

Министерство науки и высшего образования РФ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Г.Г.Полянская, Т.Н. Ефремова, А.М.Кольцова, А.С. Мусорина,
Н.С. Шарлаимова, Т.К. Яковлева

**МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
ПО РАБОТЕ С КЛЕТОЧНЫМИ
КУЛЬТУРАМИ
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

Санкт-Петербург
Издательство Политехнического университета
2019

УДК 576.5(075.4)

М54

Авторы:

Г.Г. Полянская, Т.Н. Ефремова, А.М. Кольцова, А.С. Мусорина,

Н.С. Шарлаимова, Т.К. Яковлева

Методическое пособие по работе с клеточными культурами человека и животных: / Г.Г.Полянская [и др.] – СПб.: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2019. – 114 с.

Книга содержит информацию, подтверждающую необходимость соблюдения определенных стандартных условий при получении и культивировании клеточных культур разного происхождения. Описаны основные методы работы с клеточными культурами, проводимыми в ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», приведен перечень реактивов и лабораторного оборудования, необходимого для культивирования клеточных линий. Описаны методы получения диплоидных клеточных линий, выделенных из разных источников.

Представленное методическое пособие предназначено для повышения квалификации биологов, планирующих использовать в своих исследованиях клеточные культуры.

Утверждено к печати в Институте цитологии РАН.

© Институт цитологии

Российской академии наук, 2019

© Санкт-Петербургский политехнический

университет Петра Великого, 2019

ISBN 978-5-7422-6602-0

Оглавление

Введение.....	4
Основные типы, образование, характеристики и изменчивость клеточных линий.....	7
Основные методы (протоколы) культивирования и анализа коллекционных клеточных линий.....	26
Протокол № 1. Пополнение фонда Коллекции, подготовка клеточных образцов, процедура пересева коллекционных клеточных линий.....	29
1.4.1. Процедура декриоконсервации клеточных линий и высева клеток в культуральный сосуд....	33
1.4.2 Процедура пересева монослойных клеточных линий (объемы указаны при работе с флаконами площадью 25 см ² или чашками Петри диаметром 6 см).....	33
1.4.3. Процедура пересева суспензионных клеточных линий.....	34
ДОПОЛНЕНИЕ: Инструкция для подсчета клеток в камере Горяева.....	36
Протокол № 2. Криоконсервация коллекционных клеточных линий.....	38
Протокол № 3. Контроль качества коллекционных клеточных линий.....	42
3.1 Характеристика морфологии клеточной линии.	42
3.2 Определение жизнеспособности клеток после криоконсервации.....	44

3.3 Микробиологический контроль контаминации клеточных линий.....	46
3.3.4.1. Контроль бактериальной, дрожжевой контаминаций и контаминации мицелиальными микроорганизмами.....	50
3.3.4.2. Контроль микоплазменной контаминации.	50
3.4. Контроль микоплазменной контаминации клеточных линий с помощью ПЦР-анализа (Wong-Lee, Lovett, 1993; Eldering et al., 2004).....	55
3.5 Цитогенетический анализ коллекционных клеточных линий.....	62
Протокол № 4. Получение и характеристики неиммортизированных (диплоидных) клеточных линий.....	72
4.4.1 Получение клеточных линий с помощью механического выделения клеток из фрагмента ткани.....	76
4.4.2 Получение клеточных линий с помощью ферментативного выделения клеток из фрагмента ткани.....	78
4.4.3 Получение линий мезенхимных стволовых клеток (МСК) из колоний эмбриональных стволовых клеток человека.....	79
4.5. Получение клеточных сфероидов из линий МСК человека.....	81
4.7 Определение статуса полученных клеточных линий.....	83
4.7.4 Процедура подготовки клеточных культур к определению экспрессии поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии.....	85

4.7.5 Процедура индукции и идентификации дифференцировки в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях.....	86
Дополнительная информация о неиммortalизованных клеточных линиях.....	92
Список литературы.....	94

Введение

Использование клеточных культур, выделенных из разных органов и тканей человека и животных, началось в конце XIX века. Широкое распространение методов изолирования и поддержания жизнеспособности разных клеток *in vitro* относится к середине 50-х годов прошлого века. Это был существенный прорыв в биологической науке, т.к. использование клеточных культур позволило исследовать биологические процессы, которые сложно, а подчас невозможно, изучить в целом организме. Имеются в виду такие процессы, как пролиферация, регуляция экспрессии генов, дифференцировка клеток и др. Клеточные культуры имеют также большое значение для решения прикладных задач медицины, сельского хозяйства, биотехнологии. К основным задачам следует отнести: производство противовирусных препаратов, получение моноклональных антител с помощью методов гибридомной технологии, лечение тяжелых заболеваний с помощью методов генной инженерии (создание генетических структур с определенными свойствами), трансплантационная медицина, фармакология, повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и выведение новых сортов растений, сохранение биоразнообразия генофонда путем криоконсервации соматических и половых клеток животных и растений. В настоящее время в мире получено огромное количество клеточных культур, имеющих разное видовое и тканевое происхождение.

Клеточные процессы в нормальных клеточных популяциях *in vivo* находятся под постоянным контролем интегральных систем организма и

обусловлены межклеточными и межклеточными взаимодействиями. Известно, что клетки в тканях контактируют с сетью макромолекул, образующих внеклеточный матрикс (ВКМ). Матрикс способствует поддержанию многоклеточных структур и создает каркас, внутри которого клетки могут мигрировать и взаимодействовать друг с другом с помощью разных межклеточных контактов. Степень изменчивости клеточных свойств контролируется стабилизирующим отбором, который поддерживает норму над возможными нарушениями (Вахтин, 1980). При переходе клеток в состояние *in vitro* исключается организменный контроль клеточных процессов. Основными типами клеточного взаимодействия в культуре становятся физический контакт между клетками, между клетками и субстратом, представляющим собой синтезированный самими клетками внеклеточный матрикс, а также химическая связь через метаболиты в ростовой среде. Эти взаимодействия объединяют клетки в единую клеточную популяцию *in vitro*, представляющую собой автономную систему. Межклеточные контакты осуществляют как структурные, так и функциональные связи между клетками. Важным типом межклеточных соединений являются щелевые контакты, которые составляют основу «метаболической кооперации». Щелевые контакты сформированы из межклеточных каналов, называемых коннексаонами. Коннексаон представляет собой структуру из 6 субъединиц семейства интегральных мембранных белков – коннексинов. В открытом состоянии коннексаоны организуют прямой гидрофильный канал между цитоплазмами двух соседних клеток, по которым растворимые в воде вещества с молекулярной массой не более 1000 Да и максимальным диаметром около 1.5 нм могут прямо диффундировать из клетки в клетку, минуя наружную среду. Подобная диффузионная связь позволяет соседним клеткам обмениваться разными соединениями: неорганическими ионами, вторичными

мессенджерами, клеточными метаболитами, сигнальными и регуляторными молекулами, а также микро-РНК. Локальные межклеточные взаимодействия посредством этих каналов вовлечены в разные клеточные процессы, включая поддержание клеточного гомеостаза, контроль клеточной пролиферации, малигнизацию, апоптоз, эмбриональную индукцию и дифференцировки (Cox et al., 1972; Hooper, Subak-Sharpe, 1981, Шаровская и др., 2009). В последние десятилетия широко исследуется участие внеклеточных везикул в нормальных и в патологических клеточных процессах. Они осуществляют межклеточные взаимодействия посредством переноса белков, липидов и нуклеиновых кислот (Andaloussi et al., 2013; Katsuda et al., 2013; Liang et al., 2016; Chew et al., 2019; Sun et al., 2019).

Таким образом, исследования, проводимые на клеточных культурах, с одной стороны, являются моделью для исследования клеточных процессов, происходящих в организме, т.к. микроокружение, в котором находились клетки в организме до перевода в условия *in vitro*, способствует проявлению природных организменных свойств. С другой стороны, являясь автономной биологической системой, позволяют проводить исследования, характерные для клеточных популяций *in vitro*. Клеточные культуры, потеряв организменный контроль, становятся динамичными системами, склонными к изменчивости их характеристик. В связи с этим, в первом разделе данной книги представлена информация, подтверждающая необходимость соблюдения определенных экспериментальных условий при получении и культивировании клеточных культур разного происхождения. Во втором – представлены основные методы работы с клеточными культурами, позволяющие нивелировать изменчивость клеточных популяций и получать стабильные результаты экспериментов с использованием клеточных культур.

Основные типы, образование, характеристики и изменчивость клеточных линий

Существует два основных типа клеточных линий: неиммortalизованные или диплоидные клеточные линии и immortalизованные или постоянные клеточные линии. Необходимо отметить, что, независимо от типа, в зависимости от длительности культивирования различают первичные культуры и клеточные линии. Первичная культура – это клетки, полученные непосредственно из организма и культивирующиеся до первого пересева (пассажа). После пересева клеточная культура становится клеточной линией. Это определение первоначально было дано Терминологическим комитетом Ассоциации тканевых культур в журнале *In Vitro*, 1984, 20 (1): 19 – 24.

Неimmortalизованные клеточные линии имеют преимущественно диплоидный кариотип, характерный для организма донора. Еще одним общим свойством клеток этих линий является ограниченный срок жизни, который определяется не длительностью культивирования, а числом удвоений клеточных популяций, характеризующим уровень пролиферативной активности. С увеличением числа клеточных удвоений в процессе культивирования диплоидных линий пролиферация клеток постепенно прекращается, и клеточная популяция входит в фазу репликативного старения. Репликативное старение представляет собой комплексный процесс, сопровождающийся укорочением теломер, происходящим при каждом цикле репликации ДНК и, соответственно, при каждом клеточном делении вследствие выключения фермента теломеразы; морфологическими изменениями; увеличенной активностью β -галактозидазы; повышением уровня экспрессии туморсупрессорных генов;

уменьшением дифференцировочного потенциала; уменьшением репарации ДНК и антиоксидантной активности стареющих клеток; рядом эпигенетических изменений (Прайс, 1997; Хейфлик, 1997; Bodnar et al., 1998; Wagner et al., 2008; Kuilman et al., 2010; Redaelli et al., 2012; Estrada et al., 2013; Savickiene et al., 2016; Danisovic et al., 2017; Кольцова и др., 2017, 2018; Alessio et al., 2018; Крылова и др., 2018; Niedernhofer et al., 2018; Yu et al., 2018; Truong et al., 2018). Дальнейшей судьбой клеток в фазе репликативного старения может быть либо последующая дегенерация и гибель клеток, либо длительное существование живых клеток с крайне низкой пролиферативной активностью без спонтанного приобретения неограниченного пролиферативного потенциала (Hayflick, 1965; Matsumura et al., 1979), а также возможное переключение на другой метаболический путь (Гаврилов, Гаврилова, 1991). Следует отметить, что в стационарной фазе, до активного репликативного старения, клеточные популяции отражают свойства, присущие источнику, из которого выделены клетки с возможными эпигенетическими изменениями, связанными с условиями жизни *in vitro*, т.е. вне организма.

Образование постоянных клеточных линий, т.е. приобретение ими свойства иммортализации, сопряжено со многими генетическими и цитогенетическими изменениями в клеточных популяциях. Большое количество клеточных линий имеют опухолевое происхождение, т.е. они выделены из опухолевых тканей, образованных в организме. Таким образом, процесс иммортализации, в данном случае злокачественной трансформации клеток, прошел *in vivo*. Процесс иммортализации связан с нарушением функций ряда ключевых генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, таких как опухоляторный ген p53, также Rb, Raf-1, p16^{INK4} и др. Процесс иммортализации всегда связан со стабилизацией

длины теломер, в основном, с помощью теломеразы, но есть и другие механизмы, называемые альтернативными механизмами удлинения теломер (ALT). Одним из них может быть нереципрокно-рекомбинационный механизм. В процессе иммортализации, имеющем всегда одинаковый конечный результат, могут быть вариации в промежуточных стадиях между разными видами животных или разными тканями организма (Дункан, Реддел, 1997; Реддел и др., 1997; Kiyono et al., 1998; Sherr, De Pinho, 2000).

В отличие от диплоидных клеточных линий, сохраняющих нормальный кариотип, образование иммортализованных клеточных линий часто связано с существенной перестройкой кариотипической структуры. В результате этого процесса наступает стабилизация кариотипической структуры, в большинстве случаев характеризующаяся постоянным набором маркерных хромосом («маркерные линии»). Но в ряде случаев наблюдается структурное соответствие кариотипу донора («безмаркерные линии»), т.е. стабилизация происходит только на геномном уровне (Мамаева, 1984, 1996; Полянская. 2000; Poljanskaya, Vakhtin, 2003). Тем не менее, в иммортализованных линиях, независимо от типа линии, всегда имеет место выраженная частота клеток с модальным числом хромосом, частота клеток с другими числами хромосом и определенными пределами изменчивости по числу хромосом. Клетки с любым выраженным числом хромосом имеют преобладающий структурный вариант кариотипа (СВК - число гомологичных хромосом каждого морфологического типа), который в клетках с модальным числом хромосом называется основным, а также имеют место дополнительные СВК. В результате анализа количественной кариотипической изменчивости в клеточных популяциях разных линий при исследовании большого числа индивидуальных хромосом или групп хромосом с помощью статистических методов обнаружен ряд

закономерностей, свойственных разным типам клеточных линий. Так, сбалансированность кариотипической структуры клеточной популяции *in vitro* обусловлена определенными соотношениями СВК, которые устанавливаются в результате ограниченной частоты отклонений по числу индивидуальных хромосом, а также в результате взаимосвязи разных хромосом при одновременных численных отклонениях от основного СВК (Полянская, 2000; Poljanskaya, Vakhtin, 2003).

Особым типом клеточных культур являются линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Линии ЭСК, выделенные из ранних эмбрионов млекопитающих, являются уникальными плюрипотентными клеточными популяциями *in vitro*. Одной из важных характеристик этого типа линий является неограниченная пролиферация клеток, значительно превышающая 60 удвоений клеточной популяции (число Хейфлика) при отсутствии периода репликативного старения за счет поддержания высокой теломеразной активности, обеспечивающей стабильную длину теломер, необходимую для поддержания пролиферативной активности. Таким образом, с одной стороны, эмбриональная стадия, на которой выделены ЭСК, обеспечивает природную иммортализацию этих клеток, а с другой стороны, линии ЭСК имеют устойчивый нормальный кариотип. Линии ЭСК являются уникальной экспериментальной моделью для фундаментальных исследований в разных областях клеточной и молекулярной биологии, а также для прикладных исследований, в области регенеративной медицины, фармакологии и токсикологии. Первые постоянные линии ЭСК человека были получены в США (Thomson et al., 1998). В настоящее время в разных странах мира существуют уже несколько сотен постоянных линий ЭСК человека. В ЦКП «Коллекция клеточных культур позвоночных» (КККП) также получено несколько линий ЭСК человека (Кольцова и др., 2011, 2012, 2016;

Lifantseva et al., 2011). Одна из них введена в фонды КККП. Надо подчеркнуть, что ЭСК человека действительно являются адекватной моделью для проведения многосторонних фундаментальных исследований. Но для использования их в регенеративной медицине необходимо преодолеть ряд препятствий, которые подробно освещены во многих публикациях. В данной работе мы не будем на этом останавливаться.

Надо подчеркнуть, что кариотипическая структура клеточной линии не является полностью отличной от таковой в организме, из которого она произошла. Некоторые закономерности кариотипической изменчивости клеток в культуре сходны с таковыми в условиях организма. Происхождение клеточных популяций из определенной ткани определяет многие свойства этой ткани и в условиях *in vitro*. Микроокружение, в котором клетки находились в организме, способствует проявлению определенных свойств и в клеточных культурах, что позволяет использовать эти популяции в качестве модели для исследования различных организменных процессов. Но, тем не менее, клеточная популяция *in vitro* является автономной системой, которая имеет и свои особенности по сравнению с организмом. Эти особенности связаны с различиями между функциями, осуществляемыми клетками в условиях *in vivo* и *in vitro*. Существенной функцией клеточных популяций *in vitro* является пролиферация, которая необходима для длительного поддержания их вне организма. По-видимому, адаптация клеточных популяций к условиям *in vitro* происходит за счет хромосомных, генных и эпигенетических изменений, представляющих собой изменения экспрессии генов или фенотипа клетки, вызванные механизмами, не затрагивающими структуры генов. Структурные и количественные хромосомные изменения являются инструментом, с помощью которого достигается необходимый для существования клеточной

популяции генный баланс. Известно, что существует функциональная связь между генами, ответственными за геномную стабильность и анеуплоидию, а функционально связанные гены могут быть локализованы в разных хромосомах. Так, в частности, гены, контролирующие углеводный обмен у человека, находятся в разных хромосомах. Возможно, что пределы количественной кариотипической изменчивости *in vitro* обусловлены установлением определенной дозы функционирующих генов, продукты которых находятся как в клетках, так и в окружающей их среде, и регулируют, таким образом, структурно-функциональную организацию кариотипа клеточной популяции. Известно, что кариотип является единой генетической системой, функциональный смысл которой состоит во взаимосвязи отдельных ее элементов (Оно, 1973; McKusick, 1980; Макгрегор, 1986; Strauss, 1990; Costello et al., 1994; Ouspenski et al., 1995; Вахтин, 1974; Мамаева, 1996; Полянская, 2000; Poljanskaya, Vakhtin, 2003).

Таким образом, очевидно, что стабильность генома необходима для проявления определенных клеточных характеристик. Очевидно также, что, лишившись многоступенчатого организменного контроля, клеточные популяции *in vitro* являются динамичными системами, и в значительной степени подвержены влиянию внешних факторов. Необходимость использования клеточных культур для различных исследований повлекла активное изучение влияния разных факторов на стабильность клеточных характеристик. Под внешними факторами следует понимать факторы, как присутствующие при культивировании клеток (культуральная среда, сыворотка, качество культуральной посуды, тип и концентрация антибиотиков, условия криоконсервации, температурный режим и т. д.), так и прочие, которые могут способствовать созданию неблагоприятных условий (бактериальная или микоплазменная контаминация, нарушения в

режиме культивирования и т. д.). Некоторые факторы можно контролировать в процессе культивирования, другие не поддаются контролю, например, качественный состав сыворотки. В связи с этим в клеточных популяциях *in vitro* может усиливаться полиморфизм по некоторым признакам, включая усиление кариотипической нестабильности. Причиной кариотипической изменчивости являются накапливаемые наследственные изменения под действием меняющихся условий внешней среды, которые могут способствовать изменению других свойств, присущих определенной клеточной линии.

Следует отметить, что само длительное культивирование может явиться дестабилизирующим фактором, т.к. сопряжено с постоянными пересевами клеток, и в связи с этим с нарушением связи с субстратом, сменой культуральной посуды, ростовой среды и т.д. В частности, показано, что при длительном культивировании было ослаблено свойство туморогенности в клеточных культурах мыши SLU-5 и DMS-402, полученных от плазмоцитомы MORS-21. Изменениям в степени злокачественности сопутствовал ряд нарушений в кариотипической структуре, в частности, структурная перестройка маркера m10 (Shepard et al., 1979). Показано, что длительное культивирование способствует усилению количественной и структурной кариотипической изменчивости в постоянной клеточной линии почки кенгуровой крысы NBL-3-17 (Levan, 1970; Полянская, Ефремова, 1996). Протеомный анализ показал, что при длительном культивировании разных клеточных линий в процессе пересевов, т.е. при снятии клеток с подложки с помощью кратковременной обработки раствором трипсин/ЭДТА, происходят изменения в передаче сигналов в важных клеточных процессах, которые могут нормализоваться только через некоторое время после воздействия. Из этих результатов можно сделать вывод, что чем короче

время трипсинизации при снятии клеток с субстрата, тем меньше отрицательных воздействий оказывается на клетки (Huang et al., 2010). Особое место процесс длительного культивирования занимает в диплоидных неиммortalизованных клеточных линиях в связи с репликативным старением, сопровождающимся изменением многих клеточных свойств, перечисленных выше. Поэтому при использовании диплоидных клеточных культур в экспериментальной работе необходимо учитывать сроки начала активной фазы репликативного старения или использовать только ранние пассажи.

Нефизиологические значения pH, особенно в кислой области, приводят к увеличению уровня хромосомных aberrаций в культивируемых клетках (Тартаковский, 1988; Morita et al., 1990, 1991).

Существенно поддерживать постоянный уровень кислорода при кратковременном и длительном культивировании клеточных культур, т.к. повышенное содержание кислорода в атмосфере оказывает генотоксическое действие на культивируемые клетки. Известно, что в организме и в клеточных популяциях возникают активные формы кислорода (АФК). Клетки имеют защиту от чрезмерного повышения уровня АФК за счет антиоксидантов. Увеличение концентрации атмосферного кислорода увеличивает уровень АФК, и защитные механизмы не могут справиться с этой опасной для жизни клетки ситуацией (Sturrock, Nunn, 1978; Gille et al., 1989; Скулачев, 1997). При длительном культивировании (1-2 года) в атмосфере с повышенным содержанием кислорода в концентрации от 50 до 80 % образуются новые устойчивые кариотипические варианты (Gille, Joenje, 1989). С другой стороны показано, что при кратковременной гипоксии (2-5 % кислорода) в разных мезенхимных стволовых клетках (МСК) улучшаются ростовые характеристики, изменяется экспрессия ряда

ключевых генов, в частности, активируется экспрессия противовоспалительных генов, контролирующих IL-1ra, IL-10 и GM-CSF, подавляется экспрессия апоптотических генов BCL-2, CASP3 и провоспалительных генов IL-8, TNF- α . (Jiang et al., 2015; Antebi et al., 2018).

