

КОНСПЕКТ

История развития метода

Впервые в середине XIX века французский ученый Клод Бернар предположил, что клетка как основной элемент живого организма должна стремиться поддерживать свои внутренние условия вне организма. Если различия между внутренними и внешними условиями будут незначительными, то высока вероятность выживания, роста и деления клетки. Развитию метода значительно способствовало открытие в 1940-х годах антибиотиков, позволивших получать свободные от контаминантов культуры клеток, и создание ферментов для выделения клеток из ткани.

Метод культуры клеток зародился в начале XX века. Его пионеры — Росс Харрисон (1907 год) и Алексис Каррель (1912 год) — заложили основы культивирования тканей вне организма. Изначально использовалась техника эксплантатов, когда целые фрагменты тканей помещались в питательную среду. Позже, благодаря работам Роуса и Джонсона (1916), началось активное применение диспергированных клеточных культур, позволяющих исследовать индивидуальные клетки отдельно от окружающих тканей.

В свое время Харрисон (1907 г.) выбрал лягушку как источник ткани главным образом потому, что она является холоднокровным животным, и соответственно, культивирование не требовало инкубации. Кроме того, поскольку регенерация тканей более распространена у низших позвоночных, он, возможно, предположил, что рост выделенного образца будет более успешным, чем для ткани млекопитающих. Хотя его метод вызвал новую волну интереса к культивированию тканей *in vitro*, лишь некоторые ученые последовали примеру Харрисона в выборе вида организма. Влияние медицины обусловило развитие интереса к теплокровным животным, у которых как нормальное развитие, так и патологические процессы аналогичны процессам, протекающим в организме человека. Доступность различных тканей, многие из которых хорошо росли в культуре, сделала излюбленным объектом для исследования эмбрион из куриного яйца; однако развитие экспериментального животноводства, в том числе создание инбредных линий грызунов, вывели млекопитающих на передний край. Хотя куриные эмбриональные ткани могли обеспечить разнообразные клеточные линии в первичной культуре, ткани грызунов имели ряд преимуществ при создании постоянных клеточных линий (Эрл, 1943 г.), а также предоставили широкий спектр перевиваемых опухолей.

Первым клонированным клеточным штаммом был L929, выделенный из мышинных L-клеток методом капиллярного клонирования (Санфорд, 1948 г.). В 1950-х годах для анализа вирусных бляшек на монослое клеточных культур Дюльбекко (1952 г.) описал метод получения монослойных культур с использованием трипсина, который стал затем широко применяться в практике культивирования. Возможность создания клеточной суспензии из единичной клетки, полученной путем предварительной трипсинизации

эксплантата, способствовала дальнейшему развитию клонирования клеточных линий.

В 1952 г. была получена Геом широко известная линия раковых клеток человека HeLa. Впоследствии она была клонирована Паком (1955 г.) с использованием облученного рентгеном фидерного слоя клеток. Благодаря этому интерес к человеческим тканям значительно возрос. Этому интересу позже способствовали работы Леонарда Хейфлика по исследованию клеточного цикла (1961 г.) и потребности вирусологов и молекулярных генетиков, работающих с человеческими клетками и тканями.

Это способствовало получению большого числа уникальных перевиваемых линий клеток человека и животных: L, L929, Vero, CV, 4647, Her, Fl, Chimp liver и другие. Впервые полученные культуры клеток и известные 5 перевиваемые линии клеток человека и животных заняли важное место в проведении фундаментальных исследований в качестве модели изучения структуры и функции клеток, внутриклеточных структур, хромосомного аппарата, что позволило получать уникальные результаты в цитологии и генетике. Наибольшее развитие метода культур клеток или поддержания *in vitro* жизнедеятельности клеток, выделенных из первичного источника (ткань или орган), приобрел в середине XX века в связи с исследованиями в области вирусологии.

Культивирование клеток разных тканей *in vitro* позволило не только исследовать особенности размножения вирусов в клетках, осуществлять их типирование, но и получать количество, необходимое для экспериментальных исследований. Выращивание вирусов в культурах клеток дало возможность получения чистого вирусного материала для производства вакцин. Вакцина против полиомиелита стала одним из первых препаратов, массово произведенных с использованием технологии культивирования клеток. В 1954 г. Эндерс, Уэллер и Роббинс получили Нобелевскую премию «За открытие способности вируса полиомиелита расти в культурах различных тканей». Первичные, диплоидные и перевиваемые культуры клеток имеют огромное значение и в настоящее время. Благодаря способности вирусов размножаться в клетках, культуры клеток получили широкое распространение в проведении вирусологических исследований и производстве вакцинных и диагностических препаратов. Чрезвычайно важной оказалась возможность получения генно-инженерных лекарственных препаратов или производства моноклональных антител. Значительный интерес общества и ученых к методу в последние годы объясняется открытием стволовых и прогениторных клеток, перспективой применения и внедрением в клиническую практику новых, более эффективных методов лечения многих дегенеративных заболеваний человека, при которых средством восстановления утраченной функции поврежденных органов и тканей становятся клетки.

Преимущества и недостатки метода культуры ткани

Табл.1
Преимущества и недостатки
метода культуры ткани

<i>Категория</i>	<i>Преимущества</i>	<i>Недостатки</i>
Физико-химические свойства окружения	Контроль рН, температуры, осмотического давления	Строго асептические Условия
Физиологические свойства	Контроль концентрации питательных и биологически активных веществ	Строгое поддержание условий культивирования
	Строгое поддержание условий культивирования регуляция межклеточных взаимодействий (введение матриксов)	
Биологические свойства	Однородность клеточных линий	Нестабильность клеточных линий
	Легкоосуществимая характеристика клеточных линий	Поддержание клеток в состоянии дифференцировки
	Криохраниение	Возможность контаминации другими клеточными линиями
	Повторяемость и воспроизводимость результатов	
Экономика процессов	Сертификация и аккредитация любой клеточной линии Контроль концентрации и времени	Высокая стоимость реагентов
	Экономия реагентов	
	Контроль концентрации и времени	
	Механизация процесса	

Два основных преимущества техники культуры ткани заключаются в возможности очень точного контроля физико-химических свойств окружения (рН, температуры, осмотического давления, парциального давления O_2 и CO_2) и физиологических условий, которые могут поддерживаться относительно неизменными, но не всегда могут быть определены. Большинство клеточных

линий еще пока требуют для своего роста добавок в среду сыворотки или других недостаточно изученных компонентов. Эти добавки варьируют и содержат неопределенное количество элементов, таких как гормоны и другие регуляторные вещества.

Образцы тканей всегда разнородны. Повторно взятые образцы даже из одной и той же ткани различны по клеточному составу. Предполагается, что после одного-двух пересевов культивируемые клеточные линии однородны (или, по крайней мере, единообразны) по составу, поскольку клетки беспорядочно перемешиваются при каждом переносе и селективное давление условий культивирования приводит к формированию гомогенной культуры наиболее устойчивых типов клеток. Следовательно, в каждой субкультуре репликативные образцы идентичны друг другу, и характеристика клеточных линий может сохраняться в нескольких поколениях и быть неизменной при замораживании и хранении в жидком азоте. Поскольку экспериментальные самовоспроизводящиеся клетки фактически идентичны, необходимость вариационного статистического анализа уменьшается.

В культурах тканей можно осуществить непосредственное воздействие на клетки определенных низких концентраций реагентов. Следовательно, для достижения аналогичного эффекта требуется использование меньших концентраций реагентов, чем *in vivo*, где до 90% действующего вещества теряется при выведении и распределении по другим тканям, которые не изучаются в данном эксперименте. Проведение скрининговых исследований с большим количеством параметров и использованием самовоспроизводящихся клеток дешевле, при этом исчезает необходимость решения юридических, моральных и этических вопросов, связанных с экспериментами на животных.

Если свойства дифференцированных клеток были утрачены по какой-либо причине, трудно обнаружить сродство клеток с функционально активными клетками тканей, из которых они были получены. Поэтому для характеристики и идентификации происхождения клеток требуются их постоянные маркеры. Кроме того, для экспрессии этих маркеров могут потребоваться совершенствование и модификация условий культивирования.

Нестабильность является главной проблемой многих постоянных клеточных линий, что связано с нестабильностью анеуплоидного набора хромосом в животных клетках. Даже в короткоживущих культурах нетрансформированных клеток отмечается гетерогенность интенсивности и способности к дифференцировке, которые могут привести к вариативности результатов от одного пассажа к другому.

Типы культуры ткани

Существуют три основных метода формирования культур.

- 1) *Органная культура* подразумевает, что в культуре сохранены, по крайней мере частично, структурно-функциональные характеристики ткани *in vivo*. Для этого кусочки ткани культивируются на границе раздела сред жидкость-газ (на плотике, решетке или гелевой подложке), которые предпочтительны для фиксации сферической или трехмерной структуры.
 - Целые фрагменты ткани сохраняются в питательной среде.
 - Применяется для изучения гистологических особенностей и межклеточных взаимодействий.
 - Подходит для эмбриональных тканей, плохо совместима с длительным культивированием.
- 2) *Первично эксплантируемая культура* подразумевает, что фрагмент ткани (эксплантат) помещается на стекло (или пластик) в жидкую среду, где после прикрепления активизируется миграция клеток по поверхности плотного субстрата.
 - Фрагмент ткани помещается на твёрдый субстрат (чаще всего стекло или пластик).
 - Клетки выходят из эксплантата и образуют монослой.
 - Позволяет сохранить некоторые черты исходной ткани, но рост ограничен миграционными свойствами клеток.
- 3) *Клеточная культура* предполагает, что фрагмент ткани или полученная из первичного эксплантата культура измельчается (механически или ферментативно) до клеточной суспензии, которая затем культивируется как адгезированный монослой на плотном субстрате или как суспензия в культуральной жидкой среде. В результате сохранения клеточных взаимодействий, изначально существовавших в ткани, которая была использована для культивирования, органные культуры сохраняют специфические свойства этой ткани.
 - Клетки предварительно разрушаются механически или ферментативно (обычно трипсином).
 - Могут расти в форме монослоя (адгезивный вариант) или в суспензии (без привязки к субстрату).
 - Наиболее универсальный и распространенный тип культуры.

Из первичного эксплантата или диспергированной клеточной суспензии можно получить клеточные культуры. Поскольку в таких культурах часто отмечается клеточная пролиферация, задача формирования постоянных клеточных культур представляется выполнимой. Монослой или клеточная суспензия со значительной фракцией растущих клеток может быть отделен путем ферментативного воздействия или простым разведением и пересевом (субкультивированием) во флакон со свежей питательной средой. Эта процедура называется *пассажем*, а дочерняя культура, сформированная таким образом, представляет собой начало *клеточной линии*.

Формирование клеточной линии из первичной культуры подразумевает:

- 1) увеличение общего количества клеток после нескольких генераций;
- 2) конечное преобладание клеток или линий дифференцировки, обладающих способностью к высокому темпу роста;
- 3) высокую степень однородности клеточной популяции.

Культуры первичных клеток сравнительно легко получались из разнообразных тканей. Некоторое время клетки экспоненциально размножаются, но примерно через 6 месяцев скорость роста культуры снижается и уже через 10 месяцев клетки дегенерируют и погибают. Это явление наблюдается примерно после 50 генераций, когда из одной первичной клетки образуется примерно 1022 клеток. В случае получения первичных культур из взрослых тканей, количество делений ещё меньше и составляет примерно 20. За данным явлением закрепилось название «Предел Хейфлика», в честь учёного, занимавшегося исследованиями в этой области и выдвинувшего объяснение данному феномену. Предел Хейфлика связан с сокращением теломерных участков ДНК на концах хромосом. Если клетка не имеет активной теломеразы, как преимущественное большинство соматических клеток, при каждом делении клетки теломеры сокращаются, потому что ДНК-полимераза неспособна реплицировать концы молекулы ДНК. Когда после определенного числа делений теломеры исчезают совсем, клетка обычно становится "арестованной" в определенной стадии клеточного цикла или запускает программу апоптоза. На ранних стадиях клетки сохраняют правильный диплоидный набор хромосом, но уже на более поздних этапах большинство клеток становится анеуплоидами. В редких случаях такие анеуплоидные клетки выживают, начинают размножаться и превращаются в клеточный штамм. Клеточные штаммы обладают специфическими свойствами, которые сохраняются в течение длительного культивирования. Многие стабильные клеточные штаммы способны к неопределенно длительному росту и размножению в культуре, причём это связано с анеуплоидным кариотипом.

Монослойная культура означает, что при наличии необходимых условий клетки будут прикрепляться к субстрату и в норме будут делиться и распространяться таким способом. Прикрепление (и обычно степень распластанности) к субстрату является необходимой предпосылкой для клеточной пролиферации. Монослойная культура является методом культивирования, общепринятым и наиболее распространенным для большинства нормальных клеток, за исключением гематопоэтических.

Суспензионную культуру обычно получают из клеток, которые способны выжить и делиться без прикрепления к субстрату (*независимость от подложки*); этой способностью обладают гематопоэтические клетки, трансформированные клеточные линии и клетки, выделенные из злокачественных опухолей.

Гистотипическая культура – культура высокой плотности, «тканеобразную», полученную из одной клетки.

Органотипическая культура подразумевает присутствие более чем одного типа клеток, взаимодействующих так, как они могли бы это делать в органах, из которых они ведут свое происхождение (либо имитируют это взаимодействие). Органотипическая культура открывает новые перспективы для изучения клеточного взаимодействия внутри отдельной определенной популяции однородных и, предположительно, генетически и фенотипически определенных клеток.

Использование культуры клеток и тканевых эксплантатов

1. Медицинские и клинические применения

1.1. Диагностика и мониторинг:

- **Генетические заболевания:** анализ клеток амниотической жидкости для выявления врожденных аномалий.
- **Мониторинг токсичности:** оценка воздействия медикаментов и промышленных химикатов на клетки.
- **Диагностика инфекций:** изучение инфекционных агентов и реакции иммунной системы.

1.2. Лечение и терапия:

- **Лечение ожогов:** выращивание функциональных клеточных пластов для трансплантации пациентам.
- **Имплантация клеток:** использование собственных или донорских клеток для восстановления повреждений тканей.
- **Генная терапия:** коррекция дефектов генов и возврат клеток пациенту.
- **Терапия стволовыми клетками:** применение эмбриональных и мультипотентных стволовых клеток для лечения дегенеративных заболеваний.

1.3. Трансплантация и хирургия:

- **Создание тканевых эквивалентов:** выращивание искусственных тканей для трансплантации.
- **Реконструкция тканей:** восстановление целостности и функции поврежденных участков тела.

2. Промышленные и биотехнологические применения

2.1. Производство лекарственных препаратов:

- **Биофармацевтика:** крупномасштабное производство рекомбинантных белков (инсулин, интерферон, гормон роста).
- **Производство вакцин:** изготовление противовирусных вакцин (против кори, бешенства и др.).

2.2. Моноклональные антитела:

- **Получение антител:** создание специфических антител для диагностики и терапии.
- **Исследование эпитопов:** изучение структуры антигенов и их распознавание антителами.

2.3. Производство клеточных продуктов:

- **Выделение и очистка активных соединений:** получение биологически значимых молекул из клеточных культур.
- **Оптимизация производственных процессов:** улучшение технологических схем для увеличения выхода продукции.

3. Научные исследования

3.1. Базовые клеточные процессы:

- **Метаболизм и энергетика:** изучение энергетических путей и метаболических реакций.
- **Дифференцировка и развитие:** исследование механизмов превращения клеток в специализированные типы.
- **Апоптоз и некроз:** изучение запрограммированной смерти клеток и некротических процессов.

3.2. Межклеточные взаимодействия:

- **Паракринный контроль:** влияние одних клеток на жизнедеятельность соседних.
- **Кооперативные эффекты:** совместное функционирование клеток в составе тканей.
- **Передача сигналов:** изучение сигнальных каскадов и регуляторов клеточной активности.

3.3. Генетика и молекулярная биология:

- **Трансфекция и трансформация:** встраивание чужеродной ДНК в клетки для изучения эффектов.
- **Иммортализация:** получение бессмертных клеточных линий для долговременных исследований.
- **Проект “Геном человека”:** участие в расшифровке и изучении последовательности человеческой ДНК.

4.Тканевая инженерия

- **Создание тканевых конструкций:** выращивание полноценных тканей и органов для трансплантации.
- **Стволовые клетки:** использование плюрипотентных и мультипотентных стволовых клеток для восстановления тканей.
- **Матрицы и каркасы:** разработка синтетических и природных материалов для поддержки роста клеток.
- **Интеграция генной инженерии:** сочетание методов генной коррекции и тканевой инженерии для улучшения функционала создаваемых тканей.

5.Экологические и сельскохозяйственные применения

- **Экологический мониторинг:** оценка токсичности веществ и загрязнений окружающей среды.
- **Агрономия и ветеринария:** изучение вредителей сельскохозяйственных растений и животных, разработка защитных стратегий.
- **Рыболовство:** исследование водных экосистем и сохранение морских ресурсов.