. Затем производится подсчет клеток в камере Горяева и насчитывается

процент погибших клеток. Окрашивание в течение указанного короткого времени связано с тем, что при длительном воздействии красителя происходит постепенное его проникновение и окрашивание всех клеток, в результате чего становится невозможно выявить погибшие.

Автоматический счетчик клеток Countess 3 FL – это компактный прибор для подсчета клеток, оснащенный усовершенствованным алгоритмом машинного обучения, надежной оптикой, полностью автоматизированной системой фокусировки и освещения, а также программным обеспечением для анализа изображений для быстрой оценки первичных и иммортализованных культур клеток. Счетчик Countess 3 FL может получать изображения в светлом поле, а также флуоресцентные изображения (используя два дополнительных канала флуоресценции), что позволяет исследователям подсчитывать клетки, контролировать экспрессию флуоресцентного белка, получать информацию об апоптотических процессах и измерять жизнеспособность клеток.

Оборудование и материалы

Учебная лаборатория, оснащенная оборудованием и техническими средствами обучения: комплект учебной мебели на 16 посадочных места, учебная доска, компьютер с необходимым комплектом лицензионного программного обеспечения. Шкаф ламинарный; Микроскоп световой бинокулярный; Центрифуга; Термостат; CO₂ инкубатор.

Содержание отчета

Отчет о подсчете живых и мертвых клеток на счетчике Countess 3 FL.

Контрольные вопросы.

1. Устройство счетчика Countess 3 FL
2. Формула подсчета клеток в суспензии.
3. Определение концентрации клеток
4. Методы определения жизнеспособности клеток

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №5

Тема: Работа на специализированном спектрофотометре/флуориметре с подачей CO₂

Цель: изучить особенности работы на специализированном спектрофотометре/флуориметре с подачей CO₂.

Теоретическая часть.

Разработанный для исследователей в области биологических наук с разнообразными потребностями и требованиями к анализам, многофункциональный анализатор спектрофотометр/флуориметр с подачей CO₂ микропланшетного формата, включает модуль для абсорбции и интенсивности флуоресценции, а также модуль флуоресценции с временным разрешением. Автоматический выбор динамического диапазона, настраивает оптимальный диапазон считывания в зависимости от интенсивности сигнала. Анализатор укомплектован диспенсером для добавления реагентов, встроенным шейкером, контролем температуры и газа, функциями придонного считывания и спектрального сканирования.

Анализатор является многофункциональным инструментом для загруженных лабораторий и поддерживает следующие технологии измерения: • Абсорбция (видимое УФ излучение, в т.ч. коррекцию оптического пути) • Интенсивность флуоресценции (включая метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET)) • Флуоресценция с временным разрешением (в т.ч) резонансный перенос энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET).

Устройство осуществляет выбор длины волны измерения с использованием фильтров или монохроматоров в зависимости от того, какой вариант оптимально подходит для каждой технологии измерения: • Монохроматоры для абсорбции и

интенсивности флюоресценции • Фильтры для AlphaScreen и флюоресценции с временным разрешением.

Анализатор микропланшетного формата включает встроенный газовый модуль для регулирования концентрации CO₂ и O₂ для клеточного анализа.

Анализатор оснащен несколькими видами автоматической проверки, включая: • Проверку планшета, для предотвращения случайного начала измерения или дозирования без наличия микропланшета в лотке • Проверку загрузки, для подтверждения загрузки диспенсера перед началом цикла • Датчики позиционирования, для подтверждения правильности расположения головок диспенсеров для каждого анализа • Проверку объема для предотвращения дозирования очень больших объемов • Проверку шейкера, для контроля скорости и силы встряхивания в зависимости от формата планшета, предотвращающую случайное расплескивание Самодиагностика и автокалибровка инструмента. При каждом запуске устройства сложная система самодиагностики выполняет полный спектр инициализации и регулировки механических, электрических и оптических функций для подтверждения готовности к работе. Устройство также осуществляет автоматическую калибровку в начале каждого цикла и во время работы (если позволяет время) для обеспечения устойчивых и сопоставимых результатов анализов. Работа на приборе осуществляется на программе SkanIt

Оборудование и материалы

Учебная лаборатория, оснащенная оборудованием и техническими средствами обучения: комплект учебной мебели на 16 посадочных места, учебная доска, компьютер с необходимым комплектом лицензионного программного обеспечения. Шкаф ламинарный; Микроскоп световой бинокулярный; Центрифуга; Термостат; CO₂ инкубатор.

Содержание отчета

Отчет о работе на специализированном спектрофотометре/флуориметре с подачей CO₂

Контрольные вопросы.

1. Устройство спектрофотометра/флуориметра с подачей CO₂
2. Характеристика специализированной программы

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №6

Тема: Криоконсервация клеток

Цель: получить навыки замораживания и размораживания клеточной культуры

Теоретическая часть.