Существует целый ряд отличающихся по химическому составу культуральных сред, разработанных специально для поддержания разных клеточных культур. В состав сред входят следующие основные компоненты, количественно варьирующие между средами: незаменимые и заменимые аминокислоты, производные аминокислот, водорастворимые витамины и коферменты, жирорастворимые витамины, углеводы и их производные, производные нуклеиновых кислот, жиры и их производные, микроэлементы и ряд других компонентов (Тартаковский, 1988). Также рецептура сред приведена в каталогах ATCC (American type culture collection). В ряде работ показано, что проявление некоторых клеточных характеристик зависит от используемых сред. Так, при длительном культивировании клеток линии почки кенгуровой крысы (NBL-3-17) на среде EMEM (среда Игла минимальная MEM на растворе Эрла) по сравнению с культивированием на среде HMEM (среда Игла минимальная MEM на растворе Хэнкса) показаны различия в распределении клеток по числу хромосом. Именно, появляются клетки с новым модальным числом хромосом, образуется двумодальная кариотипическая структура, появляются новые СВК. Таким образом, среда EMEM способствует усилению кариотипической гетерогенности. Обнаруженные различия в характере количественной кариотипической структуры в зависимости от культуральной среды, связаны, по-видимому, с разным качественным составом используемых сред, что может привести к изменению клеточных метаболических процессов. Так, основные различия между HMEM и EMEM состоят в том, что в EMEM существенно больше

бикарбоната (NaHCO_3), чем в НМЕМ, т.е. имеет место разная буферная емкость и количество CO_2 . Клетки в ЕМЕМ росли медленнее, чем в НМЕМ. Культивирование же на среде F12 приводит к уменьшению гетерогенности. Среда F12, в отличие от двух других, содержит больший набор аминокислот и витаминов и имеет промежуточное количество бикарбоната между НМЕМ и ЕМЕМ. Клетки в этой среде растут быстрее, чем в НМЕМ (Полянская, Дьяконова, 1988). Анализ МСК человека свидетельствует о существенном влиянии культуральных сред на ростовые и дифференцировочные характеристики, а также на проявление ряда поверхностных маркеров. Авторы считают, что выбор среды важен для использования этих клеток в регенеративной медицине (Sotiropoulou et al., 2006; Apel et al., 2009; Hildebrandt et al., 2009; Hagmann et al., 2013).

Сыворотка, являясь нестандартным компонентом ростовой среды, может способствовать изменению клеточных характеристик. Одним из важных ингредиентов сыворотки являются ростовые факторы, способствующие активному росту клеток. Их количество может зависеть от источника получения сыворотки, от процентного содержания сыворотки в ростовой среде, от условий содержания животных и метода получения конкретных серий сыворотки. Есть ряд работ, свидетельствующих о существенном влиянии количества и качества сыворотки на клеточные характеристики, поэтому необходимо подчеркнуть, что при проведении длительных исследований желательно использовать одну серию сыворотки (Исаенко и др., 1990; Полянская и др., 1993; Hagmann et al., 2013; Naque et al., 2019; Kong et al., 2019; Thaweesapphithak et al., 2019).

Культивирование клеток при добавлении в среду доз антибиотиков, используемых для предотвращения микробной контаминации, может привести к изменению кариотипической структуры. Так, введение смеси

антибиотиков в терапевтической дозе при длительном культивировании клеток 2-х иммортализованных сублиний фибробластов кожи индийского мунджака (М и МТ) вызывает увеличение частоты хромосомных aberrаций, включающих исключительно дицентрики по типу хромосомных ассоциаций. Причем обнаружены межлинейные различия по частоте хромосомных aberrаций. Наблюдаются также изменения количественных кариотипических характеристик за счет изменений в соотношениях СВК, характер которых различается между сублиниями, что, по-видимому, отражает селективное преимущество определенных СВК при воздействии на конкретные линии (Полянская, 1989). Известно, что антибиотик ципрофлоксацин в низкой концентрации (10 мкг/мл) используется для деконтаминации клеточных культур от микоплазм. Показано, что эта доза не является генотоксичной для клеток, но увеличение концентрации ципрофлоксацина индуцирует в разных клеточных линиях генотоксичный эффект, проявляющийся как в увеличении частоты хромосомных aberrаций, так и в изменении соотношения разных СВК (Полянская, Сизова 1996).

Для длительного хранения любых клеточных культур используют криоконсервацию в жидком азоте при использовании разных криопротекторов, в частности, диметилсульфоксида (DMSO). После декриоконсервации клеточные культуры сохраняют присущие им свойства. Но необходимо обратить внимание на некоторые изменения в клетках, происходящие сразу после декриоконсервации. Так, показано на иммортализованных линиях китайского хомячка и мыши, что сразу после декриоконсервации в течение двух недель происходит усиление внепланового синтеза ДНК, который при дальнейшем культивировании возвращается к норме (Семенова, 1988, 1989). На клеточных линиях

китайского хомячка и человека показано, что в течение нескольких суток после декриоконсервации изменяется ряд других клеточных характеристик: увеличивается частота микроядер, анеуплоидия, частота хромосомных разрывов, а также уменьшается эффективность клонирования (Ashwood-Smith, Friedmann, 1979; Rudd et al., 1989). После декриоконсервации снижается выживаемость клеток линии индийского мунджака (MT), которая восстанавливается до контрольного уровня через 7 сут. Также существенно увеличивается внеплановый синтез ДНК, который снижается до контрольного уровня через 14 сут; снижается уровень репликативного синтеза ДНК, восстановление которого происходит через 3 сут. Таким образом, в течение нескольких суток после декриоконсервации в присутствии криопротектора происходят восстановительные процессы в клетках, связанные с репарацией, репликацией и выживаемостью, свидетельствующие о нестабильности клеточной культуры сразу после разморозки, что необходимо учитывать при постановке экспериментов. В связи с этим, было ранее отмечено, что введение терапевтической дозы антибиотиков сразу после декриоконсервации при дальнейшем длительном культивировании показало увеличение частоты хромосомных aberrаций в клеточной линии фибробластов кожи индийского мунджака (M), тогда как введение антибиотиков через временной интервал после декриоконсервации не нарушает хромосомную стабильность. По-видимому, длительность культивирования после декриоконсервации может определять состояние клеточной популяции и, в связи с этим, ее кариотипическая структура может по-разному реагировать на применяемые воздействия. В клетках, обработанных 10 % DMSO в течение 2-х часов (без криоконсервации) обнаружено достоверное снижение выживаемости и обнаружено существенное увеличение количества хромосомных aberrаций.

Таким образом, DMSO в зависимости от условий взаимодействия с клетками может обладать цитотоксичным и генотоксичным действием (при обычном культивировании) или способствовать защите клеток (при криоконсервации) (Полянская, 1989; Полянская и др., 1990). В связи с этим, необходимо стремиться к минимальному временному контакту клеток с DMSO.

Существенным фактором, способствующим нестабильности клеточных свойств, является смена способа культивирования (статический, роллерный, суспензионный, монослойный) (Nielsen, 1972; Семенова и др., 1984; Литвинчук и др., 1986; Царева и др., 1990; Amadori, Berneri., 1993).

Известно, что клетки в условиях *in vivo* и *in vitro* контактируют с сетью макромолекул, образующих внеклеточный матрикс (ВКМ), состоящий из разных белков, синтезируемых самими клетками. ВКМ является одним из важнейших регуляторов клеточных процессов и представляет собой микроокружение или нишу, в которой клетки существуют. При монослойном культивировании клетки растут на поверхности, покрытой внеклеточным матриксом (ВКМ), состоящим из разных белков, синтезируемых самими клетками. Белки ВКМ взаимодействуют с локализованными на поверхности клеточной мембраны рецепторами – интегринами, связанными с актиновым цитоскелетом. Связывание молекул ВКМ с интегринами ведет к активации локальных протеинкиназ, включая фокальную адгезионную киназу, которая активирует внутриклеточные сигнальные пути, способствующие выживанию, миграции, пролиферации, дифференцировке и злокачественной трансформации клеток. Изменение состава и структуры ВКМ может существенно влиять на свойства клеток. Известны генетические синдромы, связанные с анеупloidией по некоторым хромосомам, которые способствуют нарушению синтеза ВКМ, приводя к спонтанным абортam

(Belkin et al., 1985., Delvig et al., 1987; Brand-Sabery et al., 1994). Нарушение экспрессии гена эластина (белка ВКМ), наряду с другими нарушениями, приводит к развитию у человека тяжелого синдрома Williams-Beuren (Lacroix et al., 2009). Таким образом, культивируемые клетки, вырабатывают белки ВКМ, на которых они распластаются и функционируют. Поэтому изменение этого субстрата путем нанесения на него отдельных белков ВКМ или смеси белков ВКМ может вызвать в культивируемых клетках стрессовую ситуацию, которая, в частности, проявляется в изменении кариотипической структуры разных линий. Причем характер и уровень кариотипической изменчивости зависит не только от свойств субстрата, но и от разного тканевого происхождения изучаемой клеточной линии, а также от кариотипической структуры сублиний одного тканевого происхождения (Полянская, 2009; Полянская, Кольцова, 2013).

В настоящее время бурно развивается концепция клеточных сфероидов, которые рассматриваются как модель раннего эмбриогенеза. Широко исследуются клеточные сфероиды, полученные из МСК разного происхождения. Условия 3D-культивирования МСК гораздо ближе к физиологическим условиям *in vivo*, чем культивирование в условиях 2D. В ряде исследований показано, что клеточные сфероиды МСК обладают повышенной экспрессией противовоспалительных генов, цитокинов и плюрипотентных генов, а также увеличенным дифференцировочным потенциалом. Таким образом, использование клеточных сфероидов расширяет возможности, как для исследования основ органогенеза, так и для использования их в регенеративной медицине (Alimperti et al., 2014; Bogdanova-Jatniece et al., 2014; Guo et al., 2014; Murphy et al., 2014; Xiao et al., 2014; Li et al., 2015; Miceli et al., 2019). Наши исследования показали, что в клеточных сфероидах, полученных из МСК костного мозга и зачатка

конечности раннего эмбриона человека, расширяется дифференцировочный потенциал и изменяется экспрессия ряда поверхностных маркеров, а также изменяется активность металлопротеиназ (ММП), связанных с процессами дифференцировки (Крылова и др., 2015; Воронкина и др., 2016). Таким образом, любая смена способа культивирования по сравнению с изначальным способом, к которому клетки были адаптированы, приводит к изменению разных клеточных характеристик. Это надо учитывать при постановке экспериментов.

Серьезную опасность для клеточных культур представляют микоплазмы. Источниками микоплазменной контаминации, как правило, являются сами исследователи, компоненты ростовых сред и лабораторное оборудование. К настоящему времени в клеточных культурах выявлено около 30 видов микоплазм, но при этом наиболее часто, почти в 95% случаев, имеет место контаминация 6-ю видами микоплазм: *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorinis*, *M. orale*, *salivarium*, а также представителем рода ахолеплазм *Acholeplasma laidlawii* (Ефремова, 2008; Борхсениус и др., 2016). Микоплазмы относятся к персистирующим инфекциям, присутствие которых очень трудно обнаружить на ранних стадиях контаминации, так как в небольшом количестве они не оказывают видимого отрицательного влияния на клетку. При усилении контаминации возникают значительные цитопатические эффекты, в частности: конденсация хроматина, подавление роста культур, нарушение метаболических функций клеток, цитогенетические изменения. Тем не менее, следует отметить, что эффекты, индуцируемые микоплазмами, могут зависеть от 3-х факторов: от длительности контаминации, от вида микоплазмы и от свойств клеточной культуры. Надо подчеркнуть, что и другие эффекты, наблюдаемые при разных воздействиях, также зависят от 3-х указанных факторов.

Подробнейший анализ влияния микоплазм на организм и клеточные культуры представлен в книге С.Н. Борхсениуса с соавторами (Борхсениус и др., 2016). В КККП проведены подробные исследования влияния разных микоплазм на цитогенетические характеристики клеточных линий разного происхождения (Полянская, 2000; Poljanskaya, Vakhtin, 2003; Полянская, Ефремова, 2010). Поскольку микоплазмы могут влиять на любой клеточный параметр, с целью исключения экспериментальных артефактов, необходимо проводить систематический контроль микоплазменной инфекции.

Все представленные результаты по влиянию разных факторов, как правило, присутствующих при культивировании клеток, а также влияющих на их жизнедеятельность, свидетельствуют о значительной изменчивости параметров клеточных культур, адаптированных изначально к определенным условиям. Причем, рассмотренные нами факторы представляют собой только часть из огромного количества возможных влияний, которые могут оказывать на клетки в процессе их жизнедеятельности в условиях *in vitro*. Таким образом, клетки в культуре подвержены высокой наследственной изменчивости под действием меняющихся условий внешней среды. Адаптация клеточных линий к условиям внешней среды происходит в связи с необходимостью установления генного баланса, обеспечивающего жизнедеятельность клеток в новых условиях. Способы или инструменты адаптации могут быть разными в зависимости от конкретной линии: изменение набора маркерных хромосом, появление теломерных ассоциаций, анеуплоидия, количественные изменения в соотношении СВК или появление новых СВК, эпигенетические изменения.

Надо подчеркнуть, что большинство клеточных линий по многим свойствам являются гетерогенными клеточными популяциями. Так,

например, иммортализованная линия яичника китайского хомячка клонального происхождения (A14-2с-1) имеет бимодальное число хромосом, равное 19 и 20. В полученных из нее клонах значительно уменьшилась гетерогенность: каждый клон имеет один модальный класс, состоящий из 19 или 20 хромосом, частота которого существенно повышена; также увеличена доля клеток с основным СВК и уменьшено количество дополнительных СВК. При реклонировании уже этих клонов возникает клон с модальным числом хромосом, равным 21. Естественно, что при изменении генного баланса, изменяются и другие свойства линии (Полянская и др., 1981). При анализе большого количества клонов, выделенных из линии МСК костного мозга человека, показано, что характерная для МСК дифференцировка в трех направлениях: остеогенном, адипогенном и хондрогенном, свойственна не всем клонам. Есть клоны, обладающие бипотентным потенциалом или отсутствием дифференцировочного потенциала (Muraglia et al., 2000; Merryweather-Clarke, 2018). Отмечены колебания по процентному содержанию маркеров недифференцированных эмбриональных стволовых клеток человека (Oct-4, SSEA-4, SOX2) между разными субпопуляциями МСК (Крылова и др., 2014, 2016, 2017, 2018). Наличие этих маркеров связано, по-видимому, с регуляцией пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала в МСК (Gang et al., 2007; Riekstina et al., 2009; Yoon et al., 2011; Park et al., 2012; Seo et al., 2013; Aghajani et al., 2016; Reumann et al., 2018). Анализ транскриптома МСК из костного мозга человека показал биохимическую гетерогенность субпопуляций, экспрессирующих регуляторные белки, связанные с разными клеточными функциями, т.е. разные субпопуляции могут иметь разные функциональные свойства (Phinney, 2007). Очевидно, что изменение условий культивирования может

способствовать отбору тех вариантов, т.е. субпопуляций и клонов, которые будут наиболее адаптивны к предлагаемым условиям.

Таким образом, представленные данные, а также общие выводы о поведении клеток в культуре и механизмах их адаптации к условиям *in vitro* и к изменяющимся условиям культивирования разных клеточных линий, приводят к практическому выводу о необходимости строго придерживаться тех условий культивирования, которые были использованы при получении данной культуры. Необходимость придерживаться исходных условий культивирования вытекает из положения, что в большинстве случаев невозможно определить, изменение каких конкретных свойств имело место, т.е. неизменность условий культивирования дает некоторую «гарантию» стабильности свойств конкретной клеточной линии. Поэтому при работе с клеточными культурами должны быть приняты меры, позволяющие избегать усиления генетической нестабильности. Соблюдение постоянных условий рутинного культивирования включает в себя следующие действия: использование неизменного типа и состава среды и одинаковой сыворотки; соблюдение постоянной плотности посева и состояния конфлюентности при посевах; использование минимального времени центрифугирования при определенной скорости; соблюдение одинаковой влажности, температуры и состава воздуха. При криоконсервации и декриоконсервации необходимо избегать длительного действия криопротектора, а начинать эксперименты следует через 10-12 сут после декриоконсервации.

Поддержание исходных клеточных свойств и контроль их состояния осуществляют национальные коллекции разных стран, создание которых происходило, в основном, во второй половине XX века. В 1978 году была создана Всесоюзная (Российская) коллекция клеточных культур, Центральным банком которой была утверждена КККП ИНЦ РАН. Подробно

история создания и деятельность КККП в течение 40 лет описана в книге, выпущенной в 2018 году (Полянская, Мусорина, 2018). В настоящей работе мы подробно рассмотрим протоколы, используемые в КККП для работ с коллекционными клеточными линиями, включая получение новых линий.

Следует подчеркнуть, что приведенные ниже методы (протоколы), используются для постоянной работы с коллекционными клеточными линиями. Тем не менее, эти методы рекомендуется использовать и для любых работ в исследовательских лабораториях. Большая часть клеточного материала, используемого в различных лабораториях, изначально получена из разных коллекций клеточных культур. Соответственно клетки адаптированы к определенным условиям культивирования.

Основные методы (протоколы) культивирования и анализа коллекционных клеточных линий

Каждая коллекционная клеточная линия имеет паспорт, в котором представлены основные характеристики, согласно международным требованиям, предъявляемым к коллекционным линиям. Паспорт является важнейшим документом, регламентирующим методы, которые необходимо использовать для работы с клеточной культурой, а также для принятия ее в фонды коллекции и присвоения статуса коллекционной линии.

ПАСПОРТ КОЛЛЕКЦИОННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ

Название линии в виде аббревиатуры, используя латинский алфавит

Происхождение: указывается видовая принадлежность донора, орган из которого выделены клетки, при необходимости заболевание донора или способ трансформации клеток.

Морфология: дается краткое морфологическое описание, по возможности прикрепляется фотография.

Способ культивирования: суспензионный, полусуспензионный, монослойный, роллерное культивирование, культивирование в организме лабораторного животного.

Условия культивирования: стандартными условиями для выращивания клеток являются температурный режим 37 °C , 5 % CO₂, относительная влажность 90 %. Для клеток млекопитающих эти параметры приняты по умолчанию и в паспорте не указываются. Если требуются другие условия, они прописываются в паспорте отдельно.

среда: название культуральной среды

сыворотка: указан источник получения сыворотки: человек или вид животного; процентное содержание в ростовой среде

другие компоненты среды: указываются только при необходимости внесения добавок к основному составу ростовой среды

процедура посева: указывают способ открепления клеток от подложки, необходимость использования ферментов, а так же кратность посева и/или посевную дозу

криоконсервация: особенности защитной среды для криоконсервации, количество криопротектора, выраженное в процентах от общего объема суспензии клеток, оптимальная концентрация клеток. Стандартные условия криоконсервации (снижение температуры на 1 °C в минуту до -70 °C) и дальнейшее хранение в жидком азоте при температуре -196 °C не указывают. Если условия отличны от стандартных, то они прописываются дополнительно.

Жизнеспособность после криоконсервации: отношение живых клеток к общему количеству, выраженное в процентах. Мертвые клетки определяют по включению трипанового синего сразу после декриоконсервации.

Контроль контаминации: результаты проверки клеточной линии на отсутствие микоплазм, бактерий и грибов.

Контроль видовой идентичности: видовое происхождение должно быть подтверждено изоферментным, кариологическим анализом или результатами ПЦР с видоспецифичными праймерами.

Кариология: указывают нормальное диплоидное число хромосом донора; пределы изменчивости по числу хромосом, модальное число хромосом, количество полиплоидов, количество маркерных хромосом при их наличии.

ДНК профиль (STR-short tandem repeats): с целью подтверждения соответствия данной линии источнику ее получения и отсутствию контаминации другими линиями проведение аутентификации каждой клеточной линии человека с помощью молекулярно-генетического анализа коротких tandemных повторов, расположенных в определенных локусах конкретной клеточной линии. В КККП это исследование носит заказной характер. Мы передаем образцы клеточных линий Фирме, занимающейся подобными исследованиями: ООО «ГОРДИЗ» («GORDIZ»), Москва. Эта характеристика введена зарубежными Коллекциями клеточных культур и является обязательной для коллекционных линий человека при условии публикации экспериментальных результатов в большинстве рецензируемых зарубежных научных журналах.

Эффективность клонирования: отношение количества выросших колоний к числу посеянных клеток, выраженное в процентах, в условиях очень редкого посева или посева единичной клетки в лунку платы.

Туморогенность: способность образовывать опухоли в организме лабораторных животных.

Другие характеристики: приводят важные клеточные характеристики, не учтенные в основных пунктах паспорта.

Область применения: указывают, в каких областях фундаментальной и прикладной науки полезна данная клеточная линия.

Коллекции: перечень национальных и зарубежных коллекций, в которых можно приобрести данную клеточную линию.

