

Министерство образования и науки Российской Федерации

САНКТ–ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Приоритетный национальный проект «Образование»
Национальный исследовательский университет

***Г.П. ПИНАЕВ М.И.БЛИНОВА Н.С. НИКОЛАЕНКО
Г.Г. ПОЛЯНСКАЯ Т.Н. ЕФРЕМОВА,
Н.С. ШАРЛАИМОВА Н.А. ШУБИН***

КЛЕТОЧНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебное пособие

*Рекомендовано Учебно-методическим объединением по
университетскому политехническому образованию в качестве
учебного пособия для магистров, обучающихся по основной
образовательной программе «Прикладные основы генной и
клеточной инженерии» направления подготовки магистров
«Техническая физика»*

Санкт-Петербург
Издательство Политехнического университета
2011

УДК
ББК

Рецензенты:

Ведущий научный сотрудник Института цитологии РАН, д. б. н., профессор
В.М. Михайлов, доктор физико-математических наук, профессор СПбГПУ
А.Л. Тимковский

Пинаев Г.П. **Клеточная биотехнология:** учебно-методическое пособие
/Пинаев Г.П., Блинова М.И., Николаенко Н.С., Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н.,
Шарлаимова Н.С., Шубин Н.А. / СПб: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – 224 с.

Представлены современные знания об основных направлениях развития клеточной биотехнологии, культуре клеток как основы клеточных технологий, направленных на развитие методов и подходов заместительной клеточной терапии. Описаны методы культивирования клеточных культур. Учебное пособие содержит современное представление о биологии эмбриональных и соматических стволовых клеток и современных перспективах использования стволовых клеток в медицине и эксперименте. Представлено полное описание лабораторного оборудования, необходимого для культивирования клеточных линий.

Учебное пособие предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению подготовки магистров «Техническая физика».

Также может быть использовано при обучении в системах повышения квалификации, в учреждениях дополнительного профессионального образования.

Работа выполнена в рамках реализации программы развития национального исследовательского университета «Модернизация и развитие политехнического университета как университета нового типа, интегрирующего мультидисциплинарные научные исследования и надотраслевые технологии мирового уровня с целью повышения конкурентоспособности национальной экономики».

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

- © *Г.П. Пинаев М.И. Блинова, Н.С. Николаенко,
Г.Г. Полянская, Т.Н. Ефремова,
Н.С. Шарлаимова, Н.А. Шубин*, 2011
© Санкт-Петербургский государственный
политехнический университет, 2011

ISBN _____

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список принятых сокращений.....	8
Введение.....	10
1. Цели и задачи клеточной биотехнологии.	
Основные направления.....	12
1.1. Производство вакцин.....	14
1.2. Производство биологически активных молекул.....	16
1.3. Гибридная технология.....	19
1.4. Культивируемые клетки в качестве тест систем.....	23
1.4.1. Определение жизнеспособности клеток после внесения в питательную среду исследуемых веществ или материалов.....	24
1.4.2. Влияние тестируемых веществ на пролиферативную активность клеток в культуре.....	24
1.4.3. Определение эффективности клонирования культивируемых клеток.....	25
1.5. Тканевая инженерия.....	27
1.6. Клеточная биотехнология на основе клеток растений.....	29
1.6.1. Получение лекарственных препаратов.....	30
1.6.2. Оздоровление посевного материала.....	30
1.6.3. Клональное размножение растений.....	31
1.6.4. Получение генно-инженерных вариантов растений.....	32
2. Культивируемые клетки как основа клеточных технологий.....	33
2.1. Технология получения и поддержания клеточных культур.....	43
2.2. Стандартные питательные среды постоянного химического состава.....	45
2.3. Сыворотка крови и ее роль в культивирования клеток	49
2.4. Бессывороточные питательные среды.....	51
2.5. Культивирование клеток в объемных матрицах,	

крупномасштабное культивирование.....	53
3. Типы клеточных культур. Характеристики и изменчивость клеточных линий.....	56
4. Контаминация клеточных линий микроорганизмами.....	83
5. Развитие криобиологии, обеспечившее сохранность клеточных линий.....	96
6. Коллекции клеточных культур.....	109
6.1. Коллекция культур клеток позвоночных – Центральный банк Российской коллекции клеточных культур. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.....	111
6.2. Специализированная коллекция генетически трансформированных корней высших растений.....	112
6.3. Специализированная коллекция клеток высших растений.....	112
6.4. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных.....	112
6.5. Специализированная коллекция диплоидных клеток человека и животных для исследований в области вирусологии.....	113
6.6. Специализированная коллекция соматических клеток человека от больных наследственными заболеваниями. Институт биологии развития РВН, Москва.....	113
6.7. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных медицинского назначения.....	113
6.8. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных.....	113
6.9. Специализированная коллекция постоянных линий клеток беспозвоночных.....	114
6.10. Пример паспорта клеточных линий человека.....	118
7. Эмбриональные стволовые клетки человека.....	128
8. Стволовые клетки взрослого организма.....	148
8.1. Принципы методов выделения мезенхимальных	153

стволовых клеток костного мозга, жировой ткани, кожи.....	
8.1.1. Подготовка млекопитающего и забор костного мозга, жировой ткани или кожи (согласно действующим международным протоколам).....	153
8.1.2. Дезагрегация костного мозга, жировой ткани, дермы кожи.....	154
8.1.3. Отделение ядродержащих клеток костного мозга от эритроцитов.....	155
8.1.4. Очистка адгезивных мезенхимальных клеток костного мозга, жировой ткани, от примесных клеток других типов.....	155
8.2. Условия культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.....	156
8.2.1. Формирование колоний мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.....	157
8.2.2. Иммунофенотип мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.....	158
8.2.3. Мультипотентность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.....	158
Заключение.....	165
9. Клеточные технологии в терапии кожного покрова.....	166
9.1. Строение кожи человека.....	166
9.1.1. Эпидермис.....	166
9.1.2. Базальная мембрана.....	168
9.1.3. Дерма.....	168
9.2. Восстановление поврежденного кожного покрова с помощью культивируемых кератиноцитов и фибробластов...	170
9.2.1. Выделение и культивирование кератиноцитов.....	170
9.2.2. Формирование многослойного пласта кератиноцитов.....	173
9.2.3. Клиническое применение многослойных пластов кератиноцитов.....	174

9.3. Выделение и культивирование дермальных фибробластов.....	175
9.3.1. Приготовление вариантов дермального эквивалента.....	176
9.3.2. Влияние дермального эквивалента на заживление ран.....	179
9.4. Эквивалент полной кожи.....	180
9.5. Возможное применение других культивируемых клеток кожи.....	183
9.5.1. Меланоциты.....	183
9.5.2. Возможные риски клинического использования культивируемых клеток.....	183
9.6. Нормативно-техническая база для производства клеточных продуктов.....	183
10. Устранение дефектов костной и хрящевой тканей с помощью клеточных технологий.....	185
10.1. Особенности организации костной и хрящевой тканей.....	185
10.2. Особенности организации внеклеточного матрикса костной и хрящевой тканей.....	187
10.3. Особенности развития и регенерации костной и хрящевой тканей.....	190
10.4. Клеточный состав костной и хрящевой тканей.....	194
10.5. Выделение, культивирование и исследование дифференцировки и пролиферации костных и хрящевых клеток.....	198
10.6. Перспективы использования аутологичных и аллогенных культивируемых клеток кости и хряща в регенеративной медицине.....	202
11. Инфраструктура и оборудование, необходимые для разработки клеточных технологий и создания клеточных продуктов.....	206

11.1. Приготовление питательных сред.....	207
11.2. Мытье и стерилизация культуральной посуды.....	209
11.3. Криоконсервация и хранение культивируемых клеток.....	212
11.4. Планировка и оборудование культуральных помещений.....	214
Библиографический список.....	219

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота.
ALT - альтернативный механизм удлинения теломер,
АФК - активные формы кислорода
BMP4 - костный морфогенетический белок
BSA – бычий сывороточный альбумин.
ВКМ - внутренняя клеточная масса бластоцисты
ГСК - гемопоэтические стволовые клетки
Г6ФДГ – глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа.
GFP - зеленый флуоресцирующий белок,
GMP - международные требования к чистым помещениям
ДКТ - деминерализованная костная ткань.
DMEM – Дальбеко модифицированная минимальная среда Игла
ДМСО – диметилсульфоксид.
EMEM. - минимальная среда Игла с солями Ерла
IGF-1 - инсулиноподобный ростовой фактор
ITS – комплекс факторов: инсулина, трансферина, селена
ITESA – комплекс факторов (insulin, transferrin, ethanolamine, selenite).
КОКф. – клетки, образующие колонии фибробластов.
LA – комплекс линолевой кислоты и альбумина
ЛДГ - лактатдегидрогеназа.
MEM - минимальная среда Игла.
МСК - мезенхимальные стволовые клетки.
MPCs - мезодермальные клетки-предшественники
ММСК - мультипотентные стволовые клетки.
МНС - главный комплекс гистосовместимости.
ПЦР - полимеразная цепная реакция
PPLO – (pleuropneumonia-like organisms)
RPMI - питательная среда
СВК - структурные варианты кариотипа

СК - стволовые клетки

СККМ - стромальные стволовые клетки костного мозга

СЭК - сыворотка эмбрионов коров.

TGF β - трансформирующий фактор роста

TNF- λ . - фактор некроза опухолей –

ФРЭ - фактор роста эпидермиса,

FGF- β - фактор роста фибробластов

HLA - главный комплекс гистосовместимости

НМЕМ – минимальная среда Игла с солями Хенуса

ЭТ - эмбрионидные тельца

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

Учебное пособие представляет собой курс лекций по дисциплине «Клеточная биотехнология», написанное коллективом авторов, предназначенное для студентов, обучающихся по направлению согласно ФГОС ВПО 223200 Техническая физика, магистерская программа «Прикладные основы геномной и клеточной инженерии». Основной задачей курса является формирование специалиста с широким мировоззрением, способного высказывать независимые суждения и принимать самостоятельные решения, умеющего свободно ориентироваться в теоретической и методической базе молекулярной и клеточной биологии, умеющего ясно излагать теоретические знания в области клеточной и молекулярной биологии и способного к широкой профессиональной деятельности.

Настоящее учебное пособие посвящено детальному описанию клеточных технологий, разрабатываемых в настоящее время для производства веществ, синтезируемых клетками человека, животных и растений, а также используемых при лечении тяжелых заболеваний человека, когда традиционные фармацевтические и хирургические методы оказываются не эффективными.

Ввиду того, что практически все существующие на сегодняшний день технологии такого рода создаются на основе культивируемых клеток, ряд глав пособия посвящен описанию последовательных этапов выделения клеток из тканей организма, обеспечению их роста и размножения в культуре с помощью специально разработанных питательных сред, определению их чистоты и выявлению контаминаций микроорганизмами и, наконец, способам их сохранения в течение длительного времени путем низко температурного замораживания. Надежное использование

культивируемых клеток, как в фундаментальных исследованиях, так и для практического применения возможно только при наличии эталонного клеточного материала хорошо охарактеризованного и обладающего воспроизводимыми свойствами. Такое качество клеточных линий обеспечивают коллекции клеточных культур, описание деятельности которых приводится в специальном разделе.

После рассмотрения основных направлений клеточной биотехнологии главное внимание уделено примерам разрабатываемых и применяемых клеточных технологий, предназначенных для восстановления поврежденных органов и тканей человека. Одним из наиболее перспективных источников клеточного материала являются эмбриональные стволовые клетки и стволовые клетки взрослого человека, методы получения, культивирования и направленной дифференцировки, которых для последующего использования в клеточных технологиях рассматриваются в соответствующих главах.

Таким образом, весь изложенный материал подан в пособии таким образом, чтобы у читателя создавалось четкое представление о том, как возникли, создавались и применяются клеточные технологии для регенеративной медицины, а также какая инфраструктура необходима для осуществления этого сложного наукоемкого процесса.

