

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН ДЛЯ ТЕОРЕТИЧНО ТА КЛІНІЧНО МЕДИЦИНИ

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН ДЛЯ ТЕОРЕТИЧНО ТА КЛІНІЧНО МЕДИЦИНИ – На даний час метод культивування клітин стає основою сучасних наукових технологій у біології та медицині. Практично будь-які клітини людини можуть бути введені в культуру *in vitro* і служити засобом та об'єктом у багатьох галузях фундаментальних і прикладних досліджень. У статті розглянуто основні типи клітинних культур, оптимальні умови їх вирощування та застосування на практиці. Коротко охарактеризовано тенденції в галузі дослідження стовбурових клітин.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК В ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ – На сегодняшний день метод культивирования клеток становится основой современных научных технологий в биологии и медицине. Практически любые клетки человека могут быть введены в культуру *in vitro* и служат средством и объектом во многих областях фундаментальных и прикладных исследований. В статье рассмотрены основные типы клеточных культур, оптимальные условия их выращивания и использование на практике. Коротко охарактеризовано тенденции в области исследования стволовых клеток.

OUTLOOK FOR CELL CULTURE METHOD USING IN THEORETICAL AND CLINICAL MEDICINE – Today cell culture method is becoming foundation of modern scientific technologies in biology and medicine. Virtually any human cells may be introduced in *in vitro* culture and then they can be means and matter of different fields of fundamental and applied investigation. Main types of cell culture, optimal conditions for their growing and their using in practice are considered in the article. The tendencies in stem cell researching area are described in brief.

Ключові слова: культура клітин, перевага, застосування, нові технології в медицині, стовбурові клітини.

Ключевые слова: культура клеток, преимущество, использование, новые технологии в медицине, стволовые клетки.

Key words: cell culture, advantage, use, modern scientific technologies in medicine, stem cells.

ВСТУП Культивування клітин *in vitro* почали систематично використовувати в науці у другій половині ХХ століття. На даний час цей метод стає основою сучасних наукових технологій в біології та медицині, його широко застосовують у різних галузях фундаментальних і прикладних досліджень. Перелік типів клітин ссавців, які вдалося культивувати вченим *in vitro*, досить великий. Можна стверджувати, що для будь-яких клітин тварин і людини є можливість створити такі оптимальні умови, за яких вони зберігатимуть основні структурні параметри і біологічні функції, характерні їм *in vivo*.

Для тривалого виживання поза організмом клітини потребують забезпечення поживними речовинами та збереження асептичних умов. Крім того, необхідно підтримувати сталу температуру, рН – 7,2-7,4 і 5% концентрацію вуглекислого газу в культуральному середовищі [1, 2]. Одна з найважливіших переваг клітин в культурі – можливість прижиттєвого спостереження з ними за допомогою мікроскопа. Важливо і те, що культури клітин можуть бути рівноцінною заміною клінічних експериментів, для яких була б потрібна участь доб-

ровольців. Експерименти, що вимагають для з'ясування того або іншого питання залучення 1000 чоловік, можуть бути з рівною статистичною достовірністю поставлені на 100 культурах на покривних скельцях [2].

Основні типи клітинних культур Клітинні культури поділяються на первинні та вторинні (або постійні клітинні лінії). Первинні культури отримують безпосередньо з фрагментів інтактних тканин чи органів або шляхом утворення клітинно суспензії за допомогою ферментативно дезагрегації шматочків матеріалу трипсином. Такі культури спочатку гетерогенні, в них найповніше представлені типи клітин тієї тканини, з якої вони були отримані, та згодом починають домінувати фібробласти, як клітини з найвищим проліферативним потенціалом. Приготування первинних культур – процес трудомісткий і малоефективний, так як період життєздатності таких клітин *in vitro* досить обмежений. Однак протягом невеликого часу існування клітини первинних культур зберігають основні характеристики диференційованих клітин *in vivo*.

Вторинні культури складаються з однотипних клітин, що володіють певними (необхідними досліднику) відносно постійними властивостями і характеристиками. Їх можна серійно розмножувати тривалий час або необмежено довго. Клітинні лінії з обмеженим періодом існування складаються зазвичай із нормальних диплоїдних клітин, що підтримують деякий ступінь диференціації і дають обмежену кількість генерацій. Так, наприклад, тривалість життя нормальних диплоїдних фібробластів у культурі досягає 50-60 популяційних подвоєнь (клітинних поділів) [3, 4]. З часом вторинні культури нормальних (нетрансформованих, непухлинних) клітин набувають деяких незворотних змін, що свідчить про старіння *in vitro* (табл. 1).