Этот паспорт представляет собой полную версию. Но, учитывая особенности конкретной клеточной линии, некоторые пункты паспорта могут быть не заполнены. К таким пунктам относятся: эффективность клонирования, туморогенность, а также ДНК профиль, определяемый пока

только для клеточных линий человека. Кроме перечисленных основных характеристик в паспорте каждой линии приводят конкретные данные, представляющие большую важность для исследователей, пользующихся коллекционными линиями (пункт – другие характеристики). Эти характеристики определяют возможную область применения конкретной линии. К таким характеристикам, в частности, относятся:

- а) чувствительность к вирусам;
- б) специфические особенности линии, включающие ростовые характеристики, наличие биохимических и генетических маркеров и др.

Основы паспортизации изложены в ряде зарубежных изданий (Freshney 1987; Hay et al., 1994). Современная версия каталога КККП ИНЦ РАН представлена в электронном виде на странице ЦКП сайта ИНЦ РАН.

Далее будут приведены протоколы, согласно которым ведется работа с клеточными линиями в Центре коллективного пользования «КККП» Института Цитологии РАН. Следует подчеркнуть, что в нижеприведенных протоколах представлены оборудование и расходные материалы конкретных фирм, используемых в нашей работе. Тем не менее, допускается использование аналогов со схожими техническими характеристиками, производимыми другими фирмами.

Протокол № 1. Пополнение фонда Коллекции, подготовка клеточных образцов, процедура пересева коллекционных клеточных линий

Основным документом, регламентирующим методы культивирования, используемые для обновления фонда коллекции, а также для подготовки клеточного материала к выдаче потребителю, является паспорт. В пункте

паспорта «Условия культивирования» подробно прописаны необходимые для стабильного поддержания в культуре конкретной клеточной линии такие реактивы, как тип культуральной среды, количество эмбриональной бычьей сыворотки, другие компоненты ростовой среды; также указана кратность посева и оптимальная плотность культуры на единицу площади или объема. Культивирование коллекционного клеточного материала проводится в отсутствие антибиотиков. В ламинарном боксе одновременно работают с одной коллекционной клеточной линией. Для каждой клеточной культуры используют индивидуально приготовленную ростовую среду и другие реактивы, используемые для посева культуры. Основными компонентами ростовой среды являются культуральная среда и эмбриональная бычья сыворотка (для некоторых клеток лошадиная сыворотка). Также в состав ростовой среды могут входить и другие компоненты – заменимые аминокислоты, инсулин, HEPES, 2-меркапто-этанол и т.д. Процентное соотношение и концентрация всех составляющих ростовой среды подробно описаны в паспорте каждой клеточной линии. Растущие в монослой клетки переводят в суспензионное состояние (снятие с культуральной поверхности) посредством обработки смесью фермента трипсина и хелатирующего агента раствора Версена. Объемные доли этих растворов в смеси даны в паспорте каждой клеточной линии в разделе «Условия культивирования, процедура посева».

Разница между процедурой подготовки к выдаче клеточного образца и получением новой закладки состоит в том, что для выдачи готовится небольшое количество клеточной биомассы (2 флакона площадью 25 см²), при подготовке новой закладки наращивается большее количество биомассы (3 – 5 флакона площадью 175 см²). При работе с клеточным материалом вся используемая для культивирования

одноразовая пластиковая посуда маркируется следующим образом: перманентным маркером пишут название линии (аббревиатура), дату посева, номер пассажа от момента декриоконсервации.

1.1 Материал

Для пополнения или подготовки клеточных образцов к выдаче потребителям используется клеточный материал, хранящийся в криокомплексе.

1.2 Оборудование

Термостат жидкостный (водяная баня) (VEB MLW, Германия)

Центрифуга лабораторная LCM-3000, роторы R-6 и R12/10 (BioSan, Латвия)

Инвертированный световой микроскоп Eclipse TS100 (Nikon Eclipse, Япония)

Камера Горяева (Биолот, Россия)

Ламинарный бокс (ЗАО «САМПО», Россия) – 2-й класс биологической защиты

Инкубатор CO₂ (New Brunswick scientific, Германия)

Программный замораживатель -560-16 (Planer, Великобритания)

Криогенное хранилище для биопродуктов (Taylor Wharton, Германия)

1.3 Расходные материалы

Культуральные среды: DMEM, EMEM, RPMI 1640, DMEM/F12, αMEM, L-15, F10, F12, IMDM (Биолот, Россия; Gibco, Sigma, США)

Эмбриональная бычья сыворотка (Hyclone, США; Gibco, США)

Лошадиная сыворотка (Биолот, Россия)

Раствор трипсина 0.25 % (Биолот, Россия)

Раствор Версена 0.02 % (Биолот, Россия)

L-глутамин (Gibco, США; Биолот, Россия)

NEAA (nonessential amino acids – заменимые аминокислоты, Sigma, США)

Инсулин бычий (Sigma, США)

Пируват натрия (Биолот, Россия)

Раствор NEPES водный 40-кратный (Биолот, Россия)

2-меркаптоэтанол (Gibco, США)

Раствор трипанового синего 0.4 % (Биолот, Россия)

Этанол (ООО «Гатчинский спиртовой завод», Россия)

Жидкий азот (ООО "Лентехгаз", Россия)

Углекислый газ (Петербургский углекислотный завод, Россия)

Одноразовая пластиковая посуда:

Чашки Петри стерильные Ø35 × 10 мм, Ø60 × 15 мм, Ø100 × 15 мм
(Nunc, Дания)

Флаконы культуральные стерильные 25 см², 75 см², 175 см² (Nunc, Дания)

Пипетки серологические стерильные 2 мл, 5 мл, 10 мл, 25 мл (Nunc, Дания)

Пробирки центрифужные 15 мл, 50 мл (Nunc, Дания)

Стеклопосуда:

Пипетка стеклянная 2 мл, 5 мл, 10 мл (Marienfeld, Германия)

1.4 Подготовка клеточных образцов

Для подготовки клеточных образцов проводят следующие манипуляции.

1.4.1. Процедура декриоконсервации клеточных линий и высева клеток в культуральный сосуд

1. Проводят декриоконсервацию клеточного материала. Для этого достают криопробирки с замороженной суспензией клеток из хранилища с жидким азотом и помещают в жидкостный термостат, нагретый до 37 °С, до полного оттаивания.

2. Дезинфицируют поверхность криопробирок погружением в 70 % этанол, с последующим удалением этанола с поверхности криопробирки.

3. Используя пипетку объемом 2 мл, переносят суспензию клеток (1-2 мл) в стерильную центрифужную пробирку (объемом 15 мл) с 10 мл культуральной среды без сыворотки и центрифугируют 2-3 минуты при 190 g (1000 об/мин).

4. Удаляют надосадочную жидкость.

5. Используя пипетку объемом 2 мл, суспензируют осадок в 2 мл ростовой среды, высевают суспензию в чашку Петри Ø60 × 15 мм.

6. Новой пипеткой добавляют 3 мл ростовой среды и помещают в CO₂-инкубатор (37 °С и 5 % CO₂, влажность 80-90 %) до достижения конфлюэнтного монослоя.

Чтобы получить необходимое количество материала для выдачи клеточного образца или производства новой закладки совершают серию пассажей.

1.4.2 Процедура пересева монослойных клеточных линий (объемы указаны при работе с флаконами площадью 25 см² или чашками Петри диаметром 6 см)

1. Используя пипетку объемом 5мл, удаляют ростовую среду с поверхности клеток.

2. Промывают 2 – 3 раза нагретой до 37 °С смесью трипсин/версена (соотношение указано в паспорте клеточной линии). Для этого, используя пипетку соответствующего объема, аккуратно не задевая монослоя клеток вносят 2 мл смеси трипсин/версена. После ополаскивания монослоя осторожным покачиванием сосуда в течение 5-10 секунд, той же пипеткой смесь удаляют. Для повторного промывания используют новую пипетку. Для ряда клеточных линий этих манипуляций достаточно, чтобы клетки открепилась от субстрата и разрушились межклеточные контакты (под микроскопом видно, что клетки приобрели шарообразную форму), если этого не произошло, можно поместить сосуды с клетками в термостат, удерживающий постоянную температуру 37 °С, на 2-3 минуты.

3. Используя пипетку соответствующего объема, добавляют 2 мл ростовой среды и суспензируют до получения однородной суспензии.

4. Высевают клетки на новый культуральный сосуд в соответствии с указанной в паспорте кратностью посева.

5. Доводят общий объем суспензии ростовой средой до 5 мл и помещают в CO₂-инкубатор, где клетки растут до образования конфлюэнтного монослоя, т.е. до следующего посева.

1.4.3. Процедура посева суспензионных клеточных линий.

Посев суспензионных клеточных линий осуществляют путем разбавления клеточной суспензии порцией свежей ростовой среды в соответствии с кратностью посева, указанной в паспорте линии, один раз в 2-3 дня. Кратность рассчитывается как отношение объема исходной суспензии клеток к объему суспензии, полученному после добавления среды. Как правило, при соблюдении кратности посева, указанного в паспорте, дополнительных манипуляций не требуется, но иногда возникает

необходимость полностью сменить ростовую среду для суспензии клеток путем центрифугирования. Это может быть связано с ускоренным или замедленным делением клеток или большим количеством погибших клеток в первую неделю после криоконсервации. Следует помнить, что центрифугирование может быть стрессовым фактором для клеток, поэтому применять его рекомендуется только в случае крайней необходимости.

При полной смене среды: проводят следующие манипуляции (объемы указаны при работе с флаконами площадью 25 см² или чашками Петри диаметром 6 см):

1. Используя пипетку объемом 5 мл, переносят суспензию клеток в центрифужную пробирку объемом 15 мл.

2. Суспензию клеток центрифугируют 2 минуты при 190 g (1000 об/мин) (в случае работы с большими объемами время центрифугирования увеличивают).

3. Сливают надосадочную жидкость, пипеткой соответствующего объема вносят 1-2 мл ростовой среды и ресуспензируют осадок.

4. Из полученной суспензии берут 100 мкл и окрашивают 0.4 % раствором трипанового синего. Проводят подсчет количества живых клеток в камере Горяева (подробное описание процедуры смотреть ниже по тексту, в разделе «[Дополнение](#)»).

Следует отметить, что для подсчета клеток можно использовать другие счетные камеры или автоматические счетчики клеток.

5. Необходимое количество суспензии переносят в новый культуральный сосуд. Этот объем рассчитывается по формуле:

$$V_N = \frac{n \times V_n}{N} ,$$

где V_N – объем суспензии клеток с известной концентрацией, который нужно внести в новый культуральный сосуд, мл; n – оптимальная посевная плотность клеток указанная в паспорте линии (минимальное значение), клеток/мл; V_n – объем среды, в которой будут наращиваться клетки, мл. (значение зависит от размера культурального сосуда); N – плотность клеток в исходной суспензии, клеток/мл (из п.4 настоящего протокола).

6. Стерильной пипеткой доводят объем суспензии до 6 мл (V_n) и помещают в CO_2 -инкубатор, где клетки растут в течение нескольких дней до достижения максимально допустимой плотности, т.е. до следующего посева.

Разница между процедурой подготовки к выдаче клеточного образца и получением новой закладки состоит только в объеме наращиваемой клеточной биомассы. Далее проводят процедуру криоконсервации по модифицированному методу, разработанному ранее (Mazur, 1970).

ДОПОЛНЕНИЕ: Инструкция для подсчета клеток в камере Горяева.

Камера Горяева представляет собой утолщенное предметное стекло с нанесенными бороздками и двумя микросетками, расчерченными на квадраты разной величины. Квадраты наименьшего размера (маленький квадрат) имеют боковые стороны по 0.05 мм и, собранные по 16 штук вместе, образуют большие квадраты со сторонами по 0.2 мм (рис.1). По обе стороны от площадок с микросеткой, расположены борозды, а за ними площадки для притирания покровного стекла, толщина предметного стекла в этом месте больше на 0.1 мм. Таким образом, при правильном соединении предметного и покровного стекол (в месте соединения видна интерференция) между предметным и покровным стеклом камеры

образуется зазор в 0.1 мм. Объем камеры над большим квадратом в данном случае составляет 0.004 мкл.

Анализируемую суспензию клеток предварительно окрашивают трипановым синим для выявления в ней мертвых клеток (краситель проникает в клетки с поврежденной мембраной). Для этого берут 100 мкл анализируемой суспензии и добавляют к ней 100 мкл 0.4 % раствора трипанового синего. Суспензию вносят в бороздку камеры Горяева и, используя световой микроскоп, считают количество живых (при оценке жизнеспособности отдельно считают количество мертвых клеток) в 25 больших квадратах микросетки. При подсчете учитываются клетки внутри большого квадрата и на двух его боковых сторонах (если клетка лежит на пересечении границы).

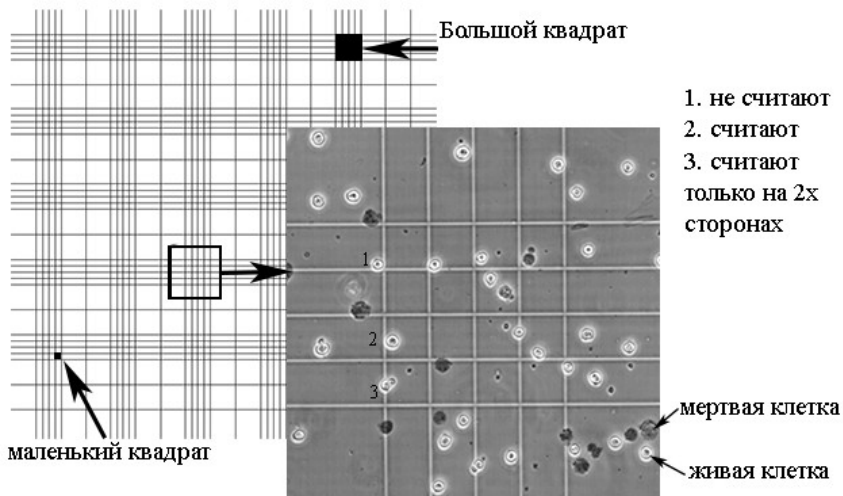


Рис. 1. Схематичное изображение сетки камеры Горяева

Количество клеток в 1 мл вычисляют по формуле:

$$N = k \times n \times 10^4,$$

где N – количество клеток в 1 мл, n – количество клеток подсчитанных в 25 больших квадратах, k – коэффициент разведения. При окраске 0.4 % раствором трипанового-синего в соотношении 1:1 $k = 2$.

Протокол № 2. Криоконсервация коллекционных клеточных линий

Основным документом, регламентирующим методы культивирования, используемые для обновления фонда коллекции, а также для подготовки клеточного материала к выдаче потребителю, является паспорт. В пункте паспорта «условия культивирования» подробно изложены основные требования к процедуре криоконсервации. Для каждой конкретной клеточной линии указан состав среды для криоконсервации, включающий в себя культуральную среду, объемную долю эмбриональной бычьей сыворотки и объемную долю криопротектора. Кроме того, следует придерживаться рекомендованной концентрации суспензии замораживаемых клеток. Строгое соблюдение указанных условий криоконсервации способствует получению качественных закладок коллекционных клеточных линий и последующему стабильному культивированию размороженных клеточных популяций. Подготовку к процедуре криоконсервации проводят в ламинарном боксе, одновременно работая с одной коллекционной клеточной линией.

2.1 Материал

Для проведения криоконсервации используется клеточный материал, выращенный в культуральных флаконах разного размера.

2.2 Оборудование

Программный замораживатель -560-16 (Planer, Великобритания)

Криогенное хранилище для биопродуктов (Taylor Wharton, Германия)

Центрифуга лабораторная LCM-3000, ротор R-12/10 (BioSan, Латвия)

Инвертированный световой микроскоп Eclipse TS100 (Nicon, Япония)

Камера Горяева (Биолот, Россия)

Стеллажи для криопродуктов (ООО Криогентех).

2.3 Расходные материалы

Ростовые среды, согласно паспорту клеточной линии (Биолот, Россия; Gibco, Nuclone, Sigma, США)

Раствор трипанового синего 0.4 % (Биолот, Россия)

Диметилсульфоксид (ДМСО, Биолот Россия; Sigma США)

Раствор трипсина 0.25 % (Биолот, Россия)

Раствор Версена 0.02 % (Биолот, Россия)

Жидкий азот (ООО «Сканд-газ», Россия)

Одноразовая пластиковая посуда:

Криопробирка 1.8 мл (Nunc, Дания)

Пипетки серологические стерильные 2 мл, 5 мл, 10 мл, 25 мл (Nunc, Дания)

Пробирки центрифужные 15 мл, 5 мл (Nunc, Дания)

Стеклопосуда:

Пипетка стеклянная 2 мл, 5 мл, 10 мл (Marienfeld, Германия)

2.4 Процедура криоконсервации

1. Клетки, растущие на поверхности культурального пластика, переводят в суспензионное состояние посредством обработки смеси трипсин/версена (согласно соотношению, указанному в паспорте).

Процедура описана в Протоколе №1, раздел 1.5, пп. 1-2. Для суспензионных культур процедура криоконсервации начинается с п.2 настоящего протокола.

2. Суспензию клеток переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 190 g (100 об/мин) в течение 3-8 мин в зависимости от объема клеточной суспензии.

3. Сливают надосадочную жидкость, добавляют к осадку клеток небольшой объем ростовой среды и ресуспензируют.

4. С помощью камеры Горяева определяют итоговое количество клеток (Протокол 1, раздел «[Дополнение](#)») и, исходя из него (в соответствии с рекомендованной в паспорте клеточной линии концентрации суспензии клеток для заморозки), рассчитывают объем среды для заморозки.

5. Криопротектор (ДМСО) нельзя добавлять неразбавленным к суспензии клеток, так как это может привести к повреждению клеток посредством осмотического и температурного шока. Для предотвращения этих эффектов готовят два равных по объемному соотношению раствора: 1- суспензия клеток в ростовой среде и 2 - ростовая среда с удвоенной от рекомендованной в паспорте концентрацией криопротектора. Далее медленно, по каплям раствор с криопротектором добавляют к суспензии клеток. Итоговый объем после объединения двух растворов должен соответствовать расчетному объему (п.4 настоящего протокола).

6. Полученную суспензию стерильно разливают по криопробиркам, которые герметично закрывают и маркируют (указывают название клеточной линии, номер закладки, пассаж и дату закладки).

7. Все криопробирки помещают в программный замораживатель, который постепенно понижает температуру со скоростью 1 градус в мин до -70 °С, после этого криопробирки переносят в жидкий азот (-196 °С).

При отсутствии программного замораживателя, первый этап в замораживании суспензии клеток – снижение температуры до $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, можно осуществить с использованием специального криоконтейнера. Криоконтейнер представляет собой штатив с двойными стенками, пространство между которыми заполнено изопропанолом или другим веществом/материалом, которые при помещении в минусовые температуры охлаждаются с постоянной скоростью $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту. Криопробирки с клетками помещаются внутрь, а сам криоконтейнер ставится в холодильную камеру на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. На следующий день криопробирки переносят в жидкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.5 Хранение коллекционного материала

Хранение в жидком азоте позволяет сохранять основные свойства коллекционных клеточных линий в течение нескольких десятилетий. При помещении криопробирок в криохранилище, каждая пробирка маркируется, в маркировке указана дата криоконсервации, название клеточной линии, номер пассажа. Криопробирки с замороженным клеточным материалом размещают в специальных стеллажах, помещенных в криохранилище. Информация о клеточной линии (название, номер закладки, пассаж, состав среды для криоконсервации, количество замороженных ампул и их расположение (номер криохранилища и номер стеллажа) фиксируется в соответствующих рабочих журналах. Криохранилища заполнены сжиженным азотом, обеспечивающим необходимую температуру хранения объектов ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). В криохранилищах поддерживается постоянный уровень азота для исключения нежелательных колебаний температур внутри емкостей. Проверка уровня хладагента проводится еженедельно визуальным способом. Дозаправка криохранилища проводится ежемесячно.

Соответствующая запись делается в рабочем журнале, находящемся в криокомплексе.

Подробно принципы создания и работы криокомплекса в ИНЦ РАН описаны его руководителем Н.А.Шубиным (Шубин, 2008).

Протокол № 3. Контроль качества коллекционных клеточных линий

Каждую полученную новую закладку клеточной линии необходимо проверить (протестировать) по 3-м показателям. Через несколько дней после криоконсервации одну криопробирку с клетками размораживают и проводят тестирование клеточных популяций по следующим параметрам: морфология, жизнеспособность, микробная контаминация. Для каждой включаемой в коллекцию клеточной линии проводят анализ кариотипа, а для клеток человека дополнительно определяют ДНК профиль (STR).

3.1 Характеристика морфологии клеточной линии.

Клеточные культуры существенно различаются по морфологической характеристике, независимо от типа клеточной линии (иммортизированные или неиммортизированные). Клеточные культуры могут иметь эпителиоподобную, фибробластоподобную, нейробластоподобную и лимфобластоподобную морфологию. Первые 3 типа называют монослойными культурами, т.к. клетки прикрепляются и распластаются на субстрате. Последний тип культуры называют суспензионным или полусуспензионным, клетки таких культур растут в суспензии, частично прикрепляясь, но, не распластаваясь на субстрате. Такую морфологию имеют клетки крови и иммунной системы, а также некоторые клеточные

линии, специально отселектированные для культивирования в суспензии. Для линий ЭСК характерен колониальный тип роста (Рис. 2).