1. Цели и задачи клеточной биотехнологии. Основные направления.

Клеточная биотехнология относится к одному из бурно развивающихся направлений современной клеточной биологии. Главными целями клеточной биотехнологии являются: разработка технологий производства веществ синтезируемых клетками человека, животных и растений, используемых в медицине, сельском хозяйстве и промышленности, обеспечение биобезопасности населения, а также создание клеточных продуктов предназначенных для лечения тяжелых заболеваний человека

Развитие исследований в выше перечисленных направлениях, а также во многих других постепенно привело исследователей к заключению о том, что существует принципиальная возможность крупномасштабного культивирования клеток разных животных и растений. Эти успехи привели общество к естественному желанию использовать культивируемый клеточный материал для промышленного производства полезных для человека продуктов. Обнаруженная способность клеток разных типов при определенных условиях сливаться и образовывать гибридные клетки, привела, в конечном счете, к созданию первых гибридом, продемонстрировавших фантастические перспективы коммерческого производства и применения моноклональных антител. Эти успехи также способствовали возникновению и развитию новой отрасли народного хозяйства – клеточной биотехнологии.

В первую очередь клеточные культуры были использованы для получения вакцин. Собственно говоря, именно вирусологи принимали самое непосредственное участие в получении стабильных клеточных линий и в создании методов крупномасштабного культивирования. Кроме того, в ряде научно-производственных центров приступили к

разработке технологий получения ряда полезных природных соединений на основе нормальных и мутантных клеток-продуцентов. Перспективность такого подхода обосновывалась следующими соображениями. Индивидуальная клетка-продуцент подобна микрофабрике, в которой сложный технологический процесс производства определенного вещества осуществляется внутриклеточными структурно-функциональными системами, синтезирующими, накапливающими и секретирующими в окружающую среду необходимое для организма вещество. Биотехнология переводит естественную клеточную технологию в контролируемые условия, масштабирует процесс и доводит ее до уровня промышленного производства. В результате такого подхода оказалось возможным получать большое количество продукта, являющегося сырьем для дальнейшего выделения биологически активных соединений. Развитие клеточной биотехнологии не ограничивалось только производством биологически активных соединений. Применение клеток для решения практических задач развивалось в самых разных направлениях.

В конце 20-го столетия были получены первые линии эмбриональных стволовых клеток и культивируемые стволовые клетки взрослого организма, продемонстрировавшие способность к самовоспроизводству и превращению в зрелые клетки разных органов и тканей под влиянием индуцирующих биологически активных факторов. Эти открытия способствовали интенсивному развитию нового направления клеточной биотехнологии – созданию клеточных технологий восстановления поврежденных органов и тканей человека.

В результате сложного и трудоемкого процесса, занявшего длительное время и объединившего результаты фундаментальных и прикладных исследований к настоящему времени сложились следующие основные направления клеточной биотехнологии с использованием культивируемых клеток человека, животных и растений. (Таблица 1)

1.1. Производство вакцин.

Чрезвычайно важную роль для практического использования клеточных культур в здравоохранении явилась работа по выявлению клеточных линий чувствительных к вирусам.

Таблица 1.

Основные направления клеточной биотехнологии

<u>Клетки животных</u>	Клетки растений
1. Производство вакцин.	1. Лекарственные препараты и биологические стимуляторы
2. Производство биологически активных молекул	
Гормоны, Ферменты, ростовые факторы, Интерферон, моноклональные антитела	2. Оздоровление посевного материала
3. Тест системы	
а. Новые лекарственные препараты	
б. Определение токсичности окружающей среды.	3. Клональное размножение растений
в. Определение токсичности крови при различных заболеваниях	
4. Тканевая инженерия	4. Генно-инженерные варианты растений
а. Направленная дифференцировка стволовых клеток.	
б. Заместительная клеточная терапия	
в. Генотерапия	

Следует подчеркнуть, что все фундаментальные научные исследования вирусологии проводятся на клеточных культурах. В том

числе: изучение химиопрепаратов для лечения ВИЧ-инфекции, гриппа, герпеса, цитомегалии и др. инфекций.

Получен ряд штаммов клеток из почки эмбриона свиньи и трофовариантов стабильных линий клеток, обеспечивающих накопление вируса клещевого энцефалита с высокой инфекционной активностью. Установлено, что можно получать длительную персистенцию вирусов гепатита а, простого герпеса и цитомегалии не только в клетках человека и приматов, но также в клеточных линиях почки сирийского хомячка, в фибробластах хомячка и мыши. Наиболее чувствительной ко всем вирусам оказалась сублини клеток Vero. Эта сублиния стабильно сохраняет полезные свойства в течение 178-200 пассажей. Она отвечает требованиям, предъявляемым ВОЗ к клеточным линиям, используемым для диагностики вирусных заболеваний человека.

Показано, что наиболее эффективной системой для выделения, накопления и типирования вирусов полиомиелита, аденовирусов и вирусов парагриппа является сочетанное использование нескольких клеточных линий (например, Hela, Нер 2, ФЛЕЧ).

Клеточные линии, сертифицированные согласно требованиям ВОЗ, использовались для приготовления противовирусных вакцин (герпетической, цитомегаловирусной, краснушной, коревой, гепатитной и др.). С этой целью была разработана и применена эффективная технология культивирования клеток на отечественных микро- и макро-носителях и в биореакторах, что способствовало увеличению клеточной биомассы в несколько раз.

В настоящее время сфера применения вакцин расширяется. В число практического использования входят: предупреждение новых и возвращающихся инфекций; защита от высокопатогенных агентов, которые могут быть использованы в целях биотерроризма; иммунопрофилактика и иммунотерапия онкозаболеваний; иммунная защита и лечение наркозависимости; вакцины, предупреждающие и

нормализующие «болезни века» (болезни иммунной системы, инсулинозависимый диабет, миокардит, атеросклероз, инфаркт). Создание и производство вакцин – предмет национальной безопасности страны.

При создании вакцин необходимо решение вопроса об их безопасности при введении в организм человека. Вакцина не должна содержать посторонних токсических компонентов или потенциально инфекционных агентов. Необходимо учитывать возможные последствия вакцинации для иммунной системы, а также длительность и перспективность индуцированного иммунитета.

1.2. Производство биологически активных молекул

В процессе перехода к крупномасштабному культивированию клеток животных и человека для коммерческого производства биологически активных молекул обнаружилось их существенные недостатки и в ряде случаев непреодолимые проблемы, препятствовавшие успешному развитию этого направления. К числу наиболее серьезных трудностей работы с клетками-продуцентами следует отнести следующие:

1. Потеря клетками исходных свойств, в процессе длительного культивирования, что обычно происходит при нечетком соблюдении всех необходимых условий их существования.
2. Разрушение культивируемых клеток при перемешивании больших объемов культуры
3. Неопределенность состава питательных сред, которая зависит, прежде всего, от свойств сывороток, получаемых из разных источников в силу различных условий содержания и кормления крупного рогатого скота.
4. Низкая скорость размножения животных клеток в культуре, от которой зависит процесс масштабирования.
5. Непрерывное изменение состава питательной среды в силу протекающих в культуре метаболических процессов.
6. В результате перечисленных трудностей, которые необходимо преодолевать, существенно возрастает стоимость производимого продукта.

В связи с параллельным развитием микробиологии и выявленной возможностью использовать бактерии в качестве продуцентов молекул животного происхождения при введении в них аналогичных рекомбинантных генов, исследователи стали склоняться к решению о замене культивируемых клеток бактериями ввиду ряда их практических преимуществ. Бактериальные культуры обладают более высокой скоростью роста. Удвоение популяции происходит за 2-3 часа, в то время как у животных клеток удвоение популяции происходит только за 15-35 часов. Максимальная плотность культуры, при которой можно осуществлять производственный процесс, у клеток равна 3×10^6 в мл, в то время как у бактерий она достигает 10^{12} в мл. Кроме того бактерии в культуре обладают высокой устойчивостью к механическим воздействиям, высокой стабильностью экспрессии генов и, что очень важно для производства, питательные среды необходимые для культивирования бактерий более стабильны и значительно дешевле, чем питательные среды животных клеток.

Несмотря на все перечисленные преимущества бактериальных культур, оказалось, однако, что они имеют существенный недостаток, который не позволяет широко их использовать в качестве продуцентов большого числа биологически активных белковых молекул. Многие из синтезируемых в животных клетках белков подвергаются пост трансляционным модификациям полипептидных цепей, после которых они становятся биологически активными и способны выполнять свои функции. К таким модификациям относятся их гликозилирование, карбоксилирование, метилирование, фосфорилирование, образование дисульфидных мостиков и даже частичное расщепление полипептидных цепей. В частности, многие из важных и полезных белков являются гликопротеинами, входящими в состав микроокружения клеток во всех органах и тканях. Бактерии не обладают соответствующими механизмами, осуществляющими перечисленные модификации, и в результате продуцируемые ими белки представляют собой агрегаты неправильно сложенных и организованных полипептидных цепей, напоминающих агрегаты денатурированных белков. В некоторых случаях такие белки можно преобразовать и привести их к нормальному нативному состоянию,

но это требует больших усилий и затрат с неопределенным конечным результатом. В связи с этим во многих случаях пришлось отказаться от использования бактерий в качестве продуцентов белков и вернуться к клеткам животных, несмотря на все перечисленные ранее недостатки.

. Для того чтобы представить, с какой скоростью этот сложный процесс, развивался, мы приводим ниже последовательность появления на рынке, разработанных технологий в начале развития работ в данном направлении.

Начальные этапы практического использования клеточных технологий

- | | | |
|---------|---|---|
| 1954 г. | — | Вакцина против полиомиелита |
| 1960 г. | - | Вакцины на диплоидных клетках |
| 1970 г. | - | Вакцины на постоянных клеточных линиях |
| 1975 г. | - | Гибридомы |
| 1979 г. | - | Первые рекомбинантные клеточные линии |
| 1980 г. | - | Препараты Интерферона |
| 1981 г. | - | Первый диагностический набор
на моноклональных антителах |
| 1982 г. | - | Первый рекомбинантный продукт
Инсулин |
| 1986 г. | - | Разрешено производство интерферона |

1.3. Гибридная технология

Помимо широкого использования культивируемых клеток для производства вакцин наибольшее развитие и распространение приобрела технология производства моноклональных антител на основе получения гибридных клеток – так называемая гибридная технология. Получение антител, распознающих и взаимодействующих с разными белками и другими молекулами, было уже известно и осуществлялось с помощью иммунизации ряда лабораторных животных, преимущественно кроликов, путем введения в кровеносное русло веществ, на которые должны быть получены антитела, и факторов, повышающих иммунный ответ организма. После наработки лимфоцитами достаточного содержания иммуноглобулинов из животного получали кровь, из которой биохимическими методами выделяли антитела. Такой способ получения антител не мог быть применен для масштабного производства и, кроме того, имел существенные ограничения в применении. Во-первых, возможность получения и выделения антител ограничена сроком жизни данного животного, после смерти которого, процедуру иммунизации приходилось проводить заново на других животных. Во-вторых, высокомолекулярные соединения и в частности белки могут иметь несколько аминокислотных последовательностей, на которые вырабатываются соответствующие иммуноглобулины. Поэтому в крови образуется набор антител на разные участки молекулы, каждое из которых продуцируют разные лимфоциты. В этих условиях выделенные из крови антитела могут одновременно взаимодействовать с рядом гомологичных молекул имеющих идентичные последовательности или как их называют- эпитопы, с каждым из которых взаимодействуют данные антитела. И, наконец, лимфоциты выделенные из животных невозможно поддерживать в культуре, так как они не способны к размножению.

Ситуация с производством антител существенно изменилась после создания гибридной технологии. Она основана на получении гибридных клеток путем слияния двух типов клеток – лимфоцитов и миеломы. Такая гибридная клетка обладает, с одной стороны способностью производить антитела как это делают лимфоциты, а с другой - способна к неограниченному делению как все трансформированные клетки. Процесс получения антител с помощью гибридной технологии осуществляется следующим образом.