Постійні ("безсмертні") клітинні лінії отримують безпосередньо з клінічних пухлин або опосередковано, трансформуючи *in vitro* вторинні культури нормальних клітин у "безсмертні" за допомогою іонізуючого опромінення, хімічних канцерогенів чи онкогенів [5]. Відомо декілька векторів для перенесення генетичного матеріалу (онкогенів) в клітини, зокрема, це віруси, плазмідні фаги, епісоми тощо [5, 6]. Для трансформації культивованих клітин ссавців найчастіше використовують ретровіруси та пухлинні ДНК-віруси [5]. Поява постійно ліній трансформованих клітин констатується дослідниками в основному за морфологічними змінами (зменшення розміру клітин, збільшення ядерно-цитоплазматичного співвідношення, зниження адгезивності), за збільшенням швидкості росту (час подвоєння клітин у культурі знижується з 36-48 до 12 годин), за збільшенням ефективності клонування тощо (табл. 2). Трансформовані культури, проте, мають певні недоліки: змінений каріотип клітин не дозволяє повністю екстраполювати результати експериментів на нормальні клітини людського чи тваринного організму (табл. 3).

Таблиця 1. Ознаки старіння культивованих клітин ссавців

1. Зростає тривалість клітинного поділу
2. Зменшується кількість клітин у клітинному циклі
3. Зменшується щільність насичення клітин у культуральному посуді
4. Зростає відсоток поліпло ді
5. Зменшується адгезія клітин до субстрату
6. Знижується ДНК-синтез
7. Знижується чутливість до факторів росту
8. Змінюється організація цитоскелета
9. Зменшується поглинання амінокислот з культурального середовища
10. Сповільнюється білковий обмін

Таблиця 2. Порівняльні характеристики нормальних і трансформованих клітин у культурі

Нормальні клітини	Трансформовані клітини
1. Обмежений термін життя	1. Здатність до необмеженого культивування
2. Залежність росту клітин від прикріплення до субстрату	2. Незалежність росту клітин від прикріплення до субстрату
3. Оборнено-пропорційна залежність швидкості проліферації від щільності клітин	3. Висока швидкість проліферації (час подвоєння зменшується в 3-4 рази)
4. Зміна властивостей клітин в процесі старіння <i>in vitro</i>	4. Знижена залежність проліферації від щільності клітин
	5. Невимогливість до якості субстрату, факторів росту
	6. Зменшення залежності клітин від додавання сироватки
	7. Зменшення адгезивно здатності
	8. Генетична нестабільність (гетеропло дність, анеупло дність)
	9. Здатність формувати колоні в м'якому агарі

Таблиця 3. Властивості трансформованих клітин

Переваги	Недоліки
1. Велика швидкість росту	1. Підвищена хромосомна нестабільність
2. Висока щільність клітинно культури	2. Відхилення від фенотипу
3. Здатність рости в суспензії	3. Втрата специфічних тканинних маркерів

Варто зазначити, що трансформовані клітини не завжди набувають ознак злоякісності, і вони не обов'язково еквівалентні раковим клітинам *in vivo*. Тільки клітини, що здатні формувати інвазивні пухлини, можуть називатися злоякісно трансформованими [4, 5].

Крім нормальних і трансформованих клітинних ліній розрізняють ще й іморталізовані культури. Останні здатні до безмежного культивування, однак їх розмноження не відбувається безконтрольно. Проліферація таких клітин залежить від багатьох чинників, які впливають і на нормальні клітини: прикріплення до субстрату, щільність клітин в культуральному посуді, контактне інгібування та ін. [4]. Іморталізовані клітини за властивостями займають проміжне місце між незміненими та трансформованими культивованими клітинами. Прикладом іморталізовано культури є постійна лінія подоцитів – основного компонента фільтраційного бар'єра в клубочках нирки (рис. 1). Відпрацьована техніка умовно іморталізації даних клітин за допомогою трансфекції ретровірусом рZipNeoSV(X)1 дозволяє отримувати постійні клітинні лінії подоцитів від пацієнтів з різними нирковими хворобами [7]. Таким чином, дослідники отримують зручну модель для вивчення властивостей подоцитів, їх здатності до диференціації, дедиференціації, відновлення після пошкодження, експресії різноманітних генів та локалізації структурних білків, реакції на різноманітні біологічно активні речовини тощо [7-9].