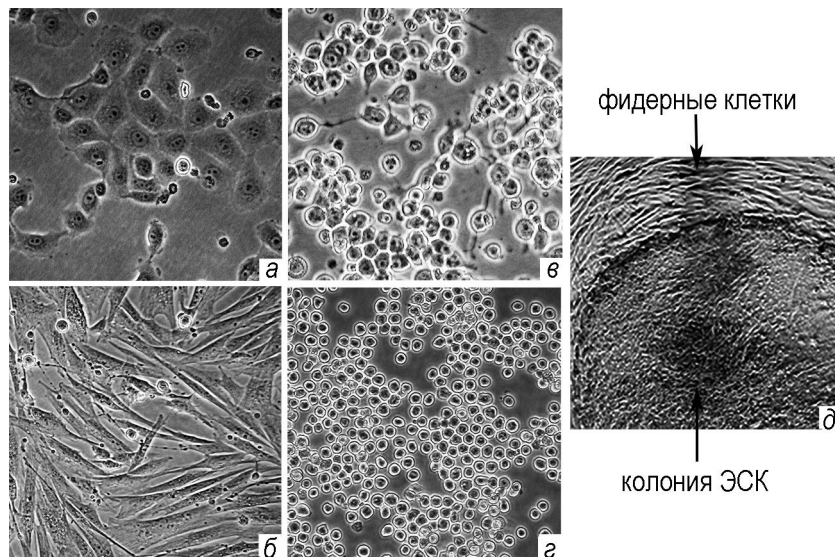


Рис 2. Морфология клеточных линий, прижизненные фотографии
а - эпителиоподобная морфология (линия **FBT**, эмбрион быка, трахея);
б - фибробластоподобная морфология (линия **Indian Muntjac (M)**, индийский мунтжак, кожа); в - нейробластоподобная морфология (линия **Neuro 2a**, мышь А (albino), нейробластома); г - лимфобластоподобная морфология (линия **Sp2/0-Ag14**, мышь, миелома, гибридР3Х63Ag8 и спленоцитов мышей ВАLB/c); д - колониальный тип роста (колония клеток линии **SC5**, человек, ЭСК, бластциста 5 – 6-го дня развития на слое фидерных (питающих) клеток линии **SC5-MSC**, человек, мезенхимные стволовые клетки из ЭСК).

3.1.1 Оборудование

Инвертированный световой микроскоп Eclipse TS100 (Nicon, Япония)

Ламинарный бокс (ЗАО «САМПО», Россия) – 2-й класс биологической защиты

Инкубатор CO₂ (New Brunswick scientific, Германия)

3.1.2 Расходные материалы

Ростовые среды, согласно паспорту клеточной линии (Биолот, Россия; Gibco, Nunc, Sigma, США)

Одноразовая пластиковая посуда:

Чашки Петри стерильные Ø35 × 10 мм, Ø60 × 15 мм (Nunc, Дания)

Пипетки серологические стерильные 2 мл, 5 мл (Nunc, Дания)

3.1.3 Процедура морфологического анализа

Морфологию клеточной популяции данной клеточной линии оценивают визуально под инвертированным микроскопом через 24-48 часов после посева и содержания в CO₂-инкубаторе. При этом учитывают не только тип роста, но и состояние клеток, включая наличие или отсутствие клеточного дебриса. Эталонные микрофотографии коллекционного фонда Коллекции приведены в каталоге, расположенном на официальном [сайте ИЦ РАН](#).

3.2 Определение жизнеспособности клеток после криоконсервации

Допустимая жизнеспособность каждой клеточной линии после криоконсервации, представлена в пункте паспорта «жизнеспособность после криоконсервации». Как правило, количество живых клеток колеблется от 70 до 95 %. Неудовлетворительной считается закладка, содержащая менее 70 % живых клеток.

3.2.1 Материал

Для определения жизнеспособности используют клеточный материал на 0 пассаже после декриоконсервации.

3.2.2 Оборудование

Криогенное хранилище для биопродуктов (Taylor Wharton, Германия)

Термостат жидкостный (водяная баня) (VEB MLW, Германия)

Центрифуга лабораторная LCM-3000, ротор R 12/10 (BioSan, Латвия)

Инвертированный световой микроскоп Eclipse TS100 (Nicon, Япония)

Камера Горяева (Биолот, Россия)

3.2.3 Расходные материалы

Ростовые среды, согласно паспорту клеточной линии (Биолот, Россия; Gibco, Hyclone, Sigma, США)

Раствор трипанового синего 0.4 % (Биолот, Россия)

Этанол (ООО «Гатчинский спиртовой завод», Россия)

Одноразовая пластиковая посуда:

Пипетки серологические стерильные 2 мл, 10 мл (Nunc, Дания)

Пробирки центрифужные 15 мл (Nunc, Дания)

3.2.4 Процедура определения жизнеспособности

1. Проводят декриоконсервацию клеточного материала. Процедура подробно описана в [Протоколе 1](#), раздел 1.4, пп.1-4.

2. Из суспензии размороженных клеток берут 100 мкл. и окрашивают ее 0.4 % раствором трипанового синего.

3. Производят подсчет живых и мертвых клеток в камере Горяева (Метод подробно описан в Протоколе 1, раздел «Дополнение»):

4. Вычисляют жизнеспособность клеточной популяции как отношение количества живых клеток к общему количеству просчитанных

клеток (сумма живых и мертвых), выраженное в процентах. Для получения достоверных данных должно быть просчитано не менее 200 клеток.

Следует подчеркнуть, что определение уровня жизнеспособности клеток сразу после декриоконсервации отражает реальное качество полученной клеточной популяции. Затем в клетках начинаются восстановительные процессы, связанные с репарацией, репликацией и выживаемостью. Присутствие же криопротектора во время криоконсервации не только предотвращает гибель клеток, но и ускоряет восстановление клеточных свойств, нарушающихся в процессе глубокого замораживания. (Полянская и др., 1990).

3.3 Микробиологический контроль контаминации клеточных линий

Микробиологический контроль является первой и решающей характеристикой для дальнейшей судьбы клеточной линии. Определение наличия контаминаций представляет для коллекций особую важность, так как в них культивирование клеточных линий ведется в отсутствие антибиотиков. Используют методы контроля бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации.

Наибольшую опасность для клеточных культур представляют микоплазмы. Детекцию микоплазмы проводят одновременно несколькими методами. В публикациях, посвященных детекции микоплазмы в клеточных культурах, всегда указывают, что все виды микоплазм, контаминирующих клеточные культуры, не могут быть определены одним методом тестирования, как из-за ограниченности каждого метода, так и специфических свойств микоплазм (Uphoff et al., 1992; Garner et al., 2000; Dvorakova et al., 2005; Пинаев и др., 2012; Uphoff, Drexler, 2013). Так, применение только одного метода микробиологического культивирования

(микробиологического посева), который, теоретически, позволяет обнаружить даже одну колониобразующую единицу (КОЕ) микоплазмы в культуре, ограничено тем, что только четыре из семи видов микоплазмоконтaminантов клеток хорошо растут на селективных питательных средах. Также установлено, что микоплазмы при различных неблагоприятных условиях могут переходить в некультивируемое состояние (Романова, Гинцбург, 1993).

Метод окраски флуорохромами используют как метод экспресс-диагностики. Недостатком метода является трудность оценки из-за возможности артефактов за счет флуоресценции обломков клеточных ядер и фонового свечения при культивировании на средах, содержащих антибиотики. Поэтому метод требует большого опыта оператора.

Помимо постоянно используемых микробиологических методов контроля контаминации, в качестве дополнительного критерия в некоторых случаях используют молекулярно-генетический метод (ПЦР анализ). Тест-система для определения контаминации Universal Mycoplasma Detection Kit (ATCC, США), включающая универсальные праймеры, специфичные для кодирующей области 16S рРНК в геноме многих представителей класса Mollicutes, позволяет определить свыше 60 видов контаминантов клеточных культур родов Mycoplasma, Acholeplasma, Ureaplasma и Spiroplasma. Тем не менее, этот метод имеет определенную разрешающую способность (Young et al., 2010).

3.3.1 Материал

Для проведения микробиологического контроля контаминации новых закладок клеточных линий используют культуры после разморозки одной ампулы из этой закладки. Размороженные клетки культивируют 3, 4 пассажа (не менее 10 дней) в CO₂ инкубаторе при 37 °С. Далее проводят

посев клеточной популяции на стерильные покровные стекла, помещенные в пластиковые чашки Петри и помещают их в CO₂ инкубатор при 37 °С до достижения 70 – 80 % монослоя. В ламинарном боксе одновременно работают с одной коллекционной клеточной линией. Для каждой клеточной культуры используют индивидуально приготовленную ростовую среду, включающую культуральную среду, эмбриональную бычью сыворотку и другие необходимые компоненты, согласно паспорту данной клеточной линии, а также реактивы, используемые для пересева культуры.

3.3.2 Оборудование

Центрифуга Eppendorf (Германия)

Термостат +37 °С (VEB MLW MEDIZINISCHE, Германия)

Ламинарный бокс (ЗАО «САМПО», Россия) – 2-й класс биологической защиты

Инвертированный микроскоп (Nicon Eclipse, Япония)

Инкубатор CO₂ (New Brunswick scientific, Германия)

Флуоресцентный микроскоп (Leica TSC, Германия)

3.3.3 Расходные материалы

BBL Mycoplasma Brooth Base (BD, Бельгия)

Difco PPLO Agar (BD, Бельгия)

Difco yeast extract (BD, Бельгия)

D-Глюкоза (Sigma, США)

Hoechst-33258 (Sigma, США)

KCl (Химреактив, Россия)

KH₂PO₄ (Реахим, Россия)

L-Аргинин (BioFroxx, Германия)

MgSO₄ × 7H₂O (Реахим, Россия)

NaCl (Реахим, Россия)
NaNO₃ (Экрос, Россия)
Vectashield mounting media (Vector laboratories, Inc, США)
Ацетат таллия (Merck, Германия)
Культуральная среда DMEM (Биолот, Россия)
Ледяная уксусная кислота (НеваРеактив, Россия)
Лошадиная сыворотка (Биолот, Россия)
Пептон (Хеликон, Россия)
Сахароза (Sigma, США)
Углекислый газ (Петербургский углекислотный завод, Россия)
Феноловый красный (Acros, Индия)
Фосфатно-солевой буфер, PBS (Биолот, Россия)
Эмбриональная бычья сыворотка (HyClone, США)
Этанол (ООО «Гатчинский спиртовой завод», Россия)

Одноразовая пластиковая посуда:

Пробирки центрифужные 15 мл (Nunc, Дания)
Пробирки с круглым дном, поликарбонатные, 10 мл (Sarstedt, Австралия)
Микропробирка 1,5 мл (Nunc, Дания)
Чашка Петри стерильная Ø35 × 10 мм (Nunc, Дания),
Пипетка серологическая 2 мл, стерильная (Nunc, Дания)
Наконечники для дозаторов, 100-1000 мкл, 1-200 мкл (Nunc, Дания)

Стекла предметные (Menzel, Германия)
Стекла покровные (Menzel, Германия)

3.3.4 Процедура микробиологического контроля

3.3.4.1. Контроль бактериальной, дрожжевой контаминаций и контаминации мицелиальными микроорганизмами.

Как правило, данные виды заражения можно определить визуально, поскольку бактерии, дрожжи и плесневые грибы в питательной среде растут достаточно быстро. Однако, существуют медленнорастущие виды данных микроорганизмов, и их выявление требует применения методов микробиологического посева на специфические питательные среды. В таблице 1 приведены составы специфических для каждого из типов контаминации питательных сред, процедура посева и результат.

3.3.4.2. Контроль микоплазменной контаминации.

1. Метод прямого окрашивания ДНК клеток флуоресцентными красителями (Hoechst 33258)

Приготовление раствора красителя Hoechst-33258:

Стоковый раствор: 50 мг сухого порошка Hoechst-33258 разводят в 1 мл DMSO (конечная концентрация 50 мг/мл). Стоковый раствор фасуют и хранят при -20 °С;

Основной раствор: 10 мкл стокового р-ра разводят в 1 мл PBS (0.5 мг/мл);

Рабочий раствор: 2 мкл основного р-ра разводят в 1 мл PBS (конечная концентрация 1 мкг/мл).

Основной раствор можно использовать в течение 2-х недель, рабочий раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Окрашивание клеток красителем Hoechst-33258.

1. Монослойные клеточные культуры выращивают на покровном стекле в течение не менее 3-х суток. Суспензионные клеточные культуры

Таблица 1. Определение разных типов контаминации с использованием специфических питательных сред.

Контаминация	Бактериальная (Hay R.J., 1985)		Мицелиальные микроорганизмы (Hay R.J., 1985)
	Аэробные бактерии	Анаэробные бактерии	
Визуальное наблюдение, микроскопия (определение с помощью инвертированного микроскопа при увеличении 12,5×10)	Помутнение и закисление среды	помутиение питательной среды и наличие мелких округлых почкующихся клеток диаметром до 6 мкм	тонкие филаментозные нити в среде, плотные скопления спор
Питательная среда, на 1 л H ₂ O	Пептон 10 г Difco PPLO Agar 5 г NaCl 5 г	Глюкозопептонная среда Эйкмана Пептон 10 г Глюкоза 5 г NaCl 5 г	Среда Чапека (Миллер и др., 1988) сахароза 30 г NaNO ₃ 3 г KH ₂ PO ₄ 1 г MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,5 г KCl 0,5 г
	55		
Процедура посева на питательные среды	1. 1 мл кондиционной среды клеточной линии центрифугируют при скорости 4000 об/мин в течение 5 мин 2. 500 мкл супернатанта переносят в 5 мл питательной среды 3. Инкубация в термостате при +37 °C не менее 21 сут	1. 1 мл кондиционной среды клеточной линии центрифугируют при скорости 4000 об/мин в течение 5 мин 2. 1 мл супернатанта переносят в 8 мл питательной среды в пробирках объемом 10 мл 3. Инкубация в термостате при +37 °C не менее 21 сут	1. 1 мл кондиционной среды клеточной линии центрифугируют при скорости 4000 об/мин в течение 5 мин 2. 500 мкл супернатанта переносят в 5 мл питательной среды 3. Инкубация в термостате при +37 °C не менее 21 сут
	Результат	Помутнение питательной среды	Помутнение питательной среды

анализируют с помощью индикаторных клеток: индикаторные монослойные клетки выращивают в течение 1 суток на покровном стекле, затем 1 мл испытуемой суспензионной линии добавляют к монослойным клеткам. Клетки сокультивируются в течение 3 суток.

2. По достижении не менее 70 % монослоя клетки фиксируют смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1): добавляют 50 мкл фиксатора, не сливая кондиционированную среду, через 2–3 минуты среду сливают и вновь заливают фиксатор.

3. Через 5 минут фиксатор сливают, стекла высушивают на воздухе.

4. Препараты окрашивают с помощью флуорохрома Hoechst-33258 в течение 10 минут.

5. После окраски стекла ополаскивают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе.

6. Препараты монтируют на предметных стеклах (предварительно обезжиренных спиртом) в капле заключающей среды Vectashield mounting media.

Микроскопирование препаратов производят на люминесцентном микроскопе при возбуждении флуоресценции в ультрафиолетовой области спектра (352 нм) при увеличении об.×100 (Leica TS5 SL). В контаминированных клетках микоплазмы видны в виде отдельно светящихся гранул диаметром около 2 мкм или их скоплений на поверхности клеток и на свободных участках (**рис. 3**).

2. Микробиологическое культивирование (Метод микробиологического высева).

Используют два варианта этого метода: 1) высев на жидкие питательные среды для роста микоплазмы; 2) высев на твердые питательные среды для роста микоплазмы (Hay R.J., 1985; Миллер и др., 1988).

Рис. 3. Микоплазмы в культурах клеток:

а – контрольные индикаторные клетки линии **Vero** без микоплазмы; б – клетки индикаторной

Состав жидких питательных сред.

Основная питательная среда:

BBL Mycoplasma Brooth Base	1,48 г на 70 мл H ₂ O дист.
Difco yeast extract (7 % в H ₂ O дист)	10 мл (0.7 г на 10 мл)
Лошадиная сыворотка	20 мл
Ацетат таллия (5 % в H ₂ O дист.)	600 мкл
Фенолрот (1 % в H ₂ O дист.)	200 мкл

Используют 2 варианта жидких питательных сред:

а). К основной питательной среде добавляют 250 мкл 40 % глюкозы. рН среды – 7,2–7,4.

б). К основной питательной среде добавляют 500 мкл 2 % аргинина. рН среды – 6,0–6,5.

Состав твердой питательной среды.

Difco PPLO Agar (5 %, в H ₂ O дист.)	70 мл
Difco yeast extract (7 %, в H ₂ O дист.)	10 мл
Лошадиная сыворотка	20 мл
2,5 % ацетат таллия	600 мкл

2.1. Высев на жидкие питательные среды.

1. 1 мл испытуемой кондиционированной среды центрифугируют при 1000 об/мин, в течение 2–3 мин.

2. 500 мкл супернатанта переносят в 2.5 мл жидкой питательной среды.

3. Пробирки с испытуемой средой инкубируют в термостате при 37 °С, не менее 21 суток.

4. Наличие микоплазменной контаминации на среде с глюкозой определяется по закислению среды (среда приобретает желтый цвет). Наличие микоплазменной контаминации на среде с аргинином

определяется по защелачиванию среды (среда приобретает малиновый цвет).

2.2. Высев на твердые питательные среды.

1. На твердый агар наносят 20 мкл супернатанта кондиционированной испытуемой среды, каплю подсушивают возле спиртовки.

2. Чашки с агаром заклеивают парафильмом, переворачивают, после чего инкубируют в термостате при 37 °С не менее 21 суток.

3. При наличии микоплазменной контаминации на агаре вырастают характерные колонии, напоминающие «яичницу-глазунью».

3.4. Контроль микоплазменной контаминации клеточных линий с помощью ПЦР-анализа (Wong-Lee, Lovett, 1993; Eldering et al., 2004)

3.4.1 Материал

Для проведения ПЦР-анализа клеточных культур на присутствие микоплазменной контаминации используют: 1. Криоконсервированные образцы; 2. Клеточные линии на 3–4 пассаже после разморозки, культивируемые в CO₂-инкубаторе при 37 °С.

3.4.2 Оборудование

Центрифуга мини-спин (Eppendorf, Германия)

Микроцентрифуга Eppendorf 5418 R с охлаждением (Eppendorf, Германия)

Центрифуга мини-вортекс Микроспин FV-2400 (BioSan, Латвия)

Амплификатор T100 (Bio-Rad, США)

Камера для горизонтального электрофореза SE-2 объемом 400 мл (Хеликон, Россия)

Источник постоянного тока, источник питания Эльф-4 с напряжением 150 – 460В (ДНК-Технология, Россия)

Система визуализации и гель-документирования ChemiDoc (BioRad, США)

Твердотельный термостат «Термит» от + 25 до + 98 °С (ДНК-Технология, Россия)

Набор механических дозаторов переменного объема («Ленпипет», Россия).

Дозаторы переменного объема (0.5–10 мкл; 5–200 мкл; 100–1000 мкл) (Thermo Scientific, США)

Микроволновая печь для плавления агарозы (Daewoo, Южная Корея).

Холодильник с морозильной камерой (Stinol, Россия)

Камера Горяева (Биолот, Россия)

Термостат на + 37 °С (MLW, Германия)

ПЦР-бокс БАВ-ПЦР «Ламинар-С» с УФ 1R-F.002-10.0 (620.100) («Ламинарные системы», Россия)

Стерилизатор паровой ГК-100-3 (ТЗ) (Тюменский завод).

3.4.3 Расходные материалы

Универсальная тест-система для определения контаминации Universal Mycoplasma Detection Kit (ATCC, США), включающая праймеры и положительный контроль ДНК микоплазмы. Набор включает все компоненты, необходимые для проведения реакции ПЦР. Высокая специфичность достигается за счет использования запатентованной смеси буферов, dNTP и термостабильной полимеразы в сочетании с универсальными праймерами, которые специфичны для кодирующей области 16S рРНК в геноме микоплазмы. Режим ступенчатого ПЦР (Eldering et al., 2004) повышает чувствительность анализа, а также повышает

специфичность. Система позволяет определить свыше 60 видов контаминантов клеточных культур родов *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Ureaplasma* и *Spiroplasma*.

Набор включает:

	Компонент	Объем	Условия хранения
1.	Буфер для лизиса	2 мл	-20 °С
2.	Универсальная смесь для ПЦР	0.8 мл	-20 °С
3.	Универсальные ПЦР праймеры	0.1 мл	-20 °С
4.	Пробирки для лизиса образцов	40 шт.	-20 °С
5.	Положительный контроль	50 мкл	-20 °С

Используются универсальные ПЦР праймеры (Otto et al., 2006; Eldering et al., 2004):

a) 5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'

b) 5'-CGGATAACGCTTGCACCTATG-3'

Стерильный фосфатно-солевой буфер без Ca^{+2} и Mg^{+2} (PBS) (Болот, Россия)

Трис-ацетатный электродный буфер (TAE) (50×) (BioRad, США)

ДНК-маркер GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermofisher Scientific, США)

Краситель для геля SYBR® Safe (Invitrogen, США)

6-кратный буфер для проб (6× Loading Dye Solution, Fermentas, США)

Наконечники для дозаторов переменного объема, с фильтром, в штативе, DNA-se/RNA-se-free (0.5–10 мкл; 5–200 мкл; 100–1000 мкл) (Jet Biofil, Китай)

Микропробирки с защелкивающейся крышкой для ПЦР, DNA-se/RNA-se-free (объемами

1.5 мл; 0.5 мл; 0.2 мл) (DeltaLab, Испания)

Скребок для культур клеток (Orange Scientific, Бельгия)

3.4.4 Процедура проведения ПЦР-анализа

Важные замечания:

Следует строго выполнять правила, установленные для проведения ПЦР, предотвращающие перенос ДНК:

1. Реагенты и смеси для ПЦР готовят в отдельном помещении;
2. Все реагенты смешиваются до момента добавления положительного контроля;
3. Экстракцию ДНК, проведение ПЦР реакции и электрофорез выполняют в местах, отделенных друг от друга;
4. Пипетки, наконечники и пробирки используются только для ПЦР, пипетки часто облучают ультрафиолетом;

3.4.4.1 Выделение ДНК.