Вначале производится иммунизация мышей белками или другими веществами, на которые хотят получить антитела, путем их введения в хвостовую вену. После того как на, введенные в кровь молекулы, зарегистрирован положительный иммунный ответ, из мышей выделяют лимфоциты и смешивают их в питательной среде с клетками миеломы. Для того чтобы получить гибридные клетки вначале к суспензии

клеток добавляли вирус Сендаи, который оказывал разжижающее действие на состояние клеточных мембран, способствуя их слиянию. В дальнейшем было найдено, что можно отказаться от использования вируса и вместо него вводить в суспензию клеток полиэтиленгликоль с молекулярной массой порядка 800-1000 Да, который также приводит к слиянию клеток. После образования гибридных клеток их рассеивают в лунки 96 луночной платы с таким расчетом, чтобы в одной лунке оказалась только одна гибридная клетка. На практике с первого раза достичь такого результата не удается, и поэтому данную процедуру повторяют несколько раз, для того чтобы в лунке действительно оказалась только одна клетка. Как было сказано выше, каждый лимфоцит продуцирует только один тип иммуноглобулинов, соответствующий только одному определенному эпитопу. Поэтому в разных лунках могут находиться гибридные клетки, синтезирующие антитела против разных эпитопов. Задачей же данной технологии является получение антител только против одного единственного эпитопа. После специально проведенных проверок гибридомы с положительной реакцией размножают, т.е. получают потомство или клон из этой одной единственной клетки, способный длительно размножаться и продуцировать один тип антител. Так как эти антитела получены из одного клона, их называют моноклональными в отличие от антител, которые получены из сообщества разных лимфоцитов, и поэтому их называют поликлональными. Необходимо отметить, что из всех полученных клонов, которых может быть несколько сотен, для практического использования остается не больше десятка. Основной причиной малого числа надежных клонов является их нестабильность. Многие из позитивных клонов теряют способность продуцировать антитела после длительного культивирования. Полученные клоны замораживают, и они хранятся при температуре жидкого азота (-196°C) до тех пор, пока они не понадобятся для дальнейшей наработки антител. В ряде случаев можно использовать в экспериментах питательную среду, в которую клетки секретируют антитела, но содержание их в среде низкое. Для того чтобы повысить концентрацию антител, полученную суспензию гибридом вводят мышам в брюшную полость, где они размножаются и образуют так называемую асцитную жидкость – вид опухолевого роста. Затем асцитную жидкость, в которой количество антител возрастает до 10 мг. в мл. собирают и выделяют из нее биохимическими методами чистые моноклональные антитела.

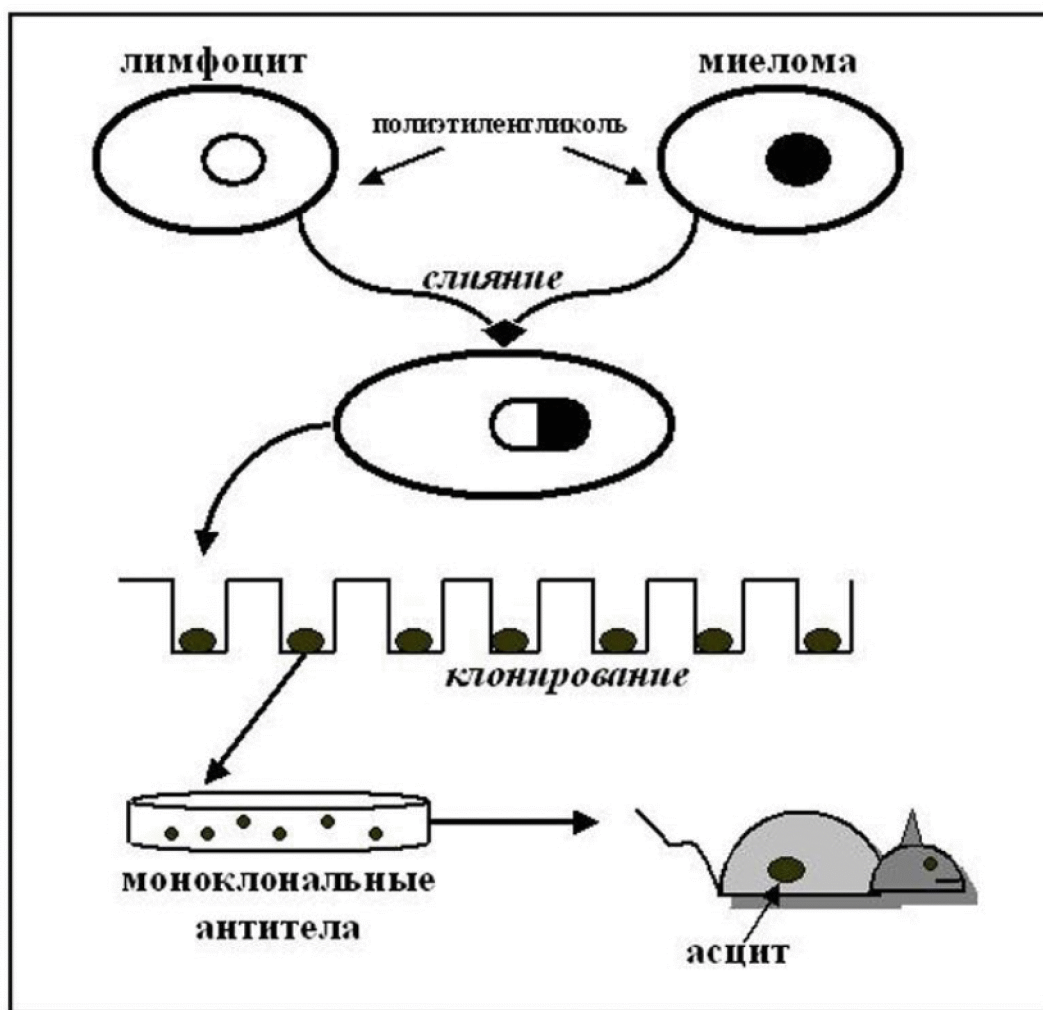


Рис. 1. Схема гибридной технологии получения моноклональных антител

Последовательность процедуры получения гибридом схематично изображена на рисунке 1.

Антитела, полученные с помощью гибридной технологии, широко используются во все мире. Производство антител необходимо для выявления в клетках и тканях соединения имеющих патогенное влияние или появление белков характерных для разных заболеваний. Кроме того, они используются для направленной доставки лекарственных веществ в клетки опухолей или других патологически измененных клеток.

1.4. Культивируемые клетки в качестве тест систем

В процессе исследования поведения клеток в культуре было обращено внимание на их исключительно высокую чувствительность

к изменениям окружающей среды, что будет более подробно рассмотрено в последующих главах. Здесь же мы кратко остановимся на основных направлениях практического использования этих свойств культивируемых клеток.

Во всех ведущих странах мира, разрабатываемые фармацевтическими компаниями лекарственные средства и косметические препараты, а также используемые в медицине материалы должны проверяться на биосовместимость, биобезопасность и эффективность ожидаемого эффекта. Без проведения подобных испытаний разработанная продукция не может быть выпущена на потребительский рынок. Оценка свойств перечисленных препаратов производится, главным образом, на лабораторных животных.

В последние годы, однако, проблема оценки производимых препаратов осложнилась в связи с принятым Европейским союзом запретом тестирования фармакологической продукции на животных. В 2003 году была одобрена 7-ая поправка к косметической Директиве (Cosmetics Directive 76/768/EEC), которая предусматривает переход к полному запрету тестирования на животных конечной косметической продукции, начиная с 2009 по 2013. Данный запрет был продиктован, с одной стороны, этическими соображениями, а с другой продемонстрированной эффективностью использования для этой цели культивируемых клеток, а также в связи с появлением на рынке проверенных эффективных методов оценки биобезопасности косметической и лекарственной продукции с помощью разрабатываемых трехмерных тканеподобных структур. Кроме того, испытывая косметические и лекарственные средства на животных, не всегда возможно выявить разнообразные негативные влияния, оказываемые на клетки организма.

Наиболее распространенными методами оценки негативного влияния тестируемых веществ на культивируемые клетки являются:

1.4.1. Определение жизнеспособности клеток после внесения в питательную среду исследуемых веществ или материалов.

Для этой цели производится кратковременная (не более 10 минут) окраска клеток 0,4 мг/мл раствором трипанового-синего после разных времен экспозиции клеток с введенным в среду испытуемым веществом. Погибшие клетки окрашиваются в синий цвет, а жизнеспособные остаются неокрашенными. Затем производится подсчет клеток в камере Горяева и насчитывается процент погибших клеток. Окрашивание в течение указанного короткого времени связано с тем, что при длительном воздействии красителя происходит постепенное его проникновение и окрашивание всех клеток, в результате чего становится невозможно выявить погибшие.

1.4.2. Влияние тестируемых веществ на пролиферативную активность клеток в культуре.

Для определения скорости размножения под влиянием внесенных веществ, производится посев одинакового количества клеток в 96- или 24-луночные платы и затем на разных сроках после внесения клетки собирают из соответствующих лунок и с помощью подсчета в камере Горяева устанавливают скорость увеличения их количества по сравнению с контролем. Существует также другой способ определения степени пролиферации культивируемых клеток. Суспензию клеток вносят в лунки 96-луночной платы и затем через определенные промежутки времени (например, через 12, 24, 48, 72 часа) в лунки вносят краситель генциан-виолет, который проникает в клетки и связывается с общим белком. Затем клетки промывают буфером для удаления, не связанного красителя, вносят лизирующий раствор, в который переходит связанный генциан-

виолет, и измеряют на специальной установке оптическую плотность раствора при длине волны 570 нанометров.

Определение числа клеток в лунке производится с помощью калибровочной кривой построенной на основе соотношения оптической плотности и числа клеток, определенного с помощью камеры Горяева.

1.4.3. Определение эффективности клонирования культивируемых клеток.

Все постоянные клеточные линии имеют определенную для каждой из них эффективность клонирования, которая входит в число характерных признаков данной линии и вносится в ее паспорт. В процессе многолетних исследований культивируемых клеток было установлено, что одиночные клетки в культуре в разной степени способны размножаться или иначе, образовывать клоны при отсутствии межклеточных контактов. Таким образом, определение эффективности клонирования показывает процент клеток способных формировать клоны. Для определения этого показателя клетки помещают в чашки Петри в условиях редкого посева, так чтобы они находились на большом расстоянии друг от друга. Затем через 24 или 48 часов, подсчитывают какое число клеток, из ста посаженных образовало колонии. Полученная величина и называется эффективностью клонирования. Способность к образованию клонов очень чувствительна к неблагоприятным воздействиям микроокружения, и по степени изменения этого параметра можно судить о степени токсичности исследуемого вещества или жидкости.

Аналогичное тестирование окружающей среды в целях выявления экологической обстановки оказалось возможным проводить также с помощью культивируемых клеток. В настоящее время клеточные культуры начали применять в двух основных направлениях. Все перечисленные методы анализа были успешно

применены для оценки токсичности воды рек и озер, в особенности путем сравнения чистой воды и находящейся вблизи от производственных предприятий. Кроме того, было показано, что если помещать культивируемые клетки в газовую, взятую из производственных помещений, в воздухе которых возможно появление токсических веществ, то их жизнеспособность существенно снижается. Это направление в настоящее время практически не развивается в связи с большими трудностями стандартизации условий, необходимых для проведения такого тестирования.