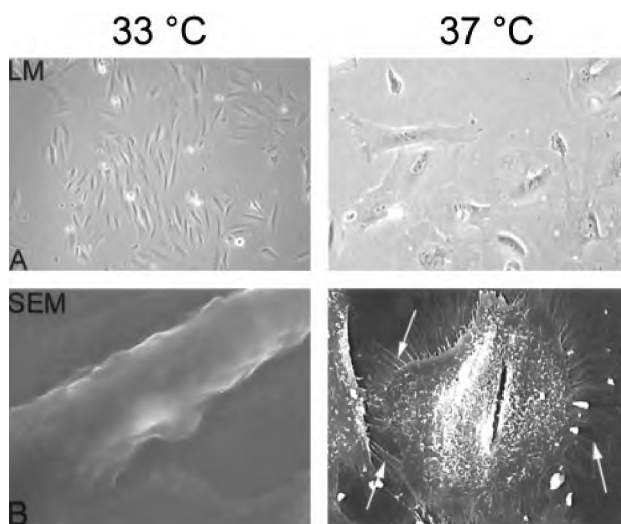


Рисунок 1. Морфологія культивованих подоцитів: А. Світлова мікроскопія. Недиференційовані (зліва, при 33 °С) та диференційовані (справа, 37 °С) культивовані подоцити; В. Скануюча електронна мікроскопія: недиференційована клітина без відростків та диференційована клітина з тонкими відростками (показано стрілками) з інтердигтаціями між клітинами та структурами, подібними до фільтраційних щілин [7].

Практичне значення методу клітинних культур
Використання методу культивування клітин дало змо-

гу виявити і вивчити конкретні хімічні регулятори клітинного поділу, диференціації, міграції та метаболізму, а також визначити молекулярні механізми [1, 2].

Завдяки культивуванню клітин можливості дослідження і діагностики розширюються майже безмежно, оскільки є можливість оцінити не тільки морфологічні і біохімічні зміни, але й зміни у поведінці клітин, їх реакції на різні агенти. Велика перевага методу культури клітин полягає в тому, що експерименти з використанням клонів є повторюваними і несуперечливими. Клітинні лінії застосовують для тестування і вивчення механізму дії різних речовин: лікарських препаратів, детергентів, косметичних засобів, інсектицидів, консервантів [10]. Результати, отримані на клітинних культурах, не можна переносити на цілий організм, але якщо речовина, що вивчається, має негативний вплив на декілька ліній культивованих клітин, то від не слід чекати несприятливого ефекту і на організм людини.

Найбільшого поширення у питанні культивування клітин набули культури фібробластів. Широке використання фібробластів для вивчення патогенезу і діагностики спадкових хвороб зумовлене не тільки легкістю їх культивування, але й тим, що сполучна тканина, головним клітинним елементом якої є фібробласти, складає значну частину маси тіла. Окрім того, фібробласти є в складі строми багатьох органів, є важливими учасниками їх морфогенезу і створюють умови мікрооточення, що необхідне для диференціювання і функціонування спеціалізованих клітин, наприклад кардіоміоцитів [11, 12], епідермоцитів [13] стовбурових клітин [14] тощо. У фібробластах є фермент моноаміноксидаза, зміни активності якого характерні для деяких нервових і психічних захворювань. Фібробласти містять рецептори до глюкокортикоидних гормонів, інсуліну, деяких нейромедіаторів. Тому ці клітини використовують як зручну модель для вивчення загальнобіологічних внутрішньоклітинних процесів, таких як сигналювання, зміна експресії генів, репрограмування клітин та ін. [14-16].

Метод культивування клітин інтенсивно застосовують у новітній галузі біотехнології – тканинній та органній інженерії. Так, наприклад, на основі культури фібробластів та кератиноцитів створено штучну шкіру [13, 17].

Різноманітні культури клітин використовують у біотехнології для синтезу цінних біопрепаратів (гормонів, факторів росту, антитіл тощо) [10]. Безсумнівно, одним із найцінніших досягнень клітинної інженерії є створення гібридом – “безсмертних” гібридних клітинних ліній, що продукують моноклональні антитіла. Гібридоми одержують шляхом злиття В-лімфоцитів, імунізованих конкретним антигеном, і пухлинно-трансформованих лімфоцитів – плазмочитів. Гібридомна технологія забезпечує науковців та клініцистів необмеженою кількістю моноклональних антитіл, як препаратів для діагностичного або лікувального призначення [18].