При проведении ПЦР-анализа используют:

- А. криоконсервированные клеточные культуры;
- Б. культивируемые в течение 3-4 пассажей суспензионные клеточные культуры;
- В. культивируемые в течение 3–4 пассажей монослойные клеточные культуры.

Сбор клеток и приготовление проб:

1. Криоконсервированные образцы размораживают, после проводят подсчет клеток в камере Горяева. Для анализа отбирают аликвоту суспензии с концентрацией клеток 10^4 – 10^5 . Для отмывки клеток от DMSO доводят объем до 1 мл при помощи фосфатного буфера PBS, осаждают при 3000 rpm в течение 5 мин и ресуспензируют в 1 мл PBS.

2. Для суспензионных культур подсчитывают количество клеток в камере Горяева, для анализа берут аликвоту с концентрацией клеток 10^4 – 10^5 . Для монослойных культур: клетки снимают при помощи скребка в среде, ресуспендируют.

Важно: не использовать трипсин и версен, поскольку ферменты могут способствовать снятию микоплазм с поверхности мембран клеток.

3. Переносят 1 мл суспензии клеток в концентрации 10^4 – 10^5 в пробирки для лизиса проб, центрифугировать при 13000 rpm при 4 °C в течение 3 мин.

4. Аккуратно отбирают супернатант.

5. Ресуспендируют осадок в 50 мкл буфера для лизиса при помощи вортекса.

6. Инкубируют ресуспензированный осадок при 37 °C в течение 15 минут для лизиса клеток и деградации белков.

7. Инкубируют пробы при 95 °C в течение 10 минут для инактивирования протеаз.

8. Осаждают клеточный дебрис при 13000 rpm в течение 5 минут при 4 °C. Переносят супернатант в новые пробирки.

Пробы хранят при – 80 °C в течение 6 месяцев.

3.4.4.2 Проведение ПЦР анализа:

ПЦР необходимо проводить в отдельном помещении с использованием ламинара с поддувом. Очень важно, чтобы положительный контроль не загрязнял другие образцы, таким образом, необходимо все реагенты смешивать до момента добавления положительного контроля. Рекомендовано использовать наконечники с фильтром для избегания перекрестного заражения ДНК. Компоненты набора разморозить и быстро встряхнуть и осадить содержимое при помощи вортекса.

1. Приготовить смесь универсальной смеси для ПЦР и универсальных ПЦР праймеров следующим образом:

Для анализа одной пробы смешивают 20 мкл универсальной смеси для ПЦР и 2.5 мкл универсальных ПЦР праймеров (общий объем смеси 22.5

мкл). Реакционную смесь для ПЦР готовят в пробирках для проведения ПЦР:

Компонент реакции	Тестируемый образец	Положительный контроль	Отрицательный контроль
Смесь для ПЦР + ПЦР праймеры (п. 3.1.)	22.5 мкл	22.5 мкл	22.5 мкл
Тестовый образец	2.5 мкл	----	----
Дистиллированная вода	----	----	2.5 мкл
Положительный контроль	----	2.5 мкл	----
Финальный объем	25 мкл	25 мкл	25 кл

Мягко смешивают реакционную смесь и быстро осаждают при помощи вортекса. Оставшиеся пробы можно заморозить при - 80 °С.

2. Провести амплификацию

2.1 Помещают пробы в амплификатор

2.2 Особый режим ступенчатого ПЦР (Eldering et al., 2004)

повышает чувствительность анализа и специфичность.

Используют следующие параметры для проведения ПЦР:

Steps	Cycles	Temp(°C)	Time
Первоначальная денатурация	1	94	1.5 мин
Ступенчатая ПЦР	Параметры		
Денатурация	20	94	30 сек
Отжиг		70 => 60.5*	30 сек
Элонгация		72	45 сек
*температура уменьшается на 0,5 °С в каждом цикле (т.е. 70°С в первом, 69,5 °С во втором, и таким образом до 60,5 °С в последнем)			
ПЦР в обычном режиме	Параметры		
Денатурация	12	94	30 сек
Отжиг		60	30 сек
Элонгация		72	45 сек

3. Провести горизонтальный электрофорез

3.1. Приготовить 100 мл 2 %-ого агарозного геля на Трис-ацетатном электродном буфер (ТАЕ), полностью растворить агарозу в микроволновой печи.

3.2. Комплект оборудования для формирования геля состоит из столика для заливки геля, снабженного уровнем для регулировки горизонтального положения системы и лотка для геля. Для формирования лунок в геле используют гребенку. Лоток для геля поместить на столик для заливки, откорректировать положение системы с помощью регулировочных винтов. В лоток поместить гребенку и залить гель.

3.3. После застывания геля достать гребенку, лоток вместе с гелем поместить в систему для горизонтального электрофореза. Систему заполнить ТАЕ буфером для электрофореза до максимальной отметки, при этом буфер должен покрывать гель слоем толщиной несколько миллиметров.

3.4. 10 мкл каждой пробы смешать с 1.5 мкл краски для проб.

3.5. Аккуратно под слой буфера нанести по 10 мкл проб в лунки. В первую лунку внести молекулярный маркер. Сверху надеть крышку с электродами, следя за соблюдением полярности.

3.6. Подключить источник питания Эльф- 4, задать напряжение 50 В. После вхождения проб в гель, увеличить напряжение до 100 В.

3.7. После того, как фронт красителя подойдет к краю пластины, прибор отключить от электропитания.

3.8. Окраска геля проводится при помощи красителя SybrSafe (1:10000 в ТАЕ, в темноте, 30 мин).

3.9. Через 30 минут гель анализируют при помощи системы визуализации и гель-документирования ChemiDoc при длине волны 405 нм.

4. Интерпретация результатов

4.1. Положительные по микоплазме образцы дают полосу в 434–468 пн., в зависимости от вида микоплазмы (Рис. 4).

4.2. При контаминации реагентов специфической ДНК микоплазмы или ПЦР-продуктом появляется полоса в образце с отрицательным контролем. Слабые специфичные для микоплазмы полосы дают инфицированные культуры клеток, обработанные антимиоплазменными агентами или при постоянном применении других антибиотиков. В этих случаях положительную реакцию дает как остаточная

ДНК в культуральной среде из мертвых клеток микоплазмы, так и устойчивые к антибиотикам клетки микоплазмы с очень низким титром.

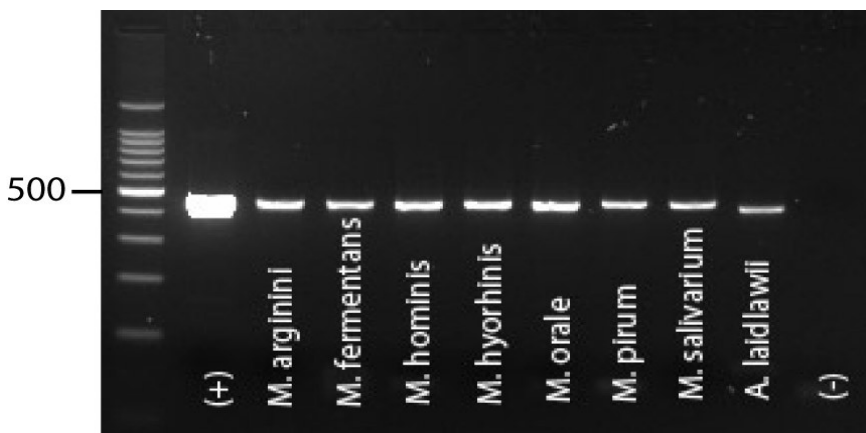


Рис. 4 Определение 8 основных видов микоплазм, контаминирующих клеточные культуры при помощи тест-системы Universal Mycoplasma Detection Kit (ATCC, США): (+) – положительный контроль ДНК; (-) – отрицательный контроль. Определены банды от 434 пн до 468 пн в зависимости от вида микоплазм.

3.5 Цитогенетический анализ коллекционных клеточных линий

Важнейшими характеристиками коллекционной клеточной линии являются видовая принадлежность и структура кариотипа.

Видовая идентификация. В условиях культивирования, клетки человека и различных видов животных морфологически неразличимы. Кроме того, в результате технических ошибок персонала нередко происходит перекрестное заражение клетками разных линий – явление довольно частое, особенно в условиях исследовательских лабораторий, где не осуществляется постоянный контроль качества клеточных линий. Наиболее распространенным методом определения видового происхождения является анализ кариотипа клеток, позволяющий на основании дифференциального окрашивания хромосом определить видоспецифичность данной клеточной линии. Окрашивание на G-диски (Seabright, 1971) является наиболее доступным и информативным из всех методов дифференциального окрашивания. С его помощью определяют гомологи нормальных хромосом, структурно перестроенные хромосомы, а также устанавливают их происхождение. Дифференциальное окрашивание на C-диски выявляет конститутивный гетерохроматин (Sumner et al., 1971). Дифференциальное окрашивание хромосом с помощью нитрата серебра позволяет выявить транскрипционно активные ядрышкообразующие районы хромосом (Bloom, Goodpasture, 1976). Все три вида дифференциального окрашивания используют для определения видовой принадлежности клеточной линии, т.к. они демонстрируют специфическое окрашивание каждой хромосомы в кариотипе человека и разных видов животных. Причем, исходя из специфики дифференциального окрашивания у разных видов, для определения видоспецифичности в каждом конкретном случае используют наиболее информативный для данного вида тип

окрашивания (Захаров и др. 1982; Мамаева, 1988). Еще одним методом, используемым для видовой идентификации клеточных линий, является изоферментный анализ, основанный на разной электрофоретической подвижности определенных ферментов у человека и разных таксономических групп животных. Для тестирования используются изоферменты: лактатдегидрогеназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Маргулис, 1988).

Помимо необходимости использования анализа кариотипа для определения видовой принадлежности, каждая клеточная линия должна иметь полную цитогенетическую характеристику, которая строго специфична для каждой линии и включает: модальное число хромосом, пределы изменчивости по числу хромосом, количество полиплоидных клеток в популяции и кариограмму клеток модального класса с описанием структурно перестроенных хромосом. В связи с тем, что некоторые структурно перестроенные хромосомы, благодаря своей необычной для данного вида структуре, могут индивидуализировать, т.е. маркировать клеточную линию, эти аномальные хромосомы называют маркерными. Тем не менее, в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека ISCN 2013 (Shaffer et al., 2013) к маркерным хромосомам строго следует относить только те аномальные хромосомы, центромерные районы которых невозможно установить с помощью окрашивания на G-диски. Таким образом, надо иметь в виду, что в разных литературных источниках может иметь место расхождение в понятии – маркерная хромосома. На основании специфичности структуры кариотипа каждой клеточной линии, в большинстве случаев цитогенетический анализ может помочь не только в определении видовой принадлежности, но и в идентификации конкретной линии (Мамаева, 1984; 2002).

В КККП для проведения цитогенетического анализа используют, в основном, метод дифференциального окрашивания хромосом на G-диски. Кариотипируют от 20 до 100 клеток, находящихся на стадии метафазы в зависимости от поставленной задачи.

3.5.1 Материал

Для проведения цитогенетического анализа используют клетки, культивируемые после декриоконсервации не менее 2-х недель, прошедшие за это время несколько пассажей.

Для получения метафазных пластинок, используют клеточную популяцию в логарифмической фазе роста, как правило, начинающуюся через 2 сут после посева культуры.

3.5.2 Оборудование

Ламинарный бокс (ЗАО «САМПО», Россия)

Инкубатор CO₂ (NEW Brunswick scientific, Германия)

Центрифуга лабораторная LCM-3000, ротор R12/10 (BioSan, Латвия)

Жидкостный термостат (водяная баня) (MLW, Германия)

Термостат суховоздушный (ОПОЛМТ «Медлабортехника», СССР)

Термостат ТВЗ-25 (ОПОЛМТ «Медлабортехника», СССР)

Инвертированный световой микроскоп Eclipse TS100 (Nicon, Япония)

Световой микроскоп (Axiophot Opton, Германия)

Система анализатора изображений, включающая Световой микроскоп (Axio Scope A1, Zeiss, Германия), цифровую камеру ProgRes MF (Jenoptik, Германия) и компьютер с программным обеспечением Kario 3.1 (Видеотест, Россия)

3.5.3 Расходные материалы

Ростовые среды, согласно паспорту клеточной линии (Биолот, Россия; Gibco, Hyclone, Sigma, США)

Раствор трипсина 0.25 % (Биолот, Россия)

Раствор Версена 0.02 % (Биолот, Россия)

Раствор демеколцина (Sigma, США)

Ледяная уксусная кислота (НеваРеактив, Россия)

Метанол (ЗАО Вектон, Россия)

Трипсин 1:250 (Difco, США)

HCl (ЗАО Вектон, Россия)

KCl (Химреактив, Россия)

Натрия цитрат 3-замещенный 5.5-водный, для аналитики (PanReas, Испания)

NaCl (Реахим, Россия)

Фосфатно-солевой буфер, PBS (Биолот, Россия)

NaHCO₃ (Sigma, США)

D(+)-глюкоза (Sigma, США)

Версен (Биолот, Россия)

Раствор красителя Гимза (БиоВитрум, Россия; Мерск, Германия)

Канадский бальзам (PanReas, Испания)

О-ксилол (Киришский НПЗ, Россия)

Иммерсионное масло (МиниМед, Россия; Zeiss, Германия)

Одноразовая пластиковая посуда:

Чашки Петри стерильные Ø60 × 15 мм (Nunc, Дания)

Пипетки серологические стерильные 2 мл, 5мл, (Nunc, Дания)

Пробирки центрифужные 15 мл, (Nunc, Дания)

Пипетки Пастера (Росмедбио, Россия)

Стекло предметное, размер 76 × 26 мм (Menzel, Германия)

Стекло покрывное, размер 24 × 50 мм (Menzel, Германия)

3.5.4 Процедура цитогенетического анализа

Алгоритм цитогенетического анализа клеточных линий был разработан С. Е. Мамаевой (Мамаева, 1988) в результате многолетних исследований постоянных клеточных линий человека и животных, что позволило ей сформулировать закономерности эволюции кариотипа клеток в культуре (Мамаева, 1996).

3.5.4.1. Получение препаратов метафазных хромосом для цитогенетического анализа

Посев клеток для цитогенетического анализа проводят в концентрации 3.4×10^5 – 4.5×10^5 на чашку Петри диаметром 6 см, в зависимости от типа клеток. Для получения препаратов метафазных хромосом на вторые сутки после посева клеток за 2 - 4 ч до фиксации в культуру клеток вводят демеколцин (0.1 мкг/мл) и по истечении этого времени начинают процесс фиксации и получения метафазных пластинок. Для этого делают следующие манипуляции:

1. Клетки снимают с поверхности чашки с помощью мягкой обработки смесью растворов трипсина и версена (соотношение, согласно паспорту клеточной линии) заливают ростовой средой, ресуспензируют и центрифугируют 5 мин. при 190 g (1000 об./мин). В случае анализа суспензионной культурой, 1-й пункт отсутствует, работа начинается со 2-го пункта.

2. Удаляют надосадочную жидкость, к осадку добавляют 4 – 8 мл гипотонического раствора (смесь 0.55 % раствора KCl и 1 % раствора цитрата натрия в соотношении 1:1), клетки ресуспензируют и помещают на

15-20 мин в термостат при 37 °С или оставляют при комнатной температуре.

3. После центрифугирования суспензии клеток в указанном режиме удаляют гипотонический раствор и осадок ресуспензируют в свежеприготовленном фиксаторе (смесь метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1). Клетки в фиксаторе помещают в холодильник на 15 мин. и затем снова центрифугируют.

4. Процедуру фиксации повторяют трижды. После последнего центрифугирования клетки ресуспензируют в небольшом объеме фиксатора (1-1.5 мл), раскапывают на влажные предметные стекла и высушивают на воздухе.

5 Качество препаратов метафазных хромосом оценивают путем их просмотра под фазовым контрастом на микроскопе Аxiophot (Opton) под увеличением 10 × 10.

Полученные метафазные пластинки можно анализировать с помощью рутинной окраски водным раствором красителя Гимза (1:50) на Na-фосфатном буфере или проводить разные виды дифференциального окрашивания для выявления специфических особенностей каждой хромосомы.

3.5.4.2. Дифференциальное окрашивание хромосом на G-диски.

Препараты метафазных хромосом окрашивают не позднее чем через 2 недели после их получения в соответствии с ранее разработанным традиционным методом (Ozkinay, Mitelman, 1979). Для этого проводят следующие процедуры:

1. Перед окрашиванием препараты метафазных хромосом помещают на ночь (18 ч) в термостат при температуре +60 °С .

2. Обработку препаратов раствором трипсина проводят в водяной бане при температуре +27-28 °С в течение 1 – 3 мин, время обработки подбирают эмпирически.

Приготовление раствора трипсина

Трипсин 1:250 (Difco, США) 22-23 мг

Фосфатный буфер (PBS) pH 7.0-7.2 5 мл

KCl	20 мг
KH ₂ PO ₄	20 мг
NaCl	800 мг
Na ₂ HPO ₄	115 мг
H ₂ O	100 мл

Раствор Версена 60 мл

Буфер GKN pH 8.0-8.2 5 мл

D(+) глюкоза	1 г
KCl	0,4 г
NaCl	8 г
NaHCO ₃	0,35 г
H ₂ O	100 мл

H₂O 45 мл

3. После обработки трипсином препарат споласкивают в буфере GKN (10 мл буфера GKN, 90 мл H₂O) и окрашивают раствором красителя Гимза на фосфатном буфере в течение 10-20 мин при комнатной температуре.

Приготовление раствора красителя Гимза

0,1М раствор Na ₂ HPO ₄	5 мл
0,1М раствор NaH ₂ PO ₄	5 мл
H ₂ O	90 мл
Краситель Гимза	2 мл

4. Препараты споласкивают в дистиллированной воде и высушивают.

5. После высушивания препараты заключают в канадский бальзам и анализируют под микроскопом.

Полученные результаты состоят из 2-х частей: количественный кариологический анализ (модальное число хромосом, пределы изменчивости по числу хромосом, количество полиплоидных клеток) и структурный кариологический анализ (определение половых хромосом, наличие хромосомных aberrаций разного типа). Далее результаты используют в 2-х направлениях: 1. внесение описательных данных в паспорт исследуемой коллекционной клеточной линии, с целью помещения ее в фонды коллекции; 2. использование полученных результатов для исследовательской работы. В этом случае помимо описательной части, приводятся микрофотографии анализированных кариотипов с указанием локализации хромосомных aberrаций.

3.5.4.3 Анализ препаратов метафазных хромосом

3.1. Для получения количественных характеристик кариотипа: модального числа хромосом в клетках, интервала изменчивости по числу хромосом и доли полиплоидных клеток в популяции проводят подсчет числа хромосом в 100 рутинно окрашенных метафазных пластинках с сохранившейся цитоплазмой и хорошим разбросом хромосом. Долю полиплоидных клеток в популяции оценивают при просмотре 500 — 1000 метафазных пластинок. Как правило, для подсчета используют несколько препаратов.

3.2. Анализ структуры кариотипа: число метафазных пластинок, необходимых для характеристики кариотипа клеток, варьирует от 20 до 100 в зависимости от поставленной задачи, сложности выявляемых структурных

перестроек хромосом, а также возможности сосуществования в культуре клеток с разными структурными вариантами кариотипа (Полянская, 2000; Poljanskaya, Vakhtin, 2003). Для кариотипирования клеток удобно использовать систему автоматического анализа хромосом человека с соответствующим программным обеспечением («Аргус КАРИО», ArgusSoft, Россия; «Ikaros», MetaSystems, Германия и др.).

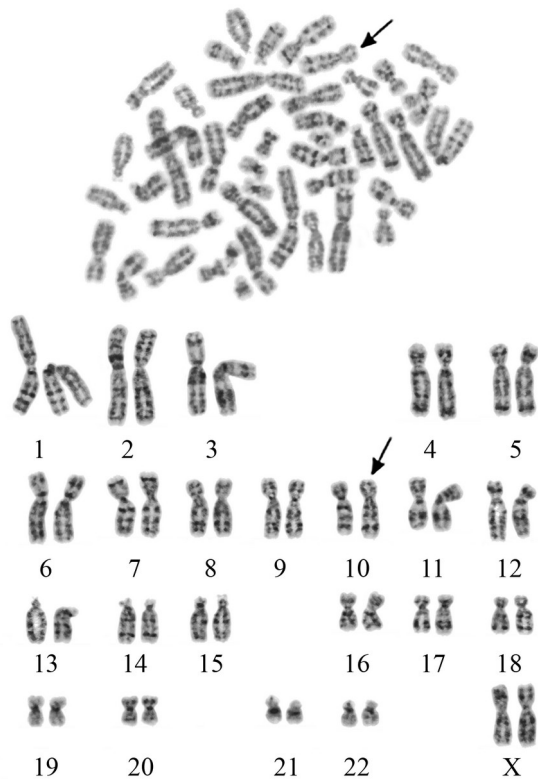


Рис. 5 Метафазная пластинка и кариограмм клетки линии МСК полученной из ткани десны человека **MSC-GING**, с парацентрической инверсией хромосомы 10 (стрелки):
 46,XX,inv(10)(pter → q21.1::q25.1 → q21.1::q25.1 → qter).