Еще одним направлением тестирования, демонстрирующим высокую эффективность реакции культивируемых клеток, является определение токсичности крови у пациентов на разных стадиях лечения при тяжелых заболеваниях. В качестве примера можно привести наш собственный опыт тестирования крови на клеточных культурах. Однажды к нашей лаборатории обратилась клиника с просьбой проверить, имеются ли токсические вещества в крови у пациента с тяжелым заболеванием. Пациент находился в острой фазе заболевания. Было решено проверить действие крови на клетки путем определения эффективности клонирования. После внесения в питательную среду небольшого количества плазмы крови было обнаружено резкое снижение эффективности клонирования на 70% по сравнению с контролем, что свидетельствовало о наличии в ней значительного содержания токсических веществ. Через некоторое время, в течение которого пациент подвергался лечению, врачи попросили повторить тестирование. В этот раз эффективность клонирования опять снизилась, но только на 40% по сравнению с контролем, что совпадало с общим улучшением состояния больного. Через некоторое время нас попросили провести тестирование в третий раз, и в этом случае не было обнаружено каких либо отличий от контроля. Когда результаты тестирования были предоставлены

лечащим врачам, они сообщили, что пациент уже вылечен и поэтому наши результаты подтверждают врачебный диагноз.

1.5. Тканевая Инженерия

Данное направление клеточной биотехнологии связано с использованием культивируемых стволовых и других клеток человека, биологических полимеров, биосовместимых материалов и других сопутствующих веществ в регенеративной медицине, для восстановления поврежденных органов и тканей в результате травм и тяжелых заболеваний человека. На основе культивируемых клеток и перечисленных компонентов создаются клеточные продукты и тканеподобные структуры, которые имплантируются в зоны повреждения, вместо утраченных клеток. Эти технологии носят также название заместительной клеточной терапии. Методы создания и применения подобных клеточных продуктов подробно описаны в последующих главах настоящего пособия. Здесь же мы остановимся только на одном виде тканевой инженерии на генотерапии.

В ходе развития молекулярной биологии и в частности создания методов получения разнообразных генов и введения их в культивируемые клетки была доказана возможность успешной экспрессии введенных генов и синтез в клетках соответствующих белков. Такой подход был использован при крупномасштабном культивировании клеток с увеличением продукции биологически активных молекул. На основании полученных положительных результатов возлагались большие надежды на применение генотерапии, особенно в случаях лечения наследственных заболеваний, когда собственные гены организма не экспрессируются или дефектны в результате произошедших мутаций.

Оказалось, однако, что во многих случаях простого введения в клетки соответствующих генов может быть недостаточно, для того

чтобы достичь желаемого эффекта. Дело в том, что при экспрессии введенных генов необходимо чтобы синтезируемые с их помощью молекулы правильным образом встраивались в общую регуляторную систему клетки и давали необходимый физиологический эффект. В настоящее время еще нет достаточных знаний обо всех межмолекулярных взаимодействиях синтезируемых белков при активации тех или иных генов а, следовательно, неясно в случае негативного результата на каком этапе и с чем происходит неправильное взаимодействие. Наглядным примером неудачного применения генотерапии явились многочисленные попытки вылечить путем введения гена инсулина в клетки больным диабетом, заболеванием широко распространенным, как в нашей стране, так и за рубежом. Введение гена инсулина в бета клетки поджелудочной железы удалось успешно осуществить и клетки, имплантированные в организм пациента, интенсивно его продуцировали. При этом, однако, оказалось, что трансфецированные клетки не способны реагировать на уровень сахара в крови и продолжают синтезировать и секретировать инсулин на одном и том же уровне. В результате пришлось отказаться от лечения диабета методом генотерапии. В связи с подобными неудачами данный подход не получил ожидаемого широкого распространения, но можно надеяться, что при дальнейшем расширении наших знаний о механизмах взаимодействия регуляторных систем клетки, окажется возможным применять его при разнообразных заболеваниях

1.6. Клеточная биотехнология на основе клеток растений

Много тысяч лет тому назад человечеству уже было известны многие полезные свойства дикорастущих растений, из которых начали выделять лекарственные вещества, красители и другие полезные метаболиты. Со временем природные запасы таких

растений истощались. Кроме того, разведение ряда полезных растений требовало наличие условий соответствующих определенным климатическим зонам, например, тропической или субтропической. С развитием методов культивирования растительных клеток стало ясно, что их массовое размножение может стать основой для производства разнообразных полезных веществ в более простых и контролируемых условиях.

Культивирование растительных клеток во многом отличается от культивирования клеток животных и человека. Прежде всего, из растений выделяется часть органа или ткани, которые помещаются на твердую с добавлением агара питательную среду относительно простого состава. Она должна содержать минеральные компоненты, соли, сахар, некоторые витамины и регуляторы роста, которыми являются ауксины и цитокинины.

Через определенное время клетки выделенной растительной ткани дедифференцируются, они теряют свою исходную специализацию, характерную для данной ткани. Затем они начинают размножаться, образуя сообщество, делящихся клеток которое получило название каллуса, из-за сходства с раненой тканью растения. После определенного времени часть каллуса пересаживают в свежую питательную среду, и таким образом в течение неограниченно долгого времени поддерживают рост культуры клеток растений. Их каллусной культуры можно получить суспензионную культуру, которую растят в специальных ферментерах. Эта культура представляет собой суспензию агрегатов клеток, так как получить размножающуюся культуру одиночных клеток не удается.

1.6.1. Получение лекарственных препаратов

К числу первых культур растительных клеток из которых стали получать ценные лекарственные вещества, следует, прежде всего, отнести культуры клеток женьшеня содержащие тритерпеновые

гликозиды, которые оказывают стимулирующее действие при общей усталости, снимают результаты различных стрессов, повышают иммунитет, снимают гипотоническое состояние, а также оказывают позитивное действие при невралгиях и импотенции.

Другими очень важными для медицины являются культивируемые клетки диоскореи дельтовидной, которые содержат стероидные гликозиды (сапонины) с диосгенином. Это растение родом из Индии и в настоящее время практически исчезло в дикорастущем виде. **Продуцируемые этими клетками вещества обладают в частности сильными иммуностимулирующими свойствами. Кроме этих культур широко используются клетки мандрагоры, люцерны, мака и других растений продуцирующих полезные лекарственные вещества.**

1.6.2. Оздоровление посевного материала

Практика сельского хозяйства показала, что вирусные болезни являются причиной потери от 10 до 50% урожая сельскохозяйственных культур, размножающихся вегетативно. Установлено также, что соя и некоторые другие бобовые растения передают вирусы потомству даже при семенном размножении. В связи с этим проблема получения безвирусного посевного материала является чрезвычайно важной и актуальной задачей. Как показали исследования ее можно решить с помощью культур растительных клеток. Для избавления от вирусов, виридов и микоплазм выделяют клетки меристемы - ткани растений, с помощью которых происходит размножение, и получают клоны. Затем проводят тщательный анализ, размноженного материала, на присутствие инфекций. При обнаружении последних, производится оздоровление клеток с помощью термотерапии и хемотерапии. Оздоровленные применением меристемной культуры растение размножают далее обычным способом клонального микроразмножения или путем микропрививок

растениям. Для оздоровления посевного материала картофеля Р.Я.Бутенко был разработан метод производства семенных микроклубней с последующей пересадкой их в грунт. С помощью перечисленных технологий варьируемых в зависимости от вида растений достигается успешное оздоровление посевного материала.

1.6.3. Клональное размножение растений

Принципиальным отличием культивируемых клеток растений от клеток животных является их способность к образованию из одной клетки целого растения. Это уникальное свойство было выявлено в процессе изучения экспериментального морфогенеза *in vitro* и привело к созданию технологии клонального микроразмножения растений, которое в ряде стран стало коммерческим производством. Преимуществами клонального микроразмножения растений по сравнению с традиционными методами являются:

- значительно более высокие темпы размножения (приблизительно в 1 000 раз больше) растений.

- клональное микроразмножение часто оздоравливает выращенные растения от грибных и бактериальных патогенов и других инфекций

- возможность с помощью такой технологии размножать растения, которые совсем не размножаются обычными способами.

Кроме того, клональное размножение способствовало развитию методов создания и селекции уникальных генотипов.

1.6.4. Получение генно-инженерных вариантов растений

Из клеток растений в культуре можно получать изолированные протопласты, то есть клетки лишенные оболочки. Это достигается путем ферментативной обработки выделенной ткани растений. При этом протопласт отходит от клеточной стенки и собирается в виде шарика в середине клетки, что позволяет ему избежать повреждения при разрушении стенки. Несомненным преимуществом изолированных протопластов, является возможность введения в них

генетической информации из клеток других растений и даже из клеток животных. Проведенные детальные исследования показали, что протопласты могут быть реципиентами ядерного, митохондриального или хлоропластного геномов. В них также можно вводить отдельные гены или фрагменты чужеродной ДНК, а также изолированные клеточные органеллы. Был разработан метод слияния протопластов с образованием гибридных клеток, с помощью воздействия на них электрического поля. Это направление получило название генной инженерии с целью изменения исходного генома. Так как процесс состоит из переноса генов из одной биологической системы в другую, он получил название трансгеноза. Полученные в результате трансгеноза организмы, называют трансгенными растениями.

Конечной целью генной инженерии растений является получение сельскохозяйственных культур (риса, пшеницы, кукурузы, картофеля, овощей и других растений) с новыми полезными свойствами. Наиболее важными из них являются:

- улучшение качества запасных белков зерна
- повышение устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам
- повышение эффективности азотфиксации, способствующее повышению урожайности.

Несмотря на очевидную практическую ценность созданных трансгенных растений и начатое их широкое производство в США, Канаде и Китае остается еще много нерешенных вопросов касающихся возможных побочных следствий изменения их свойств. В частности на основании результатов ряда исследований высказываются большие опасения возможного негативного влияния трансгенных растений, употребляемых в пищу, на организмы животных и человека.

Для того чтобы представить себе как возникла и развивалась клеточная биотехнология необходимо более подробно рассмотреть

поведение и свойства культивируемых клеток, которые являются основой всех существующих или возникающих клеточных технологий. Только фундаментальные длительные исследования клеток, выделенных из организма, помогли понять механизмы регуляции клеточных функций и использовать эти знания в практических целях. В последующих главах будет представлено детальное описание процессов происходящих в разных тканях, в культурах клеток и в создаваемых клеточных продуктах.

2. Культивируемые клетки как основа клеточных технологий

Фактически все основные знания, которыми мы сегодня располагаем, о поведении клеток человека, животных и растений: о механизмах их деления, миграции, изменения формы, взаимодействия между собой и с микроокружением, экспрессии генов, превращения нормальных клеток в злокачественные - были получены при исследовании клеток, выделенных из организма и поддерживаемых в течение длительного времени в соответствующих питательных средах. Это был длинный и трудный путь поисков оптимальных условий, при которых клетки, выделенные из различных органов и тканей живых организмов, сохраняли бы свою жизнеспособность и способность размножаться.

Процесс последовательного вхождения культивируемых клеток в практику биологических и медицинских экспериментов и превращения их в основной объект фундаментальных и прикладных исследований начался в конце 19 столетия. В этот период времени основные усилия исследователей были направлены на поиски путей поддержания жизнеспособности тканей и клеток вне организма. Первые работы были начаты в 1887 году немецким ученым Арнольдом, который проводил наблюдения за поведением лейкоцитов, выделенных из лягушки и помещенных в лимфу. Клетки в этом окружении выживали только 4-5 дней, а затем погибали. Тем

не менее, эти опыты показали, что поддержание живых клеток вне организма в принципе возможно. И через несколько лет Харрисон в течение 1906-1907 годов наблюдает за поведением живых нервных клеток лягушки помещенных опять в ее же лимфу.