Стовбурові клітини і клітинна терапія Останнє десятиліття характеризується справжньою революцією у дослідженні та використанні стовбурових клітин. Згідно з сучасним визначенням, стовбурова клітина

(СК) – це недиференційована клітина, здатна ділитися впродовж довгого часу, часто протягом всього життя організму. За умов дії сигналів диференціації такі клітини можуть перетворюватися у зрілі спеціалізовані клітини (кардіоміоцити, нейроноти, хондроцити тощо) [19]. СК класифікують за походженням. Так, ембріональними СК називають клітини внутрішньоклітинно маси бластоцисти – одні з найбільш ранніх стадій розвитку ембріона. Такі СК є плюрипотентними, тобто здатними перетворюватися у всі 200 типів спеціалізованих клітин організму. З точки зору регенеративної медицини ембріональні СК є ідеальними для відновлення пошкоджених органів, оскільки вони інтегрують в уражені ділянки та проявляють тканиноспецифічні функції [20]. Проте, у зв'язку з етичними проблемами у більшості країн світу заборонене отримання та клінічне застосування ембріональних СК людини. На даний час вчені досліджують керуваність процесу диференціації та селективне виділення чистих популяцій певних типів спеціалізованих клітин, тестують пухлинну активність отриманих соматичних клітин та їх гістологічну сумісність з організмом реципієнта [19, 20].

Іншою альтернативною можливістю отримання донорського матеріалу для клітинної терапії є використання СК дорослого організму. Це недиференційовані клітини, що виявляються в спеціалізованих тканинах. На відміну від ембріональних СК, використання дорослих СК не нашоухується на етичні табу. Однак ці клітини є полі- (чи оліго-) потентними, вони здатні диференціюватися тільки в обмежену кількість типів спеціалізованих клітин [21]. Використання власних клітин пацієнта (найчастіше – гемопоетичних клітин кісткового мозку) виключає можливість імунологічного конфлікту. Концепція терапії аутологічними СК включає: 1) виділення дорослих стовбурових клітин; 2) культивування *in vitro* з метою нарощування клітинної маси; 3) диференціювання їх у клітини ураженої тканини; 4) використання для трансплантації. Прикладом конкретного клінічного застосування є відновлення пошкодженого серцевого м'яза після ін'єкції клітин у хвору ділянку серця [22]. Таку кардіопластику, що пройшла детальні випробування на тваринах, почали з успіхом застосовувати у клінічній практиці.

Оскільки одержання ембріональних СК небажане з етичних міркувань, а використання дорослих СК утруднене через низку технічних причин, вчені продовжують шукати оптимальне джерело клітин для трансплантаційної медицини. Недавнє відкриття можливості репрограмування (зворотного перетворення) дорослих диференційованих клітин в клітини, подібні до ембріональних стовбурових, відкрило цілком нові перспективи для клітинної терапії.

Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК) вперше були отримані групою японських вчених з університету Кіото в 2006 році. Takahashi і Yamanaka визначили 4 ключових гени плюрипотентності, які активно експресуються в ембріональній СК: Oct3/4, Sox2, Klf4 та c-Myc, і ввели їх у культивовані фібробласти миші за допомогою ретровірусного вектора [16]. Уже наступного року даний експеримент було успішно повторено на фібробластах дорослої людини [23, 24]. Проте системи вірусно трансфекції, що використовують

вались у даних дослідженнях, вмонтовували гени у випадкові ділянки геному клітини-господаря, що підвищувало онкогенний потенціал отриманих іПСК. Минулорічні дослідження 3-х різних наукових груп довели можливість отримання іПСК безвекторним шляхом [25-27], це дало змогу залишати геном клітин незмінним. Дані відкриття, з одного боку, дуже наблизили застосування іПСК в клініці, однак з іншого боку, процедури генерування таких клітин залишаються ще малопродуктивними. Тому активні пошуки шляхів підвищення ефективності репрограмування тривають. Так, на сьогодні вже відомо, що помірна гіпоксія – короткотривале зниження концентрації кисню в культуральному середовищі до 5 % [28] та додавання аскорбінової кислоти [29, 30], здатні суттєво підвищити відсоток успішно репрограмованих мишачих та людських фібробластів.