Полученные результаты включают кариограмму, представляющую модальный кариотип клеточной линии, и его описание в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека ISCN 2013 (Shaffer et al., 2013). При описании структурно перестроенных хромосом приняты следующие обозначения: p — короткое плечо, q — длинное плечо, ter — терминальный район, cen — центромерный район, add — дополнительный материал неизвестного происхождения, del — делеция, der — дериват, dic — дицентрическая хромосома, i — изохромосома, ins — инсерция, inv — инверсия, t — транслокация, mar — маркерная хромосома.

Протокол № 4. Получение и характеристики неиммортизированных (диплоидных) клеточных линий

Расширение фондов КККП ИНЦ РАН всегда определялось запросами фундаментальных исследований и практическими задачами здравоохранения. В связи с этим в последнее время большое внимание уделяется получению и характеристике диплоидных неиммортизированных линий человека. Эти линии более приближены по своим свойствам к нормальным клеткам человека, чем иммортизированные, включая опухолевые клетки. В связи с этим работа Коллекции направлена на получение новых коллекционных неиммортизированных (диплоидных) линий, которые, как правило, имеют статус мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, выделенных из различных источников. Учитывая разное микроокружение клеток, находящихся в разных тканях организма человека, существенный интерес представляет проведение сравнительного анализа характеристик, являющихся определяющими в поддержании статуса МСК, согласно требованиям Международного общества клеточной терапии (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010), а также ряда других

характеристик, ответственных за важнейшие клеточные процессы. К настоящему времени накопилось много работ по сравнительному анализу МСК человека, выделенных из разных взрослых и эмбриональных тканей, из внезародышевых органов человека, а также из эмбриональных стволовых клеток (Fong et al., 2007; Hsieh et al., 2010; Nekanti et al., 2010; Fong et al., 2011; Кольцова и др., 2015; Крылова и др., 2012, 2014, 2015, 2016, 2017; Balasubramanian et al., 2013; Bongso, Fong, 2013; Lian et al., 2016; Мусорина и др., 2019). Конечным результатом проведения научного анализа основных характеристик вновь полученных линий является введение в фонды Коллекции полностью охарактеризованных, согласно международным требованиям, новых коллекционных клеточных линий. В связи с этим, прежде всего, необходима разработка грамотной процедуры получения этих ценных для фундаментальной и прикладной науки клеточных линий. А затем необходима разработка процедуры получения ряда характеристик, подтверждающих статус МСК. Расширение фондов коллекции представляется также весьма актуальным в связи с сохранением и расширением биоразнообразия генофонда путем криоконсервации клеточного материала человека и животных разного происхождения.

4.1 Материал

Для получения неиммортизированных (диплоидных) клеточных линий используют фрагменты разных тканей человека (0.5 – 1 гр.). Также источником для получения диплоидных клеточных линий могут служить колонии ЭСК.

4.2 Оборудование

Центрифуга лабораторная LSM-3000, ротор R-10/12(BioSan, Латвия)

Инвертированный микроскоп Eclipse TS100 (Nicon, Япония)

Камера Горяева (Биолот, Россия)

Ламинарный бокс (ЗАО «САМПО», Россия) – 2-й класс биологической защиты

Инкубатор CO₂ (New Brunswick scientific, Германия)

Термостат жидкостный (VEB MLW, Германия)

Шейкер-инкубатор ES-20 (BioSan, Латвия)

Программный замораживатель-560-16 (Planer, Великобритания)

Криогенное хранилище для биопродуктов (Taylor Wharton, Германия)

Пинцет хирургической (стерилизованный автоклавированием)

Ножницы медицинские (стерилизованные автоклавированием)

4.3 Расходные материалы

Культуральная среда DMEM /F12, α -MEM (Биолот, Россия)

Антибиотик-антимикотик 100X (смесь амфотерицина В, пенициллина и стрептомицина) (Gibco, США)

Эмбриональная бычья сыворотка (HyClone, США)

Заменитель сыворотки (Gibco, США)

Трипсин, 0.25 % (Биолот, Россия)

Версен, 0.02 % (Биолот, Россия)

Фосфатно-солевой буфер (PBS) без Ca⁺² и Mg⁺² (Биолот, Россия)

Коллагеназа I типа (Sigma, США)

Коллагеназа IV типа (Sigma, США)

L-глутамин (Gibco, США)

Раствор NEAA (Sigma, США)

Одноразовая пластиковая посуда:

Флаконт культуральный 25 см² (Nunc, Дания)

Чашки Петри стерильные Ø35 × 10 мм, Ø60 × 15 мм, Ø100 × 15 мм
(Nunc, Дания)

Пробирки центрифужные 15 мл, 50 мл (Nunc, Дания)

Пипетки серологические стерильные 2 мл, 5 мл, 10 мл (Nunc,
Дания)

Стеклопосуда:

Чашка Петри стерильная стеклянная Steriplan 60*15 мм (Schott
Duran, Германия)

Пипетка стеклянная 5 мл, 10 мл (Marienfeld, Германия)

Лезвие хирургическое (скальпель) стерильное однократного
применения, размер 15 (Цертус, Китай)

Иньекционная игла 0.8 × 35 мм (SF-medical, Германия)

Транспортная среда/отмывочная среда: любая культуральная среда с добавлением антибиотиков и антимикотика в концентрации в два раза превышающей концентрацию, рекомендованную для стандартного культивирования культур клеток.

Ростовая среда для неиммortalизованных клеточных линий: культуральная среда DMEM /F12 (или α -MEM) с 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. На первых этапах (до 2 – 3 пассажа) культивирования клеток, полученных из фрагментов ткани, в ростовую среду добавляют раствор антибиотика-антимикотика, в рекомендованной производителем для культивирования клеток концентрации.

Ростовая среда для формирования эмбрионидных телец из эмбриональных стволовых клеток человека: 78 % культуральной среды DMEM/F₁₂, 20 % заменителя сыворотки, 1 % L-глутамина, 1 % раствора NEAA.

4.4 Процедура получения клеточных линий

Для выделения клеток из фрагментов разных тканей можно использовать 2 метода: механический и ферментативный. Есть точка зрения, что механический метод более оптимален для дальнейшей стабильности клеточных культур, и, в частности, для геномной стабильности. Возможно, это связано с тем, что пересев единичных клеток при ферментативном способе может способствовать селективному преимуществу аномальных клеток, обладающих повышенной клоногенной активностью. Кроме этого, ферментативный метод оказывает на клетки более сильный стресс, чем механический, при переводе клеток в условия *in vitro* (Hendijani et al., 2014; Полянская, 2014; Arutyunyan et al., 2016; Oliver-Vila et al., 2016). Тем не менее, однозначных результатов, свидетельствующих о полном преимуществе одного метода над другим, нет. В настоящее время оба метода широко используются для получения клеточных линий.

4.4.1 Получение клеточных линий с помощью механического выделения клеток из фрагмента ткани

1. Фрагмент ткани извлекают из пробирки с транспортной средой и помещают в центрифужную пробирку на 50 мл, содержащую 20 мл отмывочной среды. Крышку закрывают и интенсивно встряхивают содержимое пробирки в течение 30 сек. Среду из пробирки сливают, а фрагмент ткани переносят в пробирку со свежей порцией отмывочной среды. Процедуру отмывки повторяют три раза. Это позволяет отмыть ткань от сгустков крови, слизи и некротических фрагментов.

2. Фрагмент ткани переносят в стеклянную чашку Петри 60 × 15 мм, придерживая ткань пинцетом, при помощи одноразового стерильного

скальпеля фрагмент нарезается на мелкие кусочки (не более 1 мм³, можно меньше).

3. Измельченную ткань переносят в культуральную чашку Петри 100 × 15 (адгезивный пластик) и накрывают стерильным предметным стеклом (это препятствует всплыванию фрагментов ткани при их дальнейшем культивировании).

4. В чашку Петри с прижатыми стеклом фрагментами ткани, добавляют 10 мл ростовой среды, содержащей раствор антибиотика-антимикотика.

5. Чашку Петри с фрагментами ткани помещают в CO₂-инкубатор (37 °С, 5 % CO₂ при влажности 80-90 %).

6. Смену среды проводят ежедневно до тех пор, пока из среды не уйдут клетки крови и неприкрепившиеся к культуральной поверхности фрагменты ткани.

7. Через 10-14 дней вокруг кусочков ткани становятся видны зоны роста клеток. При достижении ими размера 5 - 10 мм² можно переходить к процедуре первичного пересева.

8. Для первичного пересева из чашки Петри удаляют ростовую среду и промывают 2 – 3 раза нагретой до 37 °С смесью трипсин/версена (1:3). Затем вносят в чашку 1 мл смеси трипсина/версена, равномерно распределяют по поверхности и инкубируют в течение 5 – 7 мин до появления округлившихся клеток, которые легко отделяются от субстрата.

9. В чашку с открепившимися от субстрата клетками вносят 10 мл ростовой среды. Аккуратно пинцетом убирают предметные стекла. Суспензию клеток и оставшихся фрагментов ткани переносят в центрифужную пробирку объемом 15 мл.

10. Суспензию клеток и фрагментов ткани центрифугируют 4 мин при 190 g (1000 об./мин).

11. Надосадочную жидкость сливают, добавляют в пробирку к осадку 2 мл ростовой среды, диссоциируют осадок и переносят суспензию клеток и фрагментов ткани в чашку Петри 35 × 10 мм. Чашку помещают в CO₂-инкубатор (37 °С, 5 % CO₂ при влажности 80-90 %).

12. Через сутки проводят смену среды, для удаления фрагментов ткани.

13. Культивируют до образования конфлюэнтного монослоя в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5 % CO₂ при влажности 80-90 %). Затем можно переходить к наращиванию необходимой биомассы клеточного материала, согласно условиям культивирования, используемым при первичном культивировании выделенной клеточной популяции. На 2-3 пассаже, при отсутствии визуальных признаков бактериальной и грибковой контаминации, из ростовой среды исключают антибиотик-антимикотик. Наращивание биомассы проводят в культуральных флаконах площадью 25 или 75 см². Таким образом, соблюдается пункт паспорта коллекционной клеточной линии «Условия культивирования».

4.4.2 Получение клеточных линий с помощью ферментативного выделения клеток из фрагмента ткани

1. Фрагмент ткани (0.5 – 1 г) извлекают из пробирки с транспортной средой и помещают в центрифужную пробирку на 50 мл, содержащую 20 мл отмывочной среды. Крышку закрывают, интенсивно встряхивают содержимое пробирки в течение 30 сек.

2. Среду из пробирки сливают, а фрагмент ткани переносят в пробирку со свежей порцией отмывочной среды. Процедуру отмывки

повторяют три раза. Это позволяет отмыть ткань от сгустков крови, слизи и некротических фрагментов.

3. Фрагмент ткани переносят в стеклянную чашку Петри 60×15 мм. Придерживая ткань пинцетом, при помощи одноразового стерильного скальпеля фрагмент нарезается на мелкие кусочки (не более 1 мм³, можно меньше).

4. Гомогенизированную ткань переносят в центрифужную пробирку на 15 мл (50 мл) и добавляют смесь 0.1 % растворов коллагеназы I и IV типов (1:1) в пропорции 1:5, т.е. к одному объему осадка добавляют 5 объемов раствора ферментов.

5. Ферментацию проводят в шейкере-инкубаторе в течение 30 – 50 минут при 37 °С.

6. Полученную клеточную суспензию центрифугируют при 190 g (1000 об./мин). Осадок диссоциируют в ростовой среде и переносят в культуральные флаконы площадью 25 см².

7. Культивирование проводят в CO₂ инкубаторе (37 °С, 5 % CO₂ при 80-90 % влажности) до получения 80 % монослоя. Через сутки проводят смену ростовой среды.

8. При достижении 80 % монослоя проводят рассев клеток согласно описанной в Протоколе 1, раздел 1.5 методике.

4.4.3 Получение линий мезенхимных стволовых клеток (МСК) из колоний эмбриональных стволовых клеток человека.

Способность ЭСК к дифференцировке в условиях *in vivo* и *in vitro* – одна из ключевых характеристик, подтверждающая статус стволовых клеток. Разработано множество методик разной степени сложности и доступности для получения различных специализированных типов клеток из ЭСК. Однако, самой простой и доступной является методика получения

линий неиммортизированных фибробластоподобных клеток, обладающих свойствами мезенхимных стволовых клеток человека.

В основе этого метода лежит принцип индукции ненаправленной дифференцировки ЭСК, используемый для подтверждения способности ЭСК дифференцироваться в производные трех зародышевых листков.

1. Колонии ЭСК, растущие на фидерном (питающем) слое клеток или субстрате, к которому они адаптированы, диссоциируют с помощью раствора трипсин/версена (в соотношении 1:3) и переносят полученную суспензию на гидрофобную культуральную поверхность в ростовой среде для формирования эмбрионидных телец.

2. Диссоциированные ЭСК культивируют в течение 10 дней в CO₂ инкубаторе при 37 °С, 5 % CO₂ при 80-90 % влажности). Гидрофобная культуральная поверхность не позволяет клеткам к ней адгезировать, они остаются в суспензии и за время культивирования формируют в ней плотные сферической формы кластеры – эмбрионидные тельца (ЭТ). Считается, что ЭТ отражают *in vitro* первый этап клеточной дифференцировки *in vivo* – стадию гаструлы, и именно здесь происходит разделение клеток на три зародышевых листка – эктодерму, мезодерму и энтодерму.

3. Сформированные ЭТ переносят на гидрофильную культуральную поверхность в ростовой среде, состоящей из культуральной среды α -MEM и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. Через сутки культивирования ЭТ прикрепляются к культуральной поверхности. В последующие дни можно наблюдать рост дифференцированных производных вокруг прикрепившихся ЭТ.

4. Из полученной популяции выделяют однородные зоны фибробластоподобных клеток и, используя световой микроскоп для

контроля всех манипуляций, пересевают их на новый культуральный флакон/чашку Петри.

5. В результате длительного культивирования/пассирования при использовании стандартных процедур (Протокол 1, раздел 1.5), получают достаточное количество клеточного материала для формирования референтного банка, который в дальнейшем используется как для проведения работ по характеристике/паспортизации полученной клеточной линии, так и для создания рабочего банка.

4.5. Получение клеточных сфероидов из линий МСК человека

В настоящее время возрастает интерес исследователей к работе с клеточными сфероидами, полученными из клеток линий МСК человека. Условия 3D-культивирования МСК гораздо ближе к физиологическим условиям тканей в организме, чем монослойное культивирование. В связи с этим, клетки в сфероидах по сравнению с монослойными культурами, обладают усиленным противовоспалительным действием, увеличенными дифференцировочным потенциалом, экспрессией ряда цитокинов и генов отвечающих за плюрипотентность и, таким образом, являются перспективным объектом, как для исследования основ органогенеза, так и для использования их в регенеративной медицине. Поэтому мы приводим описание методов получения клеточных сфероидов, которые используются в наших исследованиях (Крылова и др., 2015; Воронкина и др., 2016, 2018). Клеточные сфероиды получают следующим образом:

1. Клетки снимают с поверхности культурального флакона. Метод подробно описан в Протоколе 1, раздел 1.5, пп. 1-3.

2. Подсчитывают общее количество клеток в камере Горяева (Дополнение к Протоколу 1) и, исходя из полученного результата, готовят суспензию клеток в ростовой среде в концентрации 1×10^5 кл/мл.

3. Вносят суспензию в культуральный флакон/чашку Петри с гидрофобной поверхностью и помещают в CO_2 инкубатор (37°C , 5 % CO_2 при 80-90 % влажности). Через 24 часа клетки в суспензии адгезируют друг к другу и формируют сфероиды разного размера. Время культивирования сфероидов зависит от цели и задач эксперимента.

Есть и другой подход к формированию сфероидов – метод «висячей капли», который позволяет получать сфероиды стандартного размера, включающие в себя одинаковое количество клеток.

1. Как и в предыдущем методе, готовят суспензию клеток с концентрацией 1×10^5 кл/мл.

2. На дно чашки Петри ($d = 10$ см) с гидрофобной поверхностью на небольшом расстоянии друг от друга (5 мм) при помощи механического дозатора наносят капли суспензии по 30 мкл каждая. Указанный объем достаточен для того, чтобы капля не высохла за 24 часа культивирования в инкубаторе и удержалась в висячем состоянии.

3. Чашку Петри накрывают крышкой и быстрым точным движением переворачивают вверх дном.

4. Перевернутую чашку помещают в CO_2 инкубатор (37°C , 5 % CO_2 при 80-90 % влажности) на 24 ч. Под воздействием силы тяжести, клетки в образовавшихся висячих каплях опускаются к ее «вершине» и, за счет образования межклеточных контактов, формируют сфероиды. По одному на каждую каплю.

5. При необходимости дальнейшего культивирования сфероидов, через 24 часа чашку со сформированными сфероидами достают из

инкубатора, переворачивают, добавляют свежую порцию ростовой среды, и продолжают культивирование.

4.6 Контроль качества полученных линий

Полученную популяцию новой клеточной линии необходимо проверить (протестировать) по параметрам, представляющим пункты паспорта. Прежде всего, проводят микробиологический контроль контаминации клеточной культуры, согласно описанным выше процедурам. При получении отрицательного ответа проводят криоконсервацию наращенной клеточной массы на 2-3 пассажах. Затем, через несколько дней после криоконсервации, одну криопробирку с клетками размораживают и на 0 пассаже оценивают морфологию и жизнеспособность клеток. Неудовлетворительной считается закладка, содержащая менее 70 % живых клеток. Далее декриоконсервированную клеточную популяцию продолжают культивировать до 6-7 пассажа. После этого проводят повторный микробиологический контроль контаминации клеточной культуры. Получив удовлетворительные характеристики, на 6-м пассаже проводят цитогенетический анализ. Таким образом, в результате проведенной работы, характеристики вновь полученной линии соответствуют обязательным пунктам паспорта любой коллекционной клеточной линии. Далее необходимо исследовать характеристики, определяющие особый статус линии; документ, регламентирующий такие характеристики, представлен в пункте паспорта «другие характеристики».

4.7 Определение статуса полученных клеточных линий.

4.7.1 Материал

Вновь полученные и охарактеризованные по основным пунктам коллекционного паспорта диплоидные клеточные линии.

4.7.2 Оборудование

Центрифуга лабораторная LCM-3000, ротор -12/10(BioSan, Латвия)

Камера Горяева (Биолот, Россия)

Инвертированный световой микроскоп Eclipse TS100 (Nicon, Япония)

Проточный цитофлуориметр EPIX XL (Becton Coulter, США)

4.7.3 Расходные материалы

Фосфатный солевой буфер (PBS) без Ca^{+2} и Mg^{+2} (Биолот, Россия)

Поверхностные антитела для проточной цитофлуориметрии - CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, CD34, CD45 и HLA-DR (BD Pharmigen)

StemPro® Adipocyte Differentiation Basal Medium (Gibco, США)

StemPro® Adipogenesis Supplement (Gibco, США)

StemPro® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium (Gibco, США)

StemPro® Osteogenesis Supplement (Gibco, США)

StemPro® Chondrogenesis Supplement (Gibco, США)

Раствор 1% толуидинового синего в 50 % изопропиловом спирте (Sigma, США; Химмед, Россия)

Водный раствор 0.1 % сафранина O ((Sigma, США)

Раствор 1 % альцианового синего в 3 % уксусной кислоте (Sigma, США; АНТ, Россия)

10 % раствор формалина (Sigma, США)

Уксусная кислота (хч ГОСТ 61-75, АНТ, Россия)

Метанол (ЗАО Вектон, Россия)

Этанол (ООО «Гатчинский спиртовой завод», Россия)

Водный раствор 2 % нитрата серебра (AgNO_3) (Ленреактив, Россия)

Водный раствор 5 % тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
(ПраймКемикалсГрупп, Россия)

Субстрат для щелочной фосфатазы. BCIP®/NBT Liquid Substrate System (SigmaAldrich, США)

Раствор 0.3 % Oil Red в 60 % изопропанолe (SigmaAldrich, США)

Монтирующая жидкость Vectashield (Vector Labs, США)

Одноразовая пластиковая посуда:

Чашки Петри стерильные $\text{Ø}35 \times 10$ мм, $\text{Ø}60 \times 15$ мм, $\text{Ø}100 \times 15$ мм
(Nunc, Дания)

Пробирки центрифужные 15 мл (Nunc, Дания)

Пипетки серологические стерильные 2 мл, 5 мл, 10 мл (Nunc, Дания)

Стекло предметное, размер 76×26 мм (Menzel, Германия)

Стекло покровное, размер 18×18 мм (Menzel, Германия)

4.7.4 Процедура подготовки клеточных культур к определению экспрессии поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии

1. Согласно методике, описанной в Протоколе №1, раздел 1.5, пп. 1-3 готовят однородную суспензию клеток.

2. Переносят суспензию в центрифужную пробирку на 15 мл и центрифугируют 4 мин. при 190 g (1000 об./мин).