В этом случае клетки находились в составе фрагментов ткани, но результат был тот же: жизнеспособность клеток сохранялась в течение только нескольких дней. Из этих первых экспериментов следовало, что поддерживать клетки в жизнеспособном состоянии *in vitro* возможно, но необходимо найти для их длительного выживания оптимальные условия и подходящее микроокружение. Последующие исследования и были направлены на создание адекватной питательной среды для культивирования тканей и клеток вне организма. Так Каррель, известный всему миру как создатель специальных сосудов для клеточных культур (флаконов Карреля), в течение 1912-1917 годов впервые предпринял попытки культивировать разные ткани, но уже птиц и млекопитающих. Для этой цели он использовал в качестве питательной среды плазму крови, в которую добавлял экстракты из эмбриональных тканей для поддержания жизнеспособности клеток. Эти работы позволили достигнуть более длительного выживания клеток, но в то же время использование плазмы крови не позволяло получать воспроизводимые результаты из-за ее индивидуальных различий. Было ясно, что такие естественные жидкости как плазма крови или лимфа должны быть заменены искусственной смесью разнообразных молекул обеспечивающих нормальную жизнь клеток в условиях культивирования.

Решить, однако, эту сложную задачу оказалось совсем непросто, и, прежде всего, еще из-за достаточно примитивного уровня, на котором находилась биохимия тех лет. Еще не все аминокислоты были известны. О существовании большинства витаминов и гормонов еще не знали. Изучение строения функционирования белков только

еще начиналось, а к исследованию полинуклеотидов еще и не приступали. Поэтому на протяжении многих лет велись интенсивные исследования состава сыворотки крови и других жидкостей биологического происхождения. Основываясь на результатах этих исследований, Фишер в 1941 году впервые предлагает для культивирования клеток диализованную плазму крови с добавлением разнообразных стимулирующих рост молекул. Следует подчеркнуть, что основные усилия исследователей при переводе клеток из организма в культуру были сосредоточены в первую очередь не только на сохранении их жизнеспособности, но и на стимулировании увеличения их числа, что создавало условия для длительной работы с культурой. Поэтому главное внимание в это время уделялось поиску именно тех факторов, которые способствовали бы и поддерживали пролиферацию клеток. В конце концов, этот чрезвычайно трудный этап развития клеточных культур завершился в 1955 году созданием Иглом первой синтетической питательной среды. И только после последующего появления в эти годы целого ряда синтетических сред культивируемые клетки становятся доступными для широкого круга исследовательских лабораторий.

Развитие методов культивирования клеток способствовало интенсивно развивавшейся на их основе молекулярной биологии и в частности изучению механизмов функционирования генетического аппарата клеток человека, животных и растений. При выделении и анализе эукариотических генов и нуклеотидных последовательностей ДНК, осуществляющих регуляторную функцию, оказалось возможным изменять свойства клеток путем введения в них, конструированных рекомбинантных ДНК. Этот способ получил название трансфекции с помощью, которой, стали изучать закономерности генетической трансформации клеток. Успехи, достигнутые в этом направлении, привели к заключению о возможности использования чужеродных генов не только для

фундаментальных исследований, но и для решения практических задач биотехнологии и медицины.

При попытках выделения полезных для медицины белков и тканей животных возникли трудности, связанные с неудовлетворительным выходом искомого продукта, сложностью и дорогостоящей очисткой полученных белков и в ряде случаев с потерей или значительным снижением их биологической активности. Эти обстоятельства стимулировали интенсивное изучение возможности эксплуатации в биотехнологии культивируемых соматических клеток животных. Этому способствовала также гораздо меньшая трудоемкость при использовании на производстве клеток-продуцентов белков с большой молекулярной массой, со сложной третичной структурой и посттрансляционными модификациями. Такой подход позволял в короткие сроки получать перспективные в фармакологическом отношении белки в количествах достаточных для проверки их эффективности. Таким образом, методом генетической трансформации были получены культивируемые клетки для производства вакцин. Их преимущество заключалось в том, что для их создания не нужно было использовать таких инфекционных агентов как вирусы и патогенные микроорганизмы. Введение полученных из них генов позволяло также осуществлять генетические модификации с целью повышения их стабильности при хранении и эффективности при вакцинации. С помощью такой технологии был получен ряд чрезвычайно важных вакцин против вируса гриппа, вируса везикулярного стоматита, вируса гепатита В, вируса лейкемии и ряда других вирусов.

Преимущества культивируемых клеток, секретирующих вирусные антигены для производства вакцин были очевидны. Во-первых, облегчался процесс очистки белков. Во-вторых, отпадала необходимость разрушения клеток для выделения антигена, что

позволяло эффективно и в течение длительного времени использовать одни и те же клетки для производства белков.

Кроме производства вакцин генетически трансформированные клетки были применены для получения других, полезных для медицины белков. К ним относятся клетки-продуценты секретирующие гормоны роста, α -, β - и γ -интерфероны, активатор пламиногена, эритропоэтин, факторы свертывания крови и ряд других молекул.

Следует подчеркнуть, что многие полезные белки представляют собой комплексы полипептидов, кодируемых разными генами, сборка которых должна быть упорядочена и может быть сопряжена с необходимым синтезом соответствующей полипептидной цепи. В этом случае соматические клетки животных, в отличие от бактерий, могут быть также использованы для производства разных мультимерных гетерополипептидов.

Хотя высказываются опасения в отношении фармацевтических продуктов, полученных из клеток постоянных линий, экспериментальных данных, подтверждающих эти опасения, не было получено. Напротив доказанная в ряде случаев возможность вирусной контаминации продуктов, получаемых из клеток крови или из плазмы человека, делает генно-инженерные белки, продуцируемые генетически трансформированными соматическими клетками, более безопасными, чем аналогичные «природные» продукты.

Другим важным направлением исследований культивируемых клеток, также послужившим основой для развития клеточной биотехнологии, было изучение молекулярных и клеточных механизмов гибридизации соматических клеток. Под гибридизацией подразумевается слияние клеток и его роль в осуществлении ряда физиологических и патологических процессов. В основе этого явления лежит спонтанное или искусственное слияние различных клеток и образование клеточных гибридов. Первые гибридные клетки

были получены в 60-х годах прошлого столетия. Барский с сотрудниками смешали клетки двух линий мышинной саркомы и через 3 месяца обнаружили в культуре гибридные клетки. Результаты Барского были воспроизведены и подтверждены на других клеточных линиях. Вместе с тем спонтанное слияние клеток происходило достаточно редко и не могло быть получено по желанию исследователей. Для того чтобы понять механизмы спонтанного слияния клеток были проведены детальные исследования межклеточных взаимодействий на разнообразных клеточных линиях, в результате которых было установлено, что преимущественно этим свойством обладают опухолевые и эмбриональные мезенхимные клетки.

Для того чтобы научиться направленно получать гибридные клетки исследователи начали поиск факторов способствующих их слиянию. Было обнаружено, что слиянию клеток может способствовать изменение содержания ионов кальция в окружающей среде. На куриных эритроцитах было показано, что если их инкубировать при температуре 37 °С в среде содержащей 40-50 мМ CaCl_2 они могут сливаться. Другими факторами, способствовавшими слиянию клеток, оказались липиды или липидоподобные вещества, в частности лизолецитин, являющийся продуктом ферментативной деградации лецитина. Кроме него положительный эффект оказывали также жирные кислоты и производные глицерина. И, наконец, в 1974 году было обнаружено, что полиэтиленгликоль вызывает агглютинацию растительных клеток, а при последующем постепенном разведении питательной среды приводит к их интенсивному слиянию. Аналогичные результаты были получены и на животных клетках при обработке их полиэтиленгликолем.

Дальнейшие исследования, проведенные в разных лабораториях, привели ученых к заключению о том, что в основе этого явления лежат структурные преобразования клеточной

мембраны, вызываемые в той или иной степени вышеперечисленными факторами. Помимо слияния мембран двух клеток для их нормального физиологического состояния необходимо также объединение их цитоплазм и стабилизация вновь образовавшейся системы. Результаты многочисленных проведенных экспериментов привели к выводу о том, что главную роль в таком объединении выполняют преобразования актинового цитоскелета с использованием энергии АТФ. Следует отметить, что формирование мышечных волокон за счет слияния миобластов усиливается при обработке клеток цитохалазином, вызывающим драматические перестройки цитоскелета.

В то время когда проводились многочисленные исследования механизмов спонтанного слияния клеток и выяснения факторов, влияющих на этот процесс, само явление уже было известно, и для его осуществления использовалась обработка клеток вирусами. Одним из наиболее широко используемых вирусов для этой цели явился вирус Сендай, открытый Ишидой с соавторами в Японии. Этот вирус относится типу парамиксовирусов, обладающих способностью к ферментативному воздействию на гликопротеиды клеточной мембраны. При его исследовании оказалось, что он имеет размер порядка 500 нм и обладает липидной оболочкой подобной мембранам клеток эукариот, но украшенной «шипами». Оказалось, что мембранная природа оболочки вируса Сендай обусловлена тем, что при выходе из клетки-хозяина частицы вируса окружаются участками ее плазматической мембраны. Каждый шип на поверхности вируса является унивалентным гемагглютинином и поэтому может вызывать агрегацию клеток. Кроме того, шипы обладают нейраминидазной активностью приводящей к отщеплению терминальных остатков сиаловой кислоты от олигосахаридной части многочисленных гликопротеидов находящихся на поверхности

клеток. Эти свойства поверхности вируса способствуют слиянию клеточных мембран

Именно с помощью вируса Сендай и были получены первые гибридомы, результат слияния лимфоцитов и клеток миеломы, которые продуцировали моноклональные антитела. Этому успеху, по-видимому, способствовала обнаруженная способность миеломы также синтезировать иммуноглобулины. Ввиду избирательной способности вируса Сендай к слиянию разных клеточных типов, а также возможных побочных влияний на гибридные клетки в дальнейшем отказались от его использования в этой области биотехнологии. В настоящее время для получения гибридом используют полиэтиленгликоль, являющийся надежным и биобезопасным индуктором слияния клеток.

Помимо использования культивируемых клеток в качестве источника разнообразных полезных веществ в конце 20 века в клеточной биотехнологии появилось и бурно развивается в настоящее время новое направление, посвященное лечению тяжелых заболеваний человека методами заместительной клеточной терапии. Название заместительная клеточная терапия подразумевает разработку новых наукоемких биомедицинских технологий на основе культивируемых стволовых и соматических клеток взрослого организма, трансплантируемых в организм пациента для восстановления структурной целостности и функций поврежденных органов и тканей. В настоящее время это уже не только разработки, но и реальное клиническое применение в случаях повреждений кожной или костной ткани. Подробное описание разработанных технологий для регенеративной медицины подробно описано в последующих главах настоящего учебного пособия.

Большую роль в развитии этого нового направления сыграло открытие возможности выделения, культивирования и направленной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток человека и

стволовых клеток взрослого организма. В настоящее время для лечения преимущественно применяют клетки, выделенные из организма и культивируемые в двумерном пространстве в культуральных сосудах с последующей их имплантацией в зоны повреждения. При этом, однако, выделенные клетки теряют в процессе культивирования, характерное для них микроокружение и изменяют свои свойства.

Кроме того, любая ткань или орган человека представляют собой трехмерную специализированную структуру основой, которой является внеклеточный матрикс, синтезируемый в основном фибробластами. Белки внеклеточного матрикса, это биологически активные крестовые полимерные молекулы (коллаген, ламинин, эластин, фибронектин, протеогликаны и др.), которые взаимодействуют с поверхностными рецепторами клетки и регулируют такие важные клеточные процессы, как пролиферация, дифференцировка, биологическая подвижность, взаимодействие клеток между собой и с соединительной тканью в процессе морфогенеза и регенерации. По-видимому, в связи с изменениями клеток при культивировании и при отсутствии адекватного микроокружения в процессе имплантации в ряде случаев пересаженные клетки оказывают безусловный положительный клинический эффект, но полного восстановления утраченной ткани может не происходить.