Для сохранения уникальных впервые полученных культур клеток, сохранения клеток определенного уровня дифференцировки, а также создания запаса клеток на одном пассажном уровне используют метод криоконсервации клеток. Важным моментом является создание оптимальных условий заморозки и разморозки клеток, при которых достигается минимальное повреждение клеток от образования внутриклеточных кристаллов льда. Протокол криоконсервации основан на экспериментах по оптимизации среды для криоконсервирования, концентрации криопротектора и режима охлаждения клеток различного происхождения. Применение криопротекторов, как правило, в количестве от 2 до 10% от объема, позволяет снизить повреждающее действие физико-химических факторов при криоконсервировании. Экспериментальные данные показали, что криопротектор ДМСО (диметилсульфоксид) или глицерин при заморозке не образует кристаллов внутри клеточных органелл, что обеспечивает не только более высокую жизнеспособность клеток, но также и сохранение их морфофункциональных свойств. Сыворотка крови также обладает 37 криопротективными свойствами, поэтому в среду для консервации добавляют от 10 до 20% сыворотки крови животных. При замораживании клеточной суспензии необходимо обеспечить скорость понижения температуры около 1оС в минуту. Для этой цели используют программируемые замораживатели или специальные контейнеры, например Mr.Frosty (Nalgene, США), которые при помещении в

низкотемпературный холодильник (-80°C) создают необходимую скорость замораживания. При отсутствии подобных приспособлений в качестве контейнеров можно использовать небольшие пенопластовые коробки с крышкой, которые также помещают на сутки в низкотемпературный холодильник (минус 80°C), после чего ампулы с клетками переносят в жидкий азот.

Оборудование и материалы

Учебная лаборатория, оснащенная оборудованием и техническими средствами обучения: комплект учебной мебели на 16 посадочных мест, учебная доска, компьютер с необходимым комплектом лицензионного программного обеспечения. Шкаф ламинарный; Микроскоп световой бинокулярный; Центрифуга; Термостат; CO₂ инкубатор.

Контрольные вопросы.

1. Виды сред для криозаморозки.
2. Этапы заморозки культур клеток.
3. Этапы разморозки культур клеток.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №7

Тема: Методика оценки влияния веществ и материалов на культуре клеток

Цель: получить навыки оценки влияния веществ и материалов на культуре клеток.

Теоретическая часть.

Клеточные культуры являются самым распространенным тест-объектом для оценки токсичности различных веществ. Работа с клеточными линиями не так сложна и трудоемка, как с лабораторными животными, и позволяет не только оценить воздействие различных субстанций на клеточном уровне, но и спрогнозировать возможные токсические последствия для всего организма. В данном пособии рассмотрена процедура определения токсичности разных концентраций ДМСО. При определении токсического действия какого-либо вещества интерес представляют следующие параметры: максимальная недействующая концентрация NOEC, минимальная действующая концентрация LOEC, полуметальная концентрация LC₅₀, полностью летальная концентрация LC₁₀₀. Основными способами контроля и определения жизнеспособности популяции являются: 1) микроскопия, в том числе с использованием флуоресцентных красителей, для выявления патоморфологических изменений в клетках; 2) тесты на определение жизнеспособности, выражающейся в активности внутриклеточных ферментов (MTT, LDH); 3) специфические тесты, например, пересев клеток после инкубирования с токсикантом для определения приживаемости и т.д. Рассмотрим более подробно методы, применяемые в данном пособии: МТТ-тест, окрашивание флуоресцентными красителями и окрашивание трипановым синим. МТТ-тест заключается в определении митохондриальной активности клеток. Он основан на восстановлении (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Нтетразолиум бромид (МТТ) клеточными ферментами – оксиредуктазами. В результате восстановления образуется водонерастворимый формазан, количество которого коррелирует с количеством жизнеспособных клеток. Определить количество формазана можно оптическим методом с помощью спектрофотометра, поскольку раствор формазана поглощает свет на длине волны около 540 нм. Данный метод еще называют определением дыхательной активности клетки. Стандартным способом определения токсических концентраций является последовательное разведение токсиканта с заданным шагом. Концентрация исследуемых веществ при постановке МТТ-теста высчитывается из следующего принципа: в первой лунке с самой большой концентрацией должна наблюдаться полная гибель клеток, а в последней лунке с самой маленькой концентрацией не должно быть отличий от контроля. Самым распространенным методом является метод двойных разведений, когда в каждой следующей лунке концентрация токсиканта в два раза меньше, чем в предыдущей. В тех случаях, когда токсическое действие вещества неизвестно, за основу берут токсическое