3. Надосадочную жидкость сливают, добавляют 10 мл фосфатного солевого буфера (PBS) без Ca^{+2} и Mg^{+2} и осадок тщательно диссоциируют. Содержимое центрифугируют 4 мин. при 190 g (1000 об./мин).

4. Надосадочную жидкость сливают и диссоциируют осадок в 1 мл буфера для окраски (Stain Buffer (BSA), BD Biosciences).

5. Проводят подсчет клеток в камере Горяева (согласно приведенной в Протоколе 1, раздел «Дополнение» методике)

6. Исходя из полученных данных, готовят суспензию клеток (в буфере для окраски) с концентрацией 1 млн. в мл.

7. Для окраски поверхностными антителами, 10 мкл суспензии клеток помещают в микроцентрифужную пробирку и добавляют 2 мкл конъюгированных с флуорохромом антител. Смесь инкубируют при 2-8 °С в течение 30-40 мин.

8. Отмывают клетки от антител: добавляют к суспензии 1.5 мл буфера для окраски, перемешивают суспензию пипетированием и осаждают центрифугированием (350 g, 6 мин).

9. Диссоциируют осадок в 100 мкл буфера для окраски.

10. Анализируют суспензию клеток на проточном цитофлуориметре.

Анализ проводят 3 раза (3 повторности) для более объективной оценки полученных данных.

4.7.5 Процедура индукции и идентификации дифференцировки в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях

Существенным признаком наличия статуса МСК в диплоидных клеточных линиях является их дифференцировочный потенциал (Domínicí et al., 2006). Клетки должны обладать способностью дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях при соответствующей индукции. Дифференцировку во всех 3-х направлениях проводят по модифицированному методу (Reyes et al., 2001).

4.7.5.1 Дифференцировка клеточной популяции в адипогенном и остеогенном направлениях

Дифференцировка в указанных направлениях проводится в 2D-системе культивирования с использованием соответствующих фирменных дифференцировочных сред.

1. Анализируемые клетки засевают на чашки Петри 35×10 мм в концентрации, образующей конфлюэнтный монослой.

2. После прикрепления и распластывания клеток на субстрате, проводят замену ростовой среды на дифференцировочную - адипогенную и остеогенную, соответственно (по 2 мл на 1 чашку 35×10 мм).

3. Чашку помещают в CO₂-инкубатор (37 °С и 5 % CO₂, влажность 80-90 %).

4. Клетки в дифференцировочных средах культивируют в течение 3-х недель, проводя смену среды через каждые 3 – 4 дня.

Для идентификации адипогенной дифференцировки используют метод окраски клеток масляным красным:

1. Клетки в чашке Петри промывают 2 раза PBS без Ca⁺² и Mg⁺².

2. Фиксируют, для этого добавляют 1 мл CH₃OH и инкубируют 2 мин. при -20 °С.

3. Промывают 50 % раствором C₂H₅OH.

4. Добавляют 1 мл раствора 0.3 % масляного красного (Oil Red) в 60 % изопропанол.

5. Инкубируют 10 мин при T_{комн.}

6. Промывают 50 % раствором C₂H₅OH.

7. Промывают несколько раз дистиллированной водой, полностью удаляя красящий раствор.

8. Наливают в чашку Петри 1 мл. 70 % водного раствора глицерина

9. Анализируют с использованием светового микроскопа. При дифференцировке в адипогенном направлении в клетках/внеклеточном пространстве обнаруживаются окрашенные красные липидные капли (размер может варьировать).

Для идентификации остеогенной дифференцировки используют 2 метода: окраска на активность щелочной фосфатазы и реакция Von Kossa. Для этого проводят следующие манипуляции:

Выявление экспрессии щелочной фосфатазы:

1. Клетки в чашке Петри промывают 2 раза PBS без Ca^{+2} и Mg^{+2} .
2. Добавляют 1 мл 10 % раствора формалина. Инкубируют 15 мин.

при $T_{\text{комн.}}$

3. Промывают 2 раза PBS без Ca^{+2} и Mg^{+2} .
4. Добавляют 1 мл. субстрата BCIP/NBT Liquid Substrate System.

Инкубируют 30 мин. при 37 °C .

5. Промывают 2 раза PBS без Ca^{+2} и Mg^{+2} .

6. Добавляют 2 мл. PBS без Ca^{+2} и Mg^{+2} . Анализируют с использованием светового микроскопа. Дифференцировка в остеогенном направлении индуцирует активность фермента щелочной фосфатазы, которая при взаимодействии со специфичным субстратом, проявляется в виде темно-синей/черной окраски клеток.

Реакция Von Kossa

1. Клетки в чашке Петри промывают 2 раза PBS без Ca^{+2} и Mg^{+2} .
2. Фиксируют, для этого добавляют 1 мл CH_3OH и инкубируют 2 мин. при -20 °C .
3. Промывают дистиллированной водой.
4. Добавляют 1 мл 2 % раствора AgNO_3 .
5. Инкубируют 1 ч. под лампой 60 Вт.

6. Промывают дистиллированной водой.
7. Добавляют 1 мл 5 % раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
8. Промывают дистиллированной водой.
9. Наливают в чашку Петри 1 мл 70 % водный раствор глицерина.
10. Анализируют с использованием светового микроскопа. Кальций содержащие кристаллы в ходе реакции окрашиваются в черный цвет.

4.7.5.2 Дифференцировка клеточной популяции в хондрогенном направлении

Дифференцировка в хондрогенном направлении осуществляется в 3D–системе культивирования (метод формирования микромасс) с использованием фирменной дифференцировочной среды.

Для формирования одного образца (микромассы) необходимо взять $1 - 1.5 \times 10^6$ клеток (приблизительно эквивалентно количеству клеток в конфлюэнтном монослое на чашке Петри 100×15 мм).

1. Из чашки Петри с монослоем клеток, убирают ростовую среду и дважды промывают нагретой до 37°C смесью трипсин/версена (по 7 мл на чашку 100×15 мм)

2. Вносят в чашку 1 мл трипсин/версена, равномерно распределяют по поверхности и инкубируют в течение 5 – 7 мин до появления округлившихся клеток, которые легко отделяются от субстрата.

3. Добавляют 5 мл ростовой среды, аккуратно диссоциируют содержимое до получения однородной суспензии клеток.

4. Переносят суспензию в центрифужную пробирку на 15 мл и центрифугируют 4 мин при 190 g (1000 об./мин).

5. Надосадочную жидкость сливают, добавляют 10 мл. PBS без Ca^{+2} и Mg^{+2} и осадок тщательно диссоциируют. Содержимое центрифугируют 4 мин при 190 g (1000 об./мин).

6. Убирают надосадочную жидкость и аккуратно, чтобы не нарушить целостность осадка, добавляют 2 мл хондрогенной дифференцировочной среды.

7. Центрифужную пробирку с клетками помещают в CO₂-инкубатор (37 °С, 5 % CO₂, при влажности 80-90 %). Крышку оставляют слегка приоткрытой, для обеспечения вентиляции.

8. Клетки культивируют в указанных условиях в течение 3-х недель, проводя смену среды каждые 3 – 4 дня.

Хондрогенная дифференцировка определяется по наличию во внеклеточном матриксе сульфатированных гликозаминогликанов, протеогликанов и кислых гликозаминогликанов.

Идентификация хондрогенной дифференцировки.

Для идентификации хондрогенной дифференцировки проводят следующие манипуляции:

1. Сформированную микромассу переносят из центрифужной пробирки, в которой клетки инкубировались весь период дифференцировки, на предметное стекло.

2. При помощи одноразовой иглы от шприца, делят микромассу на 3 равные части и 2 из них переносят на отдельные предметные стекла.

3. Той же иглой аккуратно распределяют содержимое микромассы по поверхности стекла (делают мазок). Площадь мазка не должна превышать 15 мм².

4. В течение нескольких минут подсушивают мазок на воздухе. Не должно быть плавающих в среде фрагментов.

5. Наносят на мазок 10 % раствор формалина. Инкубируют 15 мин при T_{комн.}

6. Промывают 2 раза PBS без Ca⁺² и Mg⁺².

7. На каждый из 3-х зафиксированных мазков наносят отдельный красящий раствор по 300 – 500 мкл: 1 % раствор толуидинового синего (в 50 % изопропиловом спирте), 0.1 % водный раствор сафранина О или 1 % раствор альциановый синий (в 3 % уксусной кислоте).

8. Окрашивают 30 мин при $T_{\text{комн.}}$

9. Промывают дистиллированной водой, высушивают.

10. На каждый окрашенный мазок наносят по 10 – 20 мкл монтирующей среды, накрывают покровным стеклом и монтируют края.

11. Анализируют с использованием светового микроскопа. Толуидиновый синий окрашивает сульфатированные гликозаминогликаны внеклеточного матрикса в синий цвет. Сафранин О окрашивает протеоглики в малиново-красный цвет. Кислые гликозаминогликаны проявляются по синей окраске альцианового синего.

После получения всех основных характеристик паспорта и подтверждения статуса МСК для вновь полученных линий, проводят расширение фондов коллекции путем значительного увеличения числа криопробирок, помещенных в жидкий азот, для длительного хранения. Для неиммортизированных клеточных линий, в связи с ограниченным сроком жизни, сопровождающего процессами клеточного (репликативного старения), необходимо поддерживать в фондах закладки с небольшим количеством пассажей. В нашей коллекции для каждой такой линии имеется пул клеток на 2-3 пассажах, а максимальное число пассажей составляет 6 – 7. При работе с клеточным материалам вся используемая для культивирования одноразовая пластиковая посуда маркируется следующим образом: перманентным маркером пишут название линии (аббревиатура), дату пересева, номер пассажа от момента декриоконсервации.

Дополнительная информация о неиммortalизованных клеточных линиях

При работе с неиммortalизованными клеточными линиями важно иметь информацию об их ростовых характеристиках и характере репликативного старения. Ниже мы приводим описание методик, позволяющих получить эту информацию.

Репликативное старение клеток оценивают по активности фермента β -галактозидазы. Клетки выращивают в чашках Петри диаметром 3.5 см до образования субконфлюента. Затем среду удаляют и клетки окрашивают с помощью набора реактивов (Senescence β -galactosidase staining kit; Cell Signaling, США), согласно инструкции. У клеток, находящихся в фазе репликативного старения, цитоплазма имеет ярко-синюю окраску. Анализ проводится с помощью инвертированного микроскопа (Nicon, Япония) на ранних, средних и поздних пассажах. Долю окрашенных клеток (%) определяют путем подсчета не менее 1000 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Эффективность клонирования на разных пассажах определяют в чашках Петри в условиях редкого пассажа (3–4 кл./см²). Через 14 сут клетки окрашивают 1 %-ным водным раствором кристалл-виолета и считают число колоний. Эффективность клонирования определяют по отношению числа выросших колоний (клонов) к числу посеянных клеток в процентах. Необходимо определить количественный предел числа клеток в колонии. В наших экспериментах учитывали колонии, состоящие из не менее 20 клеток. Необходимо провести несколько повторных экспериментов, не менее 3-х.

Пролиферативную активность оценивают по индексу пролиферации (ИП) – отношение числа клеток в текущий момент к

исходному числу посеянных клеток, затем строят кривые роста клеточных популяций. Для измерения среднего времени удвоения клеточной популяции каждый экспериментальный вариант повторяют не менее 3-х раз, ежедневно считая клетки в течение 5 - 6 сут (120 - 144 ч). Среднее время одного удвоения клеточной популяции (a_0) определяли по формуле (Седова, 2008):

$$a_0 = t \ln 2 / \ln (M_t / M_0),$$

где M_t – число клеток в момент времени t ; M_0 – начальное число клеток; t – время логарифмической фазы роста клеточной культуры. В зависимости от целей исследования анализ пролиферативной активности проводят на раннем и позднем пассажах или несколько раз в процессе длительного культивирования.

При получении количественных результатов необходимо проведение статистической обработки. В представленных нами исследованиях используется t -критерий Стьюдента. Различия считаются достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$.

Резюмируя содержание книги, следует подчеркнуть, что представленные в первой главе результаты, являющиеся только частью исследований, проведенных на клеточных культурах, свидетельствуют о существенной изменчивости клеточных линий разных типов при культивировании *in vitro*. Выводом из этих результатов является необходимость соблюдения по возможности стабильных условий культивирования. Для получения воспроизводимых результатов желательно использовать клеточные культуры, полученные из российских или зарубежных коллекций. При работе с коллекционными клеточными линиями необходимо придерживаться указанных в паспорте условий ведения

конкретной клеточной культуры. В представленных нами протоколах, помимо подробного описания используемых методов, указаны фирмы, продукцией которых мы пользуемся при работе с клеточными культурами. Это сделано неслучайно, т.к. качество используемых расходных материалов может повлиять на свойства клеточных линий. Поэтому лучше при длительной работе с культурой использовать реактивы, полученные из одной фирмы.

Список литературы

1. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вишняков И.Е. Микоплазмы в биологии и медицине начала XXI века. СПб: «Наука». 2016. 334 с.
2. Вахтин Ю.Б. Генетическая теория клеточных популяций. Ленинград: «Наука». 1980. 168 с.
3. Вахтин Ю.Б. Генетика соматических клеток. Ленинград: «Наука». 1974. 258 с.
4. Воронкина И.В., Смагина Л.В., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Полянская Г.Г. 2016. Сравнительный анализ динамики активности матриксных металлопротеиназ в процессе дифференцировки мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из разных тканей одного донора. Цитология. 58 (11): 865 – 874.
5. Воронкина И.В., Смагина Л.В., Гин И.И., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Полянская Г.Г. 2018. Анализ динамики активности матриксных металлопротеиназ в процессе хондрогенной дифференцировки линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из вартонова студня пупочного канатика человека. Цитология. 60 (9): 725 –734.

6. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. 1991. Биология продолжительности жизни. Москва: «Наука». 280 с.
7. Дункан Э.Л., Редел Р.Р. 1997. Генетические изменения, связанные с иммортализацией. Биохимия. 62 (11): 1477 – 1490.
8. Ефремова Т.Н. Контаминация клеточных линий микроорганизмами. В сб. «Методы культивирования клеток». СПб. Изд-во Политехнического Ун-та, 2008: 228 – 236.
9. Исаенко А.А., Немцов Ю.В., Царева А.А. 1990. Исследование кариотипа клеток почки африканской мартышки линии 4647, культивируемых в средах с различными сыворотками. Цитология. 32 (7): 736 – 740.
10. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека. Москва, Медицина. 1982. 264 с.
11. Кольцова А.М., Гордеева О.Ф., Крылова Т.А., Лифанцева Н.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2011. Сравнительные характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a. Онтогенез. 42 (4): 249 – 263.
12. Кольцова А.М. Воронкина И.В. Гордеева О.Ф. Зенин В.В. Лифанцева Н.В. Мусорина А.С. Смагина Л.В. Яковлева Т.К. Полянская Г.Г. 2012. Разработка новой бесфидерной системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании. Цитология. 54 (8): 637 – 651.
13. Кольцова А.М., Зенин В.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2015. Характеристика новой линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 57 (11): 761 – 770.
14. Кольцова А.М., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2016. Получение и характеристика новой сублинии эмбриональных стволовых клеток

человека SC6-FF в аллогенной бесфидерной системе культивирования. Цитология. 58 (7): 507 – 516.

15. Кольцова А.М., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2017. Динамика свойств двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека, при длительном культивировании. Цитология. 59 (9): 574 – 587.

16. Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2018. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенной из пульпы молочного зуба человека. Цитология. 60 (12): 955 – 968.

17. Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. 54 (1): 5 – 16.

18. Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2014. Сравнительные характеристики линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга и мышцы конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 56 (8): 562 – 573.

19. Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Полянская Г.Г. 2015. Характеристика клеточных сфероидов, полученных из линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и зачатка конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 57 (7): 480 – 490.

20. Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Кольцова А.М., Кропачева И.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2016. Получение и характеристика неиммortalизованных клеточных линий

дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста. Цитология. 58 (11): 850 – 864.

21. Крылова Т.А., Кольцова А.М., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2017. Характеристика двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека. Цитология. 59 (5): 315 – 327.

22. Крылова Т.А., Мусорина А.С., Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2018. Получение и сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из крайней плоти двух доноров одного возраста». Цитология. 60 (4): 262 – 272.

23. Литвинчук Л.Ф., Мамаева С.Е., Ковтунович И.Г., Пинаев Г.П. 1986. Кариотип постоянных клеточных линий. Изменчивость кариотипа М-HeLa при статическом и роллерном способах культивирования. Цитология 28 (1): 56 – 61.

24. Макгрегор Г. 1986. Гигантские хромосомы и видообразование у амфибий. В кн. «Эволюция генома». Москва: «Мир»: 313 – 328.

25. Мамаева С.Е. Цитогенетика клеток в культуре. Сб. «Биология клетки в культуре». 1984. Ленинград, «Наука»: 195 – 234.

26. Мамаева С.Е. 1988. Хромосомный анализ культивируемых клеток. Сб. «Методы культивирования клеток», 1988, Ленинград, «Наука»: 78 – 98

27. Мамаева С.Е. 1996. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология. 38 (8): 787 – 814.

28. Мамаева С.Е. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. 2002. Москва, «Научный мир», 236. с.

29. Маргулис Б.А. 1988. Определение видовой специфичности культивируемых клеток с помощью изоферментного анализа. Сб. «Методы культивирования клеток», 1988, Ленинград, «Наука»: 98 – 103.

30. Миллер Г.Г., Раковская И.В., Неустроева В.В., Шалунова Н.В., Смирнова Т.Д., Борхсениус С.Н. Контаминанты клеточных культур. Сб. Методы культивирования клеток, 1988, Ленинград, «Наука» 1988: 104 – 126.

31. Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Характеристика неиммортилизованной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардальной жировой ткани человека. Цитология. 61. (4): 272 – 285.

32. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. 1973. Москва, «Мир» 227 с.

33. Пинаев Г.П., Блинова М.И., Николаенко Н.С., Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Шарлаимова Н.С., Шубин Н.А. Учебное пособие «Клеточная биотехнология». СПб. Изд-во Политехнического ун-та, 206 с.

34. Полянская Г.Г. 1989. Влияние условий культивирования на кариотипическую структуру двух клеточных сублиний фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 31(7): 807 – 817.

35. Полянская Г.Г. 2000. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях (Обзор). Успехи совр. биол. 120 (6): 529 – 539.

36. Полянская Г.Г. 2009. Кариотипическая изменчивость в клеточных линиях и структура кариотипа. Сб. «Клеточные культуры» (информ. бюлл.) вып. 24: 15 – 24.

37. Полянская Г.Г. 2014. Характеристики новых клеточных линий, полученных в Коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН в 2011 – 2013 гг. Сб. «Клеточные культуры» (информ. бюлл.) 30: 22 – 33.

38. Полянская Г.Г., Абрамян Д.С., Глебов О.К. 1981. Кариотипическая структура клоновых популяций клеток китайского хомячка при длительном культивировании. Цитология. 23 (7): 818 – 830.

39. Полянская Г.Г., Дьяконова М.Ю. 1988. Влияние условий культивирования на кариотипическую структуру клеточной сублинии почки кенгуровой крысы. Цитология. 30 (11): 1355 – 1363.

40. Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н. 1996. Влияние микоплазменной контаминации двух сублиний клеток почки кенгуровой крысы на кариотипическую структуру. Цитология. 38 (1): 75 – 84.

41. Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н. 2010. Влияние *Mycoplasma salivarium* в отсутствие и присутствии L-аргинина на кариотипическую изменчивость в клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака при длительном культивировании. Цитология. 52 (12): 997 – 1004.

42. Полянская Г.Г., Кольцова А.М. 2013. Влияние субстрата, включающего белки внеклеточного матрикса, на кариотипическую изменчивость в двух клеточных линиях фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 55 (7): 463 – 471.

43. Полянская Г.Г., Мусорина А.С. 2018. Коллекция культур клеток позвоночных: создание, деятельность, каталог. СПб. Изд-во Политехнического ун-та, 184 с.

44. Полянская Г.Г., Семенова Е.Г., Шубин Н.А. 1990. Влияние криоконсервации на цитогенетические характеристики клеточной сублинии фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 32 (3): 256 – 265.

45. Полянская Г.Г., Сизова Л.С., 1996. Исследование генотоксического влияния ципрофлоксацина на культивируемые клетки почки кенгуровой крысы и фибробласты кожи индийского мунтжака. Цитология. 38 (9): 958 – 973.

46. Полянская Г.Г., Сизова Л.С., Николаенко Н.С. 1993. Кариотипическая характеристика линии фибробластов кожи индийского мунтжака при культивировании с разными сыворотками. Цитология. 35 (2): 86 – 96.

47. Прайс К.М. 1997. Синтез теломерной с-цепи. Биохимия. 62 (11): 1423 – 1431.

48. Реддел Р.Р., Брайан Т.М., Мернейн Д.П. 1997. Иммуортиализованные клетки без измеримой активности теломеразы. Биохимия. 62 (11): 1467 – 1476.

49. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. 1993. Есть ли сходство в механизмах образования "некультивируемых форм" у грамотрицательных бактерий и спор у бацилл? Молекулярная генетика, вирусология и микробиология. 6: 34–37.

50. Седова Г. П. 2008. Количественные аспекты злокачественного роста. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. 7 (2). URL: [Http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm](http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm).

51. Семенова Е.Г. 1988. Внеплановый синтез ДНК в культивируемых клетках после криоконсервации. Криобиология. (1): 17 – 20.

52. Семенова Е.Г. 1989. Действие трипсина, версена и криопротекторов на внеплановый синтез ДНК клеток в культуре в период подготовки к криоконсервации и после декриоконсервации. Криобиология. (3): 20 – 24.

53. Семенова Е.Г., Хоменко А.В., Мамаева С.Е. 1984. Изменение продолжительности клеточного цикла и кариотипа клеток L мыши при смене способа культивирования. Цитология. 26 (10): 1156 – 1160.

54. Скулачев В.П. 1997. Старение организма – особая биологическая функция, а не результат поломки сложной живой системы: биохимическое обоснование гипотезы Вейсмана. Биохимия. 62 (11): 1394 – 1399.

55. Тартаковский А.Д., Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих. Сб. «Методы культивирования клеток», 1988, Ленинград, «Наука»: 44 – 62.

56. Фрешни Р.Я. 2010. Культура животных клеток. Изд-во: «Бино». Лаборатория знаний. 706 с.

57. Хейфлик Л. 1997. Смертность и бессмертие на клеточном уровне. Биохимия. 62 (11): 1380 – 1393.

58. Царева А.А., Исаенко А.А., Урманова М.А., Юрченко М.Д., Балзовская Е.Г., Родионова М.О. 1990. Исследование кариотипа клеток линии Vero, длительно культивируемых в монослое статическим и роллерным способами. Цитология. 32 (7): 741 – 747.

59. Шаровская Ю.Ю., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Чайлахян Л.М. 2009. Исследование диффузионной связи через щелевые контакты в эмбриональных стволовых клетках человека в процессе спонтанной дифференцировки. ДАН. 427 (3): 407 – 410.

60. Шубин Н.А. Прикладная криобиология. Криотехника и организация криобанков. Сб. «Методы культивирования клеток», 2008, СПб. Изд-во Политехнического ун-та: 250 – 261.

61. Aghajani F., Hooshmand T., Khanmohammadi M., Khanjani S., Edalatkhah H., Zarnani A.H., Kazemnejad S. 2016. Comparative immunophenotypic characteristics, proliferative features, and osteogenic differentiation of stem cells isolated from human permanent and deciduous teeth with bone marrow. Mol. Biotechnol. 58 (6): 415 – 427.

62. Alessio N., Pipino C., Mandatori D., Di Tomo P., Ferone A., Marchiso M., Melone M.A.B., Peluso G., Pandolfi A., Galderisi U. 2018. Mesenchymal stromal cells from amniotic fluid are less prone to senescence

compared to those obtained from bone marrow: An in vitro study. *J Cell Physiol.* doi: 10.1002/jcp.26845.

63. Alimperti S., Lei P., Wen Y., Tian J., Campbell A.M., Andreadis S.T. 2014. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. *Biotechnol. Prog.* 30: 974 – 983.

64. Amadori M., Berneri C. 1993. Genotypic and phenotypic changes of BHK-21 cells grown in suspension cultures. *Cytotechnology.* 11 Suppl 1: S106 – 108.

65. Andaloussi E.L.S., Mäger I., Breakefield X.O., Wood M.J. 2013. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12: 347 – 357.

66. Antebi B., Rodriguez L.A. 2nd, Walker K.P. 3rd, Asher A.M., Kamucheka R.M., Alvarado L., Mohammadipoor A., Cancio L.C. 2018. Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 9: 265 – 279.

67. Apel A., Groth A., Schlesinger S., Bruns H., Schemmer P., Büchler M.W., Herr I. 2009. Suitability of human mesenchymal stem cells for gene therapy depends on the expansion medium. *Exp Cell Res.* 315: 498 – 507

68. Arutyunyan I., Elchaninov A., Makarov A., Fatkhudinov T. 2016. Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy. *Stem Cells Int.* 2016: 6901286. doi: 10.1155/2016/6901286.

69. Ashwood-Smith M.J., Friedmann G.B., 1979. Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing storage time, and X – irradiation of mammalian cells preserved at -196⁰ in dimethyl sulfoxide. *Cryobiology.* 16: 132 – 140.

70. Balasubramanian S., Thej C., Venugopal P., Priya N., Zakaria Z., Sundarraj S., Majumdar A.S. 2013. Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. *Cell Biol. Int.* 37: 507 – 515.

71. Belkin V.M., Kukharenko V.I., Volodarskaia S.M., Grinberg K.N., Mazurov V.I. 1985. Changes in fibronectin biosynthesis in human embryonal fibroblasts with trisomy for chromosomes 7 and 9. *Vopr. Med. Khim.* 31: 125 – 130.

72. Bloom S.E., Goodpasture C. 1976. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum. Genet.* 34: 199 – 206.

73. Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 279: 349-352.

74. Bogdanova-Jatniece A., Berzins U., Kozlovska T. 2014. Growth properties and pluripotency marker expression of spontaneously formed three-dimensional aggregates of human adipose-derived stem cells. *Int. J. Stem Cells.* 7: 143 – 152.

75. Bongso A., Fong C.Y. 2013. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell. Rev.* 9: 226 – 240.

76. Brand-Saberi B., Epperlein H.H., Ramonos G.E., Christ B. 1994. Distribution of extracellular matrix components in nuchal skin from fetuses carrying trisomy 18 and trisomy 21. *Cell Tissue Res.* 277: 465 – 475.

77. Chen T.R. 1977. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell Research,* 1977, 104: 255.

78. Chew J.R.J., Chuah S.J., Teo K.Y.W., Zhang S., Lai R.C., Fu J.H., Lim L.P., Lim S.K., Toh W.S. 2019. Mesenchymal stem cell exosomes enhance periodontal ligament cell functions and promote periodontal regeneration. *Acta Biomater.* pii: S1742-7061(19)30187-4. doi: 10.1016/j.actbio.2019.03.021.

79. Costello J.F., Futscher B.M., Kroes R.A., Pieper R.O. 1994. Methylation-related chromatin structure is associated with exclusion of

transcription and suppressed expression of the O-6-methylguanine DNA methyltransferase gene glioma cell line. *Mol. Cell Biol.* 14: 6515 – 6521.

80. Cox R.P., Krauss M.R., Balis M.E., Dancis J. 1972. Communication between normal and enzyme-deficient cells in tissue culture. *Exp. Cell Res.* 74: 251 – 268.

81. Danisovic L., Oravcova L., Krajciova L., Varchulova Novakova Z., Bohac M., Varga I., Vojtassak J. 2017. Effect of long-term culture on the biological and morphological characteristics of human adipose tissue-derived stem cells. *J. Physiol. Pharmacol.* 68: 149 – 158.

82. Delvig A.A., Kukhareno V.I., Belkin V.M., Mazurov V.I., Grinberg K.N., Debov S.S. 1987. Collagen and fibronectin synthesis by trisomic fibroblasts from human spontaneous abortuses. *Mol. Gen. Genet.* 209: 592 – 595.

83. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Int. Soc. Cell. Ther. Position Statement. Cytother.* 8: 315 – 317.

84. Dvorakova H., Valicek L., Reichelova M. 2005. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures and bovine sera. *Vet. Med. – Czech.* 50 (6): 262 – 268.

85. Eldering J.A., Felten C., Veilleux C.A., Potts B.J. 2004. Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals* 32, 183 – 193.

86. Estrada J.C., Torres Y., Benguría A., Dopazo A., Roche E., Carrera-Quintanar L., Pérez R.A., Enríquez J.A., Torres R., Ramírez J.C., Samper E., Bernad A. 2013. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell Death Dis.* 4: e691. Doi: 10.1038/cddis.2013.211.

87. Fong C.Y., Richards M., Manasi N., Biswas A., Bongso A. 2007. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reprod. Biomed. Online.* 15: 708 – 718.

88. Fong C.Y., Chak L.L., Biswas A., Tan J.H., Gauthaman K., Chan W.K., Bongso A. 2011. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* 7: 1 – 16.

89. Freshney R.I. *Culture of Animal cells.* USA, Alan R. Liss, Inc., New York, 1987. 397 c.

90. Gang E.J., Bosnakovski D., Figueiredo C.A., Visser J.W., Perlingeiro R.C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood.* 109: 1743 – 1751.

91. Gille J.J.P., Mullaart E., Vijg J., Leyva A.L., Arvent F., Joenje H. 1989. Chromosomal instability in an oxygen-tolerant variant of Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 219: 17 – 28.

92. Gille J.J.P., Joenje H. 1989. Chromosomal instability and progressive loss of chromosomes in HeLa cells during adaptation to hyperoxic growth conditions. *Mutat. Res.* 219: 231 – 240.

93. Guo L., Zhou Y., Wang S., Wu Y. 2014. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *J. Cell Mol. Med.* 18: 2009 – 2019.

94. Garner C.M., Hubbard L.M., Chakraborti P.R. 2000. Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. *Br. J. Biomed Sci.* 57(4): 295 – 301.

95. Hagmann S., Moradi B., Frank S., Dreher T., Kammerer P.W., Richter W., Gotterbarm T. 2013. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of

human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMS Musculoskelet Discord.* 14: 223 – 233.

96. Haque N., Widera D., Abu Kasim N.H. 2019. Stem cells from human extracted deciduous teeth expanded in foetal bovine and human sera express different paracrine factors after exposure to freshly prepared human serum. *Adv. Exp. Med. Biol.* doi: 10.1007/5584_2018_299.

97. Hay R.J., Caputo J., Chen T.R., Macy M., McClintock P., Reid Y. (Editors). *ATCC American type culture collection. Cell lines and hybridomas.* USA. 8 ed. 1994. 638 c.

98. Hay R.J.(Ed.). *ATCC quality control methods for cell lines.* 1985. *American Type Culture Collection.* USA. 1 ed: 12 – 15.

99. Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37: 614 – 636.

100. Hendijani F., Sadeghi-Aliabadi H., Haghjooy Javanmard S. 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. *Cell Tissue Bank.* 15: 555 – 565.

101. Hildebrandt C., Büth H., Thielecke H. 2009. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann. Anat.* 191: 23 – 32.

102. Hooper M.L., Subak-Sharpe J.H. 1981. Metabolic cooperation between cells. *Int. Rev. Cytol.* 69: 45 – 104.

103. Hsieh J.Y., Fu Y.S., Chang S.J., Tsuang Y.H., Wang H.W. 2010. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. *Stem Cells Dev.* 19: 1895 – 1910.

104. Huang H.I., Chen S.K., Ling Q.D., Chien C.C., Liu H.T., Chan S.H. 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tiss. Eng. (A)*. 16: 1491–1501.

105. Jiang C.M., Liu J., Zhao J.Y., Xiao L., An S., Gou Y.C., Quan H.X., Cheng Q., Zhang Y.L., He W., Wang Y.T., Yu W.J, Huang Y.F, Yi Y.T, Chen Y., Wang J. 2015. Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res*. 94: 69 –77.

106. Katsuda T., Kosaka N., Takeshita F., Ochiya T. 2013. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*. 13: 1637-1653.

107. Kiyono T. Foster S.A., Koop J.I., McDougall J.K., Galloway D.A., Klingelutz A.J. 1998. Both Rb/p16ink4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*. 369: 84 – 88.

108. Kong C.M., Lin H.D., Biswas A., Bongso A., Fong C.Y. 2019. Manufacturing of human Wharton's jelly stem cells for clinical use: selection of serum is important. *Cytotherapy*. pii: S1465-3249(19)30029-5. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.02.008.

109. Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W.J., Peeper D.S. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev*. 24: 2463 – 2479.

110. Lacroix A., Pezet M., Capel A., Bonnet D., Hennequin M., Jacob M.P, Bricca G., Couet D., Faury G., Bernicot J., Gilbert-Dussardier B. 2009. Williams-Beuren syndrome: a multidisciplinary approach. *Arch Pediatr*. 163: 273 – 282.

111. Levan G. 1970. Contributions to the chromosomal characterization of the PTK1, rat-kangaroo cell line. *Hereditas*.64: 85 – 96.

112. Li Y., Guo G., Li L., Chen F., Bao J., Shi Y.J., Bu H. 2015. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. *Cell Tissue Res*. 360: 297 – 307.

113. Lian J., Lv S., Liu C., Liu Y., Wang S., Guo X., Nan F., Yu H., He X., Sun G., Ma X. 2016. Effects of serial passage on the characteristics and cardiac and neural differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 2016:9291013. doi: 10.1155/2016/9291013. 12 p.
114. Liang X., Zhang L., Wang S., Han Q., Zhao C. 2016. Exosomes secreted by mesenchymal stems cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring mir-125a. *J.of Cell Science.* 129: 2182 – 2189.
115. Lifantseva N., Koltsova A., Krylova T., Yakovleva T., Poljanskaya G., Gordeeva O. 2011. Expression Patterns of Cancer-Testis Antigens in Human Embryonic Stem Cells and Their Cell Derivatives Indicate Lineage Tracks. *Stem Cells Int.* Vol 2011, Article ID 795239, 13 pages.
116. Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol.* 34: 328–334.
117. Mazur P. 1970. Cryobiology: The freezing of biological system. *Science.* 168: 939 – 948.
118. McKusick V. 1980. The anatomy of the human genome. *J. Hered.* 71: 370 – 391.
119. Merryweather-Clarke A.T., Cook D., Lara B.J., Hua P., Repapi E., Ashley N., Lim S.Y., Watt S.M. 2018. Does osteogenic potential of clonal human bone marrow mesenchymal stem/stromal cells correlate with their vascular supportive ability? *Stem Cell Res Ther.* 9: 351 – 365.
120. Miceli V., Pampalone M., Vella S., Carreca A.P., Amico G., Conaldi P.G. 2019. Comparison of Immunosuppressive and Angiogenic Properties of Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells between 2D and 3D Culture Systems. *Stem Cells Int.* 2019:7486279. doi: 10.1155/2019/7486279.

121. Morita T., Nagaki T., Fukuda I., Okumura K. 1991. Effect of pH on the activity and stability of clastogens in the in vitro chromosomal aberration test with Chinese hamster ovary K1 cells. *Mutat. Res.* 262: 159 – 166.
122. Morita T., Takeda K., Okumura K. 1990. Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 240: 195 – 202.
123. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* 113 (Pt 7): 1161 – 1166.
124. Murphy K.C., Fang S.Y., Leach J.K. 2014. Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing. *Cell Tiss. Res.* 357: 91 – 99.
125. Nekanti U., Rao V.B, Bahirvani A.G, Jan M., Totey S., Ta M. 2010. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 19: 117 – 130.
126. Niedernhofer L.J., Gurkar A.U., Wang Y., Vijg J., Hoeijmakers J. H. J., Robbins P.D. 2018. Nuclear genomic instability and aging. *Annu. Rev. Biochem.* 87: 295 – 322.
127. Nielsen K. 1972. The chromosomes of an in vitro derivative of an Ehrlich ascites tumor of the mouse during its adaptation from monolayer to suspension culture. *Hereditas* 70: 217 – 224.
128. Oliver-Vila I., Coca M.I., Grau-Vorster M., Pujals-Fonts N., Caminal M., Casamayor-Genescà A., Ortega I. Reales L., Pla A., Blanco M., García J., Vives J. 2016. Evaluation of a cell-banking strategy for the production of clinical grade mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly. *Cytotherapy.* 18: 25 – 35.

129. Otto E., Zalewski C., Kaloss M., Del Giudice R.A., Gardella R., McGarrity G.J. 2006. Quantitative detection of cell culture Mycoplasmas by a one step polymerase chain reaction method. *Methods in Cell Science* 18: 261 – 268.
130. Ouspenski I.I., Elledge S.J., Brinkley B.R. 1995. Genes involved in maintenance of chromosome stability identified by genetic selection in budding yeast. *Pros. on chromosome segregation and aneuploidy*. Edit. by A. Abbondandolo, B.K. Vig, R. Roi. April 24-29, Sorrento, Italy: 343 – 355.
131. Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas*. 90: 1 – 4.
132. Park S.B., Seo K.W., So A.Y., Seo M.S., Yu K.R., Kang S.K., Kang K.S. 2012. SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death Differ*. 19: 534 – 545.
133. Phinney D.G. 2007. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle*. 6: 2884 – 2889.
134. Poljanskaya G.G., Vakhtin Y.B. 2003. The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system. *Tsitologiya*. 45 (2): 115 – 131.
135. Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D., Miloso M., Redondo J., Riva G., Baronchelli S., Dalprà L., Tredici G. 2012. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of *in vitro* cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther*. 3: 47 – 63.
136. Reumann M.K., Linnemann C., Aspera-Werz R.H., Arnold S., Held M., Seeliger C., Nussler A.K., Ehnert S. 2018. Donor site location is critical for proliferation, stem cell capacity, and osteogenic differentiation of adipose mesenchymal stem/stromal cells: implications for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci*. 19. pii: E1868. Doi: 10.3390/ijms19071868

137. Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 98: 2615 – 2625.

138. Riekstina U., Cakstina I., Parfejevs V., Hoogduijn M., Jankovskis G., Muiznieks I., Muceniece R., Ancans J. 2009. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev*. 5: 378 – 386.

139. Rudd N.L., Hoar D.I., Williams S.E., Hennig U.G.G. 1989. Genotype and the cryopreservation process affect the levels of aneuploidy and chromosome breakage in cultured human fibroblasts. *Genome*. 32: 196 – 202.

140. Savickienė J., Baronaitė S., Zentelytė A., Treigytyė G., Navakauskienė R. 2016. Senescence-associated molecular and epigenetic alterations in mesenchymal stem cell cultures from amniotic fluid of normal and fetus-affected pregnancy. *Stem Cells Int*. 2016: 2019498.

141. Seabright M., Cooke P., Wheeler M. 1971. Variation in trypsin banding at different stages of contraction in human chromosomes and the definition, by measurement, of the 'average' karyotype. *Hum. Genet*. 29: 35 – 40.

142. Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*. 98: 93 –107.

143. Seo E., Basu-Roy U., Gunaratne P.H., Coarfa C., Lim D.S., Basilico C., Mansukhani A. 2013. SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage. *Cell Rep*. 3: 2075 – 2087.

144. Shaffer L.G., McGowan-Jordan J., Schmid M. (Eds.). 2013. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 140 p.

145. Shepard J.S., Pettengill O.S., Wurster-Hill D.H., Sorenson G.D. 1979. Karyotypic evolution associated with loss of tumorigenicity. *JNCI*. 62: 547 – 555.
146. Sherr C.J., De Pinho R.A. 2000. Cellular senescence: Mitotic Clock or Culture Shock? *Cell*. 102: 407 – 410.
147. Sotiropoulou P.A, Perez S.A., Salagianni M., Baxevanis C.N., Papatichail M. 2006. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 24: 462 – 471.
148. Strauss B.S. 1990. The control of O⁶ - methylguanine – DNA methyltransferase (MGMT) activity in mammalian cells: A pre-molecular view. *Mutat. Res*. 233: 139 – 150.
149. Sturrock J.E., Nunn J.F. 1978. Chromosomal damage and mutations after exposure of Chinese hamster cells to high concentrations of oxygen. *Mutat. Res*. 57: 27 – 33.
150. Sumner A.T., Evans H.J., Buckland R.A. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature* 232: 31 – 32.
151. Sun X., Meng H., Wan W., Xie M., Wen C. 2019. Application potential of stem/progenitor cell-derived extracellular vesicles in renal diseases. *Stem Cell Res. Ther*. 10: 8 – 16.
152. Thaweessaphithak S., Tantrawatpan C., Kheolamai P., Tantikanlayaporn D., Roytrakul S., Manochantr S. 2019. Human serum enhances the proliferative capacity and immunomodulatory property of MSCs derived from human placenta and umbilical cord. *Stem Cell Res Ther*. 10(1): 79 – 96.
153. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282: 1145 – 1147.

154. Truong N.C., Bui K.H., Van Pham P. 2018. Characterization of senescence of human adipose-derived stem cells after long-term expansion. *Adv. Exp. Med. Biol.* Doi: 10.1007/5584_2018_235
155. Uphoff C.C., Gignac S.M., Drexler H.G. 1992. Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. *J. Immunol. Methods.* 149(1): 43 – 53.
156. Uphoff C.C., Drexler H.G. 2013. Detection of mycoplasma contamination. *Methods Mol. Biol.* 946: 1 –13.
157. Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Saffrich R., Benes V., Blake J., Pfister S., Eckstein V., Ho A.D. 2008. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One.* 3: e2213. Doi: 10.1371/journal.pone.0002213
158. Wong-Lee J.G, Lovett M. 1993. Rapid and sensitive PCR method for identification of Mycoplasma species in tissue culture. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic molecular microbiology principles and applications.* Washington, DC: American Society for Microbiology; p. 257e60.
159. Xiao L, Kumazawa Y, Okamura H. 2014. Cell death, cavitation and spontaneous multi-differentiation of dental pulp stem cells-derived spheroids in vitro: a journey to survival and organogenesis. *Biol Cell.* 106: 405 – 419.
160. Yoon D.S., Kim Y.H., Jung H.S., Paik S., Lee J.W. 2011. Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Prolif.* 44: 428 – 440.
161. Young L., Sung J., Stacey G., Masters J.R. 2010. Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nat. Protoc.* 5: 929 – 934.

162. Yu J., Shi J., Zhang Y., Zhang Y., Huang Y., Chen Z., Yang J. 2018. The replicative senescent mesenchymal stem/stromal cells defect in DNA damage response and anti-oxidative capacity. *Int. J. Med. Sci.* 15: 771 – 781.