Следующим шагом решения возникающих проблем на пути развития наукоемких биомедицинских клеточных технологий с использованием культивируемых клеток явилось появление нового междисциплинарного направления - тканевой инженерии, которая включает в себя принципы и методы клеточной биологии, химии, физики и материаловедения. В основе тканевой инженерии лежит создание сложных трехмерных композиций, включающих: культивируемые клетки, белки внеклеточного матрикса и биodeградируемые полимерные материалы, с целью получения *in*

in vitro . тканеподобных структур максимально приближенных по организации к нативной ткани и предназначенных для восстановления утраченных ею функций

В процессе разработки указанных технологий выяснилось, что их эффективность также требует создания адекватного для используемых клеток микроокружения. Иными словами это означает, что при создании клеточных продуктов в их состав должны входить соответствующие элементы внеклеточного матрикса, ростовые факторы, а также сопутствующие клетки, обеспечивающие нормальное формирование ткани. Полной ясности о том, какой именно должен быть состав такого микроокружения еще пока не существует. В этом направлении во всем мире идут интенсивные исследования

Подводя итог анализу использования культивируемых клеток в качестве основы для клеточной биотехнологии, следует подчеркнуть, что длительный и трудоемкий путь поисков оптимальных условий для поддержания жизнеспособности клеток и регуляции их функций *in vitro*, привел в результате к настоящему расцвету их применения не только в научных целях, но и для лечения тяжелых заболеваний человека, не поддающихся традиционным способам терапии.

2.1. Технология получения и поддержания клеточных культур

Технология выделения и культивирования клеток различного гистогенеза постепенно сложилась на протяжении последних 100 лет. Еще в начале прошлого века были начаты исследования структуры и функции фрагментов тканей *in vitro* и возможности их переживания в различных биологически активных жидкостях организма, таких как плазма и сыворотка крови. В некоторых случаях из таких фрагментов тканей клетки мигрировали, и в основном это были фибробласты. По мере накопления экспериментального опыта сложилась технология

выделения и культивирования клеток, которая, тем не менее, продолжает развиваться и в настоящее время.

Чтобы лучше себе представить основы осуществления такой технологии, обратимся к одной из современных схем этого процесса.

Схема выделения и перевода в культуру клеток из соединительной или мышечной тканей

Получение стерильной ткани

|

Диссоциация ткани

(механическая, ферментативная, с помощью хелатирующих агентов
либо комбинации различных обработок ткани)

|

Инактивация протеаз в полученной суспензии клеток (добавлением
5% сыворотки крови) и освобождение клеток от остатков ткани
(фильтрование через нейлоновый фильтр)

|

Осаждение клеток (центрифугирование – 200g, 5-10 мин.)

|

Суспендирование клеток в ростовой среде (питательная среда + 2-
20% сыворотки крови + цитокины, белки адгезии, ростовые факторы)

|

Подсчет концентрации клеток в гемоцитометре

|

Количественный высев клеток в сосуд для культивирования

|

Культивирование клеток в CO₂ – инкубаторе (37⁰C, 95% воздуха, 5%
CO₂..)

Клетки, посеянные в сосуды для культивирования, прикрепляются к поверхности сосуда, затем распластываются на ней и начинают размножаться. Так как они покрывают дно сосуда в один слой, их называют монослойными клеточными культурами.

Помимо монослойных были получены суспензионные клеточные культуры гемопоэтических клеток крови и костного мозга, то есть культуры способные расти и размножаться без прикрепления к поверхности сосуда. Схема выделения таких клеток, не имеющих плотных контактов между собой, состоит из механической их диссоциации в сочетании с различными методами их фракционирования (градиентное центрифугирование, цитоиммуноферез). После получения суспензии клеток их аналогично с монослойными клетками количественно высевают в стерильных условиях в специальных ростовых средах в сосуды для культивирования, которые помещают в термостат.

Из представленной схемы следует, что для любых типов клеток необходимо обеспечить самые важные условия их существования в организме: постоянную температуру, стерильность, питательную среду (жидкую фазу), газовую фазу (смесь воздуха и CO_2) и твердую фазу (поверхность сосуда для культивирования). Эти условия были достигнуты с помощью:

- установок, обеспечивающих стерильную работу (ламинарных боксов, создающих поток обеспыленного стерильного воздуха);

- специальной стерильной посуды «для культур клеток» (из специально подготовленного и имеющего определенный заряд поверхности пластика);

- термостатов, обеспечивающих постоянные температуру (для теплокровных 37°C), влажность и газовый состав (наиболее часто: 95% воздуха и 5% CO_2);

- смеси стерильных стандартных питательных сред постоянного химического состава и биологически активных комплексных

препаратов, таких как сыворотка крови, ее фракции и отдельные биологически активные компоненты (цитокины, ростовые факторы, гормоны).

В настоящее время существует большое количество крупных фирм, производящих все необходимое для получения и поддержания клеточных культур. Первые три из перечисленных условий обеспечивают только стерильность и стандартность процесса культивирования клеток.

Среды для клеточных культур с указанными в схеме добавками являются основными ключевыми факторами, регулирующими различные аспекты функциональной активности клеток в культуре (адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку). Поэтому остановимся подробнее на принципах разработки и на составе питательных сред, используемых при культивирования клеток.

2.2. Стандартные питательные среды постоянного химического состава

Долгое время в качестве жидкой фазы для культивирования клеток, как уже упоминалось ранее, использовали плазму крови, тканевые экстракты, а затем сыворотку крови. Все эти комплексные препараты стимулировали как пролиферацию, так и разрушение различных типов клеток и при этом имели нестабильный химический состав. В ходе совершенствования среды для культивирования клеток было обнаружено, что одним из главных условий сохранения жизнеспособности и функциональной активности клеток является поддержание в среде определенных пределов концентрации водородных ионов (рН) и осмотического давления. Эту функцию выполняет сбалансированный солевой раствор, лежащий в основе питательной среды и содержащий смесь солей Na, K, Ca, дополненную углеводом в качестве источника энергии. В основе многих питательных сред лежат солевые растворы Эрла и Хенкса.

Растворы Эрла и Хенкса, а также фосфатно-солевой буфер Дальбекко широко используют также для промывания клеток и для приготовления растворов, диссоциирующих ткани.

Осмотическое давление солевых растворов и питательных сред определяется числом молей осмотически активных частиц (ионов и неионизированных молекул) растворенных веществ на 1 кг растворителя (осмоляльность) или на 1 л раствора (осмолярность). В разбавленных водных растворах эти величины близки. Общую осмоляльность раствора (осмоль/кг) можно представить в виде суммы $\sum m_i x_i$ ($i=1-n$), где m_i – концентрация i -го растворенного вещества (моль/кг), x_i – количество частиц, на которое диссоциирует его молекула, n – количество веществ. Например, для раствора Эрла расчетная величина осмоляльности составляет 310,6 мосмоль/кг, а реальная, полученная из данных по определению снижения точки замерзания, – 283 мосмоль/кг. Осмоляльность растворов измеряют с помощью осмометров – приборов, основанных на сравнении точек замерзания исследуемого и калибровочного раствора.

В большинстве сред, как и в крови, в качестве главного компонента системы, поддерживающей pH, используется бикарбонатный буфер. В растворе бикарбоната осуществляется равновесие $\text{HCO}_3^- = \text{CO}_2 + \text{OH}^-$. Если CO_2 уходит из раствора, то равновесие сдвигается вправо и пропорционально концентрации бикарбоната увеличивается число гидроксильных ионов. Растворы с бикарбонатным буфером можно разделить на 2 группы: с низким (Хенкса) и высоким (Эрла) содержанием бикарбоната. При работе с растворами, содержащими много бикарбоната, необходимо вести культивирование при высоком содержании в воздухе CO_2 , что возможно только в специальных сосудах (чашки Петри, специальные платы и флаконы с перфорированными крышками) в CO_2 -инкубаторе.

Пределы pH и осмоляльности, в которых происходит размножение клеток, довольно узки и варьируют в зависимости от типа клеток. Для диплоидных фибробластов человека линии WI38 оптимальны pH 7.3 ± 0.15 и осмоляльность 285 ± 40 мосмоль/кг, а для фибробластов из эмбриона цыпленка – pH 7.12 ± 0.18 и осмоляльность 300 ± 20 мосмоль/кг.

Технические трудности, а также проблемы, связанные со значительными изменениями pH при работе с клеточными культурами вне CO₂-инкубатора, стимулируют поиск альтернативных буферных систем. Например, можно поддерживать pH, повышая концентрацию аминокислот, а, также заменяя бикарбонат β-глицерофосфатом и различными синтетическими органическими буферами, из которых наиболее широкое распространение получил буфер HEPES — соль 2,4-оксиэтил-1-пиридинэтансульфоновой кислоты (pH 7,2-7,4 при 37°C). Он обычно используется в концентрации 0,01-0,03 моля. Добавляя к стандартным средам HEPES и другие буферы, надо учитывать их вклад в общую осмоляльность: так, например, 0,05M HEPES увеличит осмоляльность более чем на 50 мосмоль/кг.

Исследование биохимического состава биологически активных натуральных жидкостей для культивирования клеток, в первую очередь сыворотки и плазмы крови, привело к выделению двух основных групп компонентов сред: низкомолекулярных (аминокислоты, витамины, нуклеотиды) и высокомолекулярных (липиды, углеводы, белки, гликопротеины). На базе сбалансированных солевых растворов в комплексе с различными аминокислотами, витаминами, жирными кислотами, микроэлементами, индикатором pH были разработаны питательные среды постоянного химического состава для различных клеточных культур. Начиная с конца 40-х годов, исследования в этом направлении вели в нескольких лабораториях США и Англии.

Одними из первых успехов добились Parker (1950 – среда 199), Eagle (1959 – среды MEM), Dulbecco (1959 – среда DMEM), а затем Ham (1963,65 – среды F10, F12) и Kitamura (1968 – среда RPMI1640). В настоящее время существует более 20 основных базовых сред постоянного химического состава, разработанных на основе указанных выше сред. Эти среды называются стандартными питательными средами. Основными компонентами сред являются аминокислоты (12-25 наименований – н.), витамины (8-17 н.), соли (6-10 н.), сахара (1-3 н.), основания нуклеиновых кислот: нуклеозиды, нуклеотиды (0-7 н.), а также липиды, индикатор pH и др. компоненты (1-5 н.). Одной из наиболее бедных по ассортименту компонентов является среда MEM (minimum essential medium) , разработанная под руководством Eagle как минимальная (~30 компонентов – к.). Наиболее богаты по ассортименту среды Хэма- F10, F12 (~50 к.), а также среда 199 (~60 к.). Большинство стандартных питательных сред создано на бикарбонатной буферной системе. В некоторых случаях в них вводят для увеличения буферной емкости буфер HEPES. Исключение составляет среда L15 (разработана Leibovits), где буферную емкость обеспечивают аминокислоты. Большинство стандартных питательных сред имеют pH 7.2-7.4, а осмоляльность 280 – 320 мосмоль/кг.

Состав питательных сред, ссылки на их разработчиков, особенности их приготовления приводят во всех каталогах фирм-производителей, таких как Life Technologies-GibcoBRL, ICN, Sigma, Serva и др. Среда выпускают как стерильные сухие, так и жидкие. Срок хранения жидких сред 1 год, сухих 2-3 года при соблюдении условий хранения. Возможность выпуска сухих питательных сред связана с получением тщательно обезвоженных и перемешанных в шаровой мельнице смесей всех компонентов с дальнейшей их герметичной упаковкой в атмосфере азота. Для приготовления жидких сред из таких смесей помимо сухого порошка стандартной

питательной среды необходима особо чистая вода (сопротивление 18 MgOm), бикарбонат Na, разбавленные соляная кислота и щелочь для подведения pH, осмометр, pH-метр, установка для стерильного фильтрования сред (фирмы Millipore и других), основанного на пропускании среды через систему стерильных мембранных фильтров из нитроцеллюлозы с минимальным диаметром пор 0,2 мкм.

2.3. Сыворотка крови и ее роль в культивирования клеток

При культивировании клеток используют питательные среды постоянного химического состава в комплексе с сывороткой и другими биологически активными компонентами.