действие схожих по химическому строению веществ и проводят сначала десятикратные разведения, а затем двойные. В особых случаях можно делать 10% разведения. Метод селективного окрашивания флуоресцентными красителями основывается на способности некоторых флуорохромов связываться с определенными клеточными органеллами или селективно проникать только в поврежденные клетки. Самым распространенным является окрашивание с использованием пропидия йодистого, который проникает только через мембраны мертвых клеток. Данная особенность позволяет селективно окрасить клеточную популяцию. В качестве парного красителя можно использовать любой неселективный флуорохром, например акридиновый оранжевый или флуоресцеин. Таким образом, подбирая флуоресцентные красители так, чтобы они окрашивали в разные цвета живые и мертвые клетки, можно оценить степень жизнеспособности популяции. Помимо вышеописанного способа, существует еще несколько базовых способов определения жизнеспособности клеток с помощью флуоресцентных красителей, в частности, по состоянию нуклеиновых кислот 14 (DAPI и акридиновый оранжевый, АО), по концентрации определенных молекул (Flu-LDH). Оценка жизнеспособности клеток по состоянию нуклеиновых кислот несколько сложнее, чем по состоянию клеточной мембраны, поскольку в данном случае необходимо дифференцировать клетки с частично оранжевыми ядрами. Еще одним флуоресцентным методом является использование так называемых селлтрекеров (от англ. Cell Tracker – клеточная метка). Эти красители, например 5-хлорметилфлуоресцеин диацетат (CM-FDA), не флуоресцируют, но, проникая внутрь живой клетки, подвергаются действию неспецифических диэстераз, после чего начинают флуоресцировать. Модификация позволяет красителю наследоваться от материнской клетки к дочерней и сохранять свою флуоресценцию до 72 часов. С помощью данного красителя можно оценить скорость пролиферации клеток после воздействия токсиканта, миграцию клеток, и т.д. Детальнее ознакомиться с селлтрекером можно по ссылке. Альтернативным методом определения жизнеспособности является окрашивание абсорбционным красителем трипановым синим. Этот метод можно отнести к методам, основанным на проницаемости клеточных мембран, однако он не является флуоресцентным. Трипановый синий проникает через мембраны мертвых клеток и окрашивает их в синий цвет, в результате чего они отличаются от живых клеток в фазово-контрастном микроскопе. Одновременное применение нескольких методов позволяет избежать возможной ошибки из-за неконтролируемого вклада токсиканта в оптическую плотность при МТТ-тесте, а также возможную флуоресценцию препаратов при исследовании во флуоресцентном микроскопе. Результаты тестов необходимо объединить и изучить на предмет того, какие концентрации совпадают во всех тестах, а какие нет. Для получения достоверных данных эксперимент необходимо полностью повторить несколько раз.

Клеточные культуры являются самым распространенным тест-объектом для оценки биостимулирующей и других специфических активностей. В данном пособии рассмотрена процедура определения биостимулирующей активности гидролизата эмбриональных тканей птиц. Основными способами контроля и определения жизнеспособности популяции являются: 1) микроскопия, в том числе с использованием флуоресцентных красителей, для выявления патоморфологических изменений в клетках; 2) тесты на определение жизнеспособности, выражающейся в активности внутриклеточных ферментов (МТТ, LDH); 3) специфические тесты, например, пересев клеток после инкубирования с токсикантом для определения приживаемости и т.д. Рассмотрим более подробно методы, применяемые в данном пособии: МТТ-тест, окрашивание флуоресцентными красителями и окрашивание трипановым синим. МТТ-тест заключается в определении митохондриальной активности клеток. Он основан на восстановлении (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Нтетразолиум бромида (МТТ) клеточными ферментами – оксиредуктазами. В результате восстановления образуется водонерастворимый формазан, количество которого коррелирует с количеством

жизнеспособных клеток. Определить количество формазана можно оптическим методом с помощью спектрофотометра, поскольку раствор формазана поглощает свет на длине волны около 540 нм. Данный метод еще называют определением дыхательной активности клетки. Для получения достоверных данных эксперимент необходимо полностью повторить несколько раз.

Оборудование и материалы

Учебная лаборатория, оснащенная оборудованием и техническими средствами обучения: комплект учебной мебели на 16 посадочных места, учебная доска, компьютер с необходимым комплектом лицензионного программного обеспечения. Шкаф ламинарный; Микроскоп световой бинокулярный; Центрифуга; Термостат; CO₂ инкубатор.

Содержание отчета

Отчет об определении цитотоксичности ДМСО на культуре фибробластов эмбрионов кур.

Отчет об определении биостимулирующей активности гидролизата на культуре фибробластов эмбрионов кур.

Контрольные вопросы.

1. Оценка цитотоксичности с использованием инвертированного микроскопа
2. Методика МТТ анализа
3. Оценка цитотоксичности на специализированном спектрофотометре/флуориметре с подачей CO₂