ВИСНОВОК Отримання іПСК із диференційованих клітин людини є одним із найважливіших проривів у галузі дослідження стовбурових клітин. Цей підхід дає можливість використовувати власні тканини пацієнта і, таким чином, вирішує проблему відторгнення пересаджених тканин, позбавляючи від необхідності приймати імунодепресанти. І вже в найближчий час можна буде замінити пошкоджену чи уражену тканину людини на таку ж тканину цього пацієнта, тільки здорового. Це вирішить проблему терапії багатьох хвороб.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Стойка Р.С. Методи клітинно біологі: Методичні вказівки до навчального спецкурсу. – Львів: В-во ЛДУ, 1996. – 79 с.
2. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: культивирование клеток человека и животных: Учебно-методическое пособие. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005. – 48 с.
3. Fundamental Techniques in Cell Culture. A Laboratory Handbook. – Sigma-Aldrich Co., 2001. – P. 69.
4. McAteer J.A., Davis J.M. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. – in Basic Cell Culture. – Oxford University Press, 2002. – Ch.5. – P.135-189.
5. Grane M.S. Mutagenesis and cell transformation in cell culture // Methods in cell science. – 1999. – 21. – P. 245-253.
6. Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin II, Thomson J.A. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science. – 2009. – 324. – P. 797-801.
7. Saleem M.A., O'Hare M.J., Reiser J., Coward R.J., Inward C.D., Farren T., Xing C.Y., Ni L., Mathieson P.W., Mundel P.A. Conditionally Immortalized Human Podocyte Cell Line Demonstrating Nephron and Podocin Expression // J Am Soc Nephrol. – 2002. – 13. – P. 630-638.
8. Krtil J., Plöbtenk J., Kazderovb M., Tesa V., Zima T. Culture Methods of Glomerular Podocytes // Kidney Blood Press Res. – 2007. – 30. – P. 162-174.
9. Satchell S.C., Tasman C.H., Singh A., Ni L., Geelen J., von Ruhland C.J., O'Hare M.J., Saleem M.A., van den Heuvel L.P., Mathieson P.W. Conditionally immortalized human glomerular endothelial cells expressing fenestrations in response to VEGF // Kidney International. – 2006. – 69. – P. 1633-1640.
10. <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>.
11. Camelliti P., Andrew D. McCulloch, Kohl P. Microstructured Cocultures of Cardiac Myocytes and Fibroblasts: A Two-Dimensional In Vitro Model of Cardiac Tissue // Microscopy and Microanalysis. – 2005. – 11(3). – P. 249-259.
12. Camelliti P., Green C., Kohl P. Structural and Functional Coupling of Cardiac Myocytes and Fibroblasts. // Cardiovascular Gap Junctions. Adv Cardiol. Basel, Karger. – 2006. – 42. – P. 132-149.
13. Lee W., Debasitis J.C., Lee V.K., Lee J.-H., Fischer K., Edminster K., Park J.-K., Yoo S.-S. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication // Biomaterials. – 2009. – 30 (8). – P. 1587-1595.
14. Human fibroblasts in culture. – Dennis Kunkel Microscopy, Inc., 2008 (<http://www.denniskunkel.com/DK/Medical/98507D.html>).
15. <http://www.transcells.ru/fibroblasti/>.
16. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. – 2006. – 126. – P. 663-676.
17. Bannasch H., Fühn M., Unterberg T., Bach A., Weyand B., Stark G. Skin tissue engineering // Clinics in Plastic Surgery. – 2003. – 30 (4). – P. 573-579.
18. Абелев Г.И. Моноклональные антитела // Соросовский Образовательный Журнал. – 1998. – 5. – С. 4-10.
19. Кордюм В.А., Дерябина Е.Г. Стволовые клетки и их терапевтический потенциал // Мистецтво лікування. – 2004. – 2 (8). – С. 5-7.
20. Wobus A.M. Potential of embryonic stem cells // Molecular Aspects of Medicine. – 2001. – Vol. 22. – P. 149-164.
21. Hochedlinger K., Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency // Development. – 2009. – 136(4). – P. 509-23.
22. Orlic D., Kajstura J., Chimenti et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // Nature. – 2001. – Vol. 410. – P. 701-705.
23. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors // Cell. – 2007. – 131 (5). – P. 861-872.
24. Junying Y., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., J. Antosiewicz-Bourget, Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells // Science. – 2007. – 318 (5858). – P. 1917-1920.
25. Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P., Desai R., Mileikovsky M., Hdmddinen R., Cowling R., Wang W., Liu P., Gertsenstein M., Kaji K., Sung H.K., Nagy A. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells // Nature. – 2009. – 458. – P. 766-770.
26. Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors // Nature. – 2009. – 458. – P. 771-775.
27. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences // Science. – 2009. – 324. – P. 797-801.
28. Yoshida Y., Takahashi K., Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells // Cell Stem Cell. – 2009. – 5(3). – P. 237-241.
29. Esteban M.A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S., Chen K., Li Y., Liu X., Xu J., Zhang S., Li F., He W., Labuda K., Song Y., Peterbauer A., Wolbank S., Redl H., Zhong M., Cai D., Zeng L., Pei D. Vitamin C Enhances the Generation of Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells // Cell Stem Cell. – 2009. – 6 (1). – P. 71-79.
30. Shi Y., Zhao Y., Deng H. Powering Reprogramming with Vitamin C // Cell Stem Cell. – 2010. – 6 (1). – P. 1-2.

Отримано 03.12.09.