В зависимости от задачи исследования культуральные среды можно разделить на ростовые (обеспечивающие пролиферацию клеток), транспортные (обеспечивающие жизнеспособность клеток при транспортировке), поддерживающие (обеспечивающие жизнеспособность и функциональную активность клеток в стационарной фазе роста), а также дифференцировочные (вызывающие направленную дифференцировку клеток). Перечисленные среды содержат 1-20% сыворотки крови или могут быть бессывороточными.

Сыворотка крови - одна из наиболее универсальных биологически активных жидкостей - незаменима при культивировании клеток. Особенно это касается эмбриональной сыворотки различных биологических видов. Сыворотку получают из цельной крови в процессе лизиса форменных элементов и формирования фибринового сгустка. Наиболее широко используют сыворотку крови плодов коров (СЭК). Аналогично питательным средам и другим растворам для культивирования клеток сыворотку стерилизуют путем фильтрования через систему стерильных мембранных фильтров из нитроцеллюлозы, помещенных в

специальный фильтродержатель (Millipore, США). Сыворотка играет следующую роль в процессе культивирования клеток:

- обеспечивает клетки гормональными и ростовыми факторами, стимулирующими их рост и функции;
- обеспечивает клетки факторами, необходимыми для их прикрепления к подложке и распластывания на ней;
- обеспечивает клетки транспортными белками, переносящими гормоны, минеральные вещества, липиды и т.д.

Сыворотка, особенно СЭК, незаменима при культивировании практически всех типов клеток. Например, для пролиферации стромальных (мезенхимальных) клеток костного мозга – СККМ (МСК), оптимально использовать для этого питательную среду α MEM с добавлением 10-20% отселектированной для этого типа клеток СЭК. Для фракции этих клеток – мезодермальных предшественников – оптимальна среда, состоящая из смеси сред MCDB и DMEM с добавлением 2% СЭК, а также факторов роста, дексаметазона и других веществ в сочетании с культивированием этих клеток на подложке из фибронектина. В настоящее время фирмы-производители сывороток тестируют их и в дальнейшем рекомендуют для культивирования определенных типов клеток: СККМ (МСК), гибридом, фибробластов.

Однако использование сыворотки имеет ряд существенных недостатков. К ним относятся следующие факторы:

- 1). Для большинства клеток сыворотка не является физиологической жидкостью, с которой они контактировали в исходной ткани. Такой контакт мог осуществляться в процессе заживления ран и образования кровяных сгустков. При этом сыворотка вызывает рост фибробластов, но тормозит рост эпидермальных кератиноцитов.

- 2). Сыворотка может быть цитотоксичной из-за присутствия селективных ингибиторов, бактериальных токсинов, некоторых липидов, а также ферментов типа полиаминооксидазы.
- 3). Активность сыворотки меняется от партии к партии.
- 4). Сыворотка может содержать недостаточное количество специфических для данных клеток ростовых факторов, что приводит к необходимости добавления этих факторов к культуральным средам.

Частично указанные недостатки можно компенсировать с помощью бессывороточных сред.

2.4. Бессывороточные питательные среды

В зависимости от поставленной в конкретной работе задачи (например, оптимизация процесса дифференцировки клеток, поддержание клеток в стационарной фазе роста) и типа клеток (суспензионные или монослойные) применяют бессывороточные среды различного состава. Они имеют следующие преимущества:

- 1). Обеспечивают улучшение воспроизводимости результатов опытов вследствие большей стабильности состава среды.
- 2). Снижают риск заражения культуры вирусами, грибами, микоплазмой.
- 3). Облегчают очистку продуктов клеточного метаболизма.
- 4). Не содержат цитотоксических примесей.

Переход к бессывороточной среде осуществляют по-разному: ступенчато снижая количество сыворотки в среде и вводя ее заменитель, либо в один прием, замещая сыворотку ее заменителем, либо культивируя клетки непосредственно в питательной среде с включенными в нее необходимыми компонентами. Тот или иной подход зависит от поставленной задачи. Наиболее часто используют последний из перечисленных подходов. Он сводится к добавлению непосредственно в питательную среду различных комбинаций

ростовых факторов и других незаменимых компонентов, выполняющих функцию сыворотки: гормонов, транспортных белков и факторов прикрепления. Применяют бессывороточное культивирование, как правило, при работе с клетками-продуцентами, когда необходимо в дальнейшем выделять из культуральной среды или из клеточной массы биологически активные продукты жизнедеятельности клеток. Кроме того, бессывороточное культивирование используют при изучении дифференцировки и пролиферации клеток в культуре. Остановимся на примерах бессывороточных сред для разных типов клеток:

1). Для гибридом (на стационарной фазе роста с целью очистки продуцируемых клетками антибел) и миелом (для исследования пролиферации) используют:

среды Искова (Iskov's: IMDM);

DMEM/F12 + ITESA (insulin, transferrin, ethanolamine, selenite, albumin);

DMEM/F12 + безбелковый заменитель сыворотки (гидрокортизон и микроэлементы).

2). Для диплоидных фибробластов человека (на стационарной фазе роста с целью анализа продуцируемых компонентов, иногда – для изучения пролиферации):

DMEM/199+ ITESA, ФРЭ- фактор роста эпидермиса, дексаметазон, фибронектин, путресцин, фетуин, молибдат.

3). Для кератиноцитов человека (для обеспечения их пролиферации): MCDB104 + IE , ФРЭ, гидрокортизон, фосфоэтаноламин.

Таким образом, среды 1, 2 можно использовать как ростовые, так и переживающие. Среда 3 – ростовая. В транспортные бессывороточные среды на базе стандартных питательных сред (DMEM, MEM, RPMI1640, α MEM) добавляют BSA (бычий

сывороточный альбумин) и некоторые другие компоненты, повышающие жизнеспособность клеток при их транспортировке.

Для дифференцировки СККМ в хондрогенном направлении была разработана бессывороточная среда, состоящая из DMEM + ITS, TGF β , BSA, LA, дексаметазон, аскорбиновая кислота, пролин, пируват.

К недостаткам бессывороточных сред можно отнести следующее:

- 1). Бессывороточная среда не универсальна и пригодна только для одного типа клеток и для конкретной задачи.
- 2). В этих средах клетки имеют пониженную жизнеспособность.
- 3). При пересевах монослойных культур необходимо использовать ингибиторы протеаз.

Однако то, что бессывороточные среды не универсальны и разработаны для определенных типов клеток и определенных задач их культивирования является, с одной стороны, недостатком, а с другой стороны, достоинством, обеспечивающим тонкую регуляцию активности клеток.

2.5. Культивирование клеток в объемных матрицах, крупномасштабное культивирование

Для дальнейшего усовершенствования условий жизнедеятельности клеток *in vitro* и приближения их к условиям *in vivo* были разработаны новые поверхности для культивирования клеток (например, покрытые белком адгезии - фибронектином). Кроме того, были начаты работы по созданию поверхностей с различной геометрией, а также 3D-матриц из различных полимеров. Это направление особенно важно для разработки биоинженерных имплантатов, состоящих из культивируемых клеток и объемного матрикса-носителя. Например, в Отделе клеточных культур Института цитологии РАН были созданы дермальные эквиваленты из коллагенового геля с внесенными в него фибробластами кожи, которые успешно применяют при лечении трофических язв, а также

имплантаты из деминерализованной костной ткани (ДКТ), коллагенового геля и СККМ, которые могут быть использованы в лечении сложных нарушений костной ткани. Создание этих клеточных продуктов будет более детально описано в последующих главах.

Еще одним важным направлением в клеточной биотехнологии является наращивание большого количества клеток – продуцентов. Для этого было разработано крупномасштабное культивирование с использованием ферментеров для суспензионных клеток (например, гибридом) с постоянным перемешиванием. В них предусмотрен автоматический контроль pH среды, поглощения клетками кислорода, продукции антител, смены среды. Для наращивания большого количества монослойных клеток используют ферментеры с большими поверхностями для культивирования: на специальных бусинах, покрытых фибронектином или другими молекулами адгезии. Клетки наносят на бусины и культивируют в ферментере при перемешивании, контролируя важнейшие параметры их жизнедеятельности. Поверхность для культивирования клеток может быть увеличена также за счет использования полых волокон, сосудов определенной формы, содержащих в себе несколько взаимосвязанных плоскостей для культивирования. Крупномасштабное культивирование, с одной стороны, шаг к стандартизации выращивания клеток за счет использования автоматических систем контроля. Но при этом увеличивается стоимость культивирования. Поэтому использовать крупномасштабное культивирование целесообразно только при выращивании клеток-продуцентов биоактивных молекул в высокой концентрации.

В заключение следует подчеркнуть, что для успешного культивирования клеток помимо стерильности и определенной температуры важны все 3 фазы, окружающие их *in vitro*: твердая (подложка культурального сосуда), газообразная (смесь воздуха и CO₂) и жидкая (культуральная среда). При высоком качестве всех трех фаз культуральная среда играет ключевую роль при выделении и выращивании клеток. Однако, при создании ткане-инженерных эквивалентов с целью их использования в регенеративной медицине необходима разработка новых подходов к оптимизации культивирования клеток в 3D- матрицах. В этом случае помимо среды ключевую роль в культивировании клеток играет такая матрица. Дальнейшее успешное использование клеточных культур в регенеративной медицине связано с созданием и развитием новых технологий культивирования клеток в 3D- матрицах.

3. Типы клеточных культур. Характеристики и изменчивость клеточных линий.

Широкое распространение методов выделения и поддержания жизнеспособности разных клеток *in vitro* началось с середины 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, механизмы действия онкогенов, дифференцировка клеток; а также вопросы вирусологии (производство противовирусных препаратов), иммунологии, генной инженерии (создание генетических структур с определенными свойствами), трансплантационной медицины, фармакологии и др. В настоящее время в мире получено огромное количество клеточных культур, имеющих разное видовое и тканевое происхождение.

В зависимости от длительности существования культуры различают первичные клеточные культуры и клеточные линии. Первичная культура – это клетки, полученные непосредственно из организма и культивируемые до первого пересева (пассажа). После пересева клеточная культура становится клеточной линией. Клеточные линии могут иметь ограниченный срок жизни, так называемые диплоидные или неиммortalизованные клеточные линии, а могут размножаться в культуре и неограниченно долго. Такие линии называют постоянными или immortalизованными клеточными линиями. В зависимости от происхождения клеточные культуры имеют разную морфологию: эпителикподобную, фибробластоподобную, нейробластоподобную или лимфобластоподобную (рис.2). Первые три типа культур называют монослойными, т.е. эти клетки прикрепляются и распластываются на субстрате (на поверхности культуральной посуды). Последний тип культуры называют суспензионным или полусуспензионным, т.е. клетки растут в суспензии, иногда частично прикрепляясь к субстрату, но, не распластываясь на нем. К этому типу относятся клетки крови и иммунной системы.

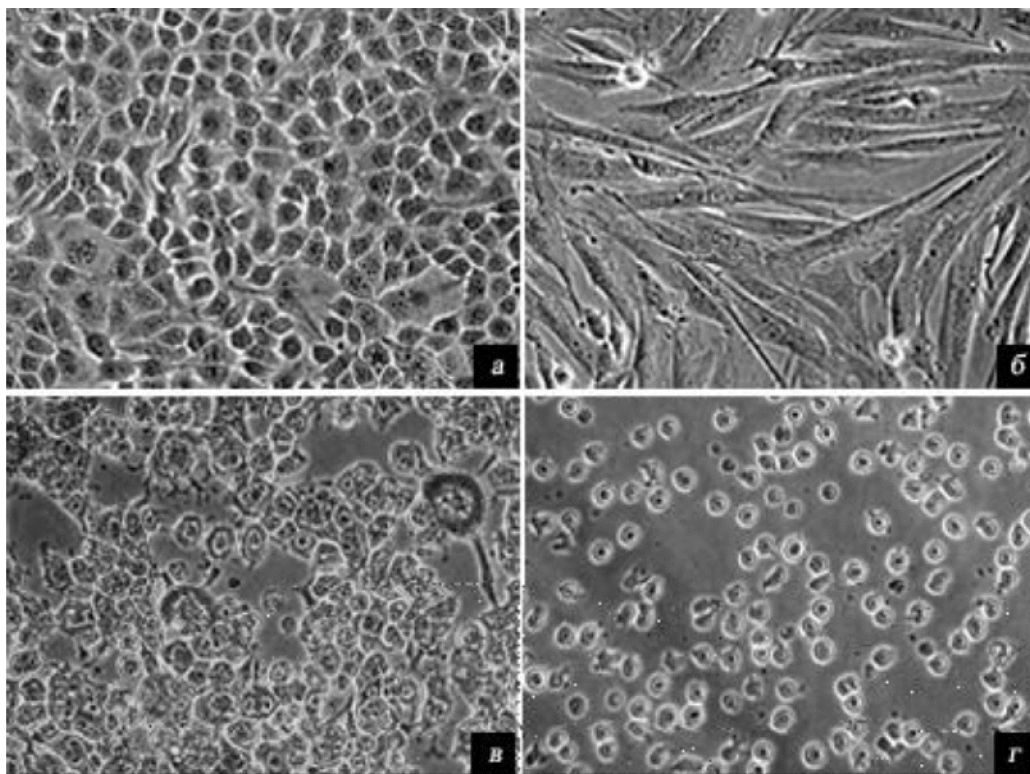


Рис.2 Морфология клеток разного происхождения

а – эпителиоподобная (MDCK, почка собаки), б – фибробластоподобная (М, кожа индийского мунтжака), в – нейробластоподобная (NB41A3, нейробластома мыши), г – лимфобластоподобная (U-937, гистиоцитарная лимфома человека).

Остановимся подробнее на диплоидных или неиммортизированных клеточных линиях. Эти линии устойчиво сохраняют диплоидный кариотип, соответствующий донору, т.е. организму из которого получена линия. Кариотип - это набор хромосом соматической клетки, типичный для данной систематической группы животных или растений. Среди диплоидных линий наибольшее распространение получили диплоидные культуры фибробластов человека и животных. Фибробласты – это наименее дифференцированные клетки в семействе соединительнотканых клеток. Но есть также и линии клеток эпителиального происхождения – кератиноциты, гепатоциты и др. В начале 60-х годов в работах Хейфлика впервые было

установлено, что способность этих клеток к делению ограничена числом удвоений популяции культивируемых клеток. Культуры диплоидных клеток проходят *in vitro* через определенные этапы развития. Выделяют 3 фазы. 1-я – это адаптация клеток в первичной культуре; 2-я – деление клеток определенное число раз; 3-я – прекращение пролиферации, и либо последующая дегенерация и гибель клеток, либо длительное существование живых клеток с возможным переключением их на другой метаболический путь. Следует подчеркнуть, что главным критерием вступления культуры в 3-ю фазу является прекращение митозов. В связи с этим принято говорить о «репликативном старении» клеточных культур. Продолжительность 2-й фазы, в течение которой клетки стабильно делятся, определяется не временем, которое клетки провели в культуре, а числом прошедших удвоений популяции. Хейфлик высказал предположение, что наблюдаемое в культурах репликативное старение отражает ряд процессов, которые происходят при естественном старении организма. Продолжительность пролиферативного потенциала клеток коррелирует с их видовой принадлежностью (табл.2). Одним из молекулярных механизмов старения является укорочение теломер, т.е. концевых участков хромосом, состоящих у позвоночных из тысяч tandemных повторов (TTAGGG)_n, происходящее при каждом цикле репликации ДНК и, соответственно, при каждом клеточном делении вследствие выключения фермента теломеразы. Теломераза – это необычная обратная транскриптаза, имеющая молекулу РНК в качестве интегрального компонента этого фермента. Выключение теломеразы происходит на ранних стадиях эмбриогенеза. При анализе культуры нормальных фибробластов человека (возраст доноров от 0 до 93 лет) была выявлена корреляция между пролиферативной способностью клеток и начальной длиной теломер во всем диапазоне возрастов. Так, клетки с короткими теломерами проходят гораздо меньше удвоений, чем клетки с длинными теломерами.

Таблица 2.

Корреляция между пролиферативным потенциалом клеток и видовой продолжительностью жизни (Михельсон, 1984)

Вид	Видовая продолжительность жизни (лет)	Максимальное число удвоений клеточной популяции	Литературный источник
Галапагосская черепаха	175	90 – 125	Goldstein, 1974
Человек	90	40 – 60	
Курица	20	15 – 35	Hayflick, 1965
Америкаская норка	10	30 – 34	Beug, Graf, 1977
Белая мышь	3.5	14 – 28	Hayflick, 1975 Hayflick, 1977

Рассмотрим механизмы образования и свойства постоянных или иммортализованных клеточных линий. Известно, что в неиммортализованных или диплоидных клеточных культурах с ограниченным сроком жизни, еще до перехода их в состояние иммортализации, по мере увеличения числа клеточных удвоений, имеет место ряд изменений по сравнению с первичными культурами. Наблюдается уже упомянутое постепенное укорочение теломер. Было сделано предположение, что по мере укорочения теломер происходит сдвиг гетерохроматинового блока теломерных повторов в прителомерную область хромосомы. В связи с этим происходит гетерохроматизация хроматина, расположенного в прителомерной области, т.е. имеет место теломерный эффект положения, в результате которого изменяется функциональная активность некоторых генов.

Эти явления способствуют постепенному старению и последующей гибели клеток. Иммуортализация может быть спонтанной и индуцированной. Клетки человека, в отличие от клеток грызунов и других животных, за редким исключением, *in vitro* спонтанно не иммуортализуются. Как правило, иммуортализованные клеточные линии человека получают с помощью вирусной трансформации. Большое количество клеточных линий имеет опухолевое происхождение. Они выделены из опухолей, образованных в организме, т.е. процесс иммуортализации, в данном случае злокачественной трансформации, прошел *in vivo*. В процессе культивирования клетки могут сохранять онкогенные свойства и вызывать опухоли при инъекции их соответствующим животным, но могут и потерять это свойство, особенно при длительном культивировании. Линии неопухолевого происхождения в процессе культивирования в определенных условиях, наоборот, могут стать злокачественными. Таким образом, клеточные линии различаются между собой степенью трансформированности, т.е. степенью продвинутой в сторону приобретения онкогенных свойств.

Наиболее полно процесс иммуортализации исследован при заражении диплоидных фибробластов человека вирусом обезьян SV40. Образование постоянных клеточных линий, т.е. приобретение ими свойства иммуортализации, сопряжено со многими генетическими и цитогенетическими изменениями в клеточных популяциях. Процесс иммуортализации клеток человека под действием вируса проходит через несколько стадий. Сначала имеет место временное удлинение жизни. Нарушение функций генов, регулирующих пролиферацию, (p53 и Rb), по-видимому, расширяет пролиферативный потенциал клеток в процессе старения. Нормальные клетки претерпевают морфологическую трансформацию, и продолжительность их пролиферативной жизни повышается на 20–60 удвоенных популяции сверх их предела старения. Затем клетки вступают в стадию кризиса, где они постепенно прекращают деление.

Однако небольшая часть клеток преодолевает кризис и вступает в следующую стадию, где и превращается в иммортализованную культуру. На этой стадии происходит включение теломеразной активности или других механизмов, называемых альтернативными механизмами удлинения теломер, ALT (одним из них является нереципроктно-рекомбинационный механизм). В результате этих процессов клетки приобретают неограниченный пролиферативный потенциал, обусловленный стабилизацией длины теломер. Существенно, что до кризиса увеличивается хромосомная нестабильность, которая после него значительно снижается.

В процессе иммортализации, имеющем всегда одинаковый конечный результат, могут быть вариации на промежуточных стадиях. Выше приведен механизм иммортализации диплоидных фибробластов человека. Тогда как для иммортализации кератиноцитов человека и эпителиальных клеток млекопитающих необходима инактивация генов Rb/p16 пути или уменьшение экспрессии p16 в комбинации с теломеразной активностью. Элиминация же p53 и индуцированный ДНК повреждениями блок G1 необязателен для иммортализации этих клеток. У грызунов процесс короче за счет отсутствия стадии кризиса. Основным механизмом иммортализации является нарушение функции гена p53 или функции генов, регулирующих p53 при постоянно присутствующей теломеразной активности. По-видимому, несмотря на существование для разных клеток ряда общих закономерностей в процессе старения и иммортализации, имеются и различия в регуляции этих процессов, связанные со спецификой определенного типа клеток.

Таким образом, мы рассмотрели вопросы, касающиеся типов клеточных линий, их образования и некоторых свойств. Теперь остановимся на следующем вопросе: что происходит с клетками организма при переводе их в культуру?

Клеточные популяции в организме находятся в иных условиях, чем *in vitro*. Для жизнедеятельности организма необходимо наличие сложных межтканевых и межклеточных взаимодействий на уровне генов и их продуктов. Известно, что клетки в тканях контактируют с сетью макромолекул, образующих внеклеточный матрикс. Матрикс способствует поддержанию многоклеточных структур и создает каркас, внутри которого клетки могут мигрировать и взаимодействовать друг с другом с помощью разных межклеточных соединений. По мере усложнения организации живых систем в процессе филогенеза животных развиваются их интегральные системы - нервная, гормональная и иммунная. Клеточные процессы в организме находятся под контролем этих систем, осуществляемым через внутриклеточный обмен веществ. В организме работает стабилизирующий отбор, смысл которого состоит в поддержании нормы над патологией.

При переводе клеток в состояние *in vitro* значительно нарушаются условия их существования. Основными типами клеточного взаимодействия в культуре становятся физический контакт между клетками и контакт клеток с субстратом, а также химическая связь через метаболиты в ростовой среде. Эти взаимодействия объединяют клетки, составляющие клеточную популяцию *in vitro*, в единую автономную систему, т.е. клетки в культуре не являются разрозненными независимыми элементами. 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. В открытом состоянии коннексоны 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. Локальные межклеточные взаимодействия посредством этих каналов вовлечены в разные клеточные процессы, включая поддержание клеточного гомеостаза, контроль клеточной пролиферации, малигнизацию, апоптоз, эмбриональную индукцию и дифференцировку. Так, известно, что в условиях совместного культивирования нормальных и мутантных по определенному признаку клеток происходит частичное или полное восстановление нормального фенотипа по данному признаку. Высокая диффузионная связь показана в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках человека. Именно, с помощью метода внутриклеточных инъекций флуоресцентного красителя люцифера желтого СН в одну из клеток монослойной колонии показано быстрое распространение его в соседние клетки. Показано, что инактивация гена, контролирующего функцию мембранных каналов в щелевых контактах в некоторых трансформированных клеточных линиях, приводит к потере способности клеток взаимодействовать друг с другом и к нарушению ростовых характеристик. Трансфекция клеток соответствующим геном восстанавливает эти функции.

Клетки растут на субстрате, покрытом внеклеточным матриксом, который состоит из разнообразных белков (протеогликаны, коллагены, эластин, фибронектин, ламинин и др.), секретируемых самими клетками. Белки внеклеточного матрикса взаимодействуют с рецепторами, локализованными на поверхности клеточной мембраны, и оказывают существенное воздействие на поведение клеток в культуре, влияя на их движение, форму, полярность, метаболизм, дифференцировку и структуру кариотипа.

В условиях *in vitro* изменяются основные функции клеток. Преобладающей функцией всех постоянных клеточных линий является свойство неограниченной пролиферации. С процессом

пролиферации тесно связана кариотипическая структура клеточной популяции *in vitro*, которая отражает функциональную активность генов, локализованных в хромосомах. Рассмотрим кариотипическую структуру в клеточных популяциях *in vitro*, которая имеет свои особенности по сравнению с организмом.

В организме постоянно поддерживается диплоидное состояние кариотипа, которое сохраняется в качестве преобладающего, в неиммortalизованных клеточных культурах. Но при изменении клеточных функций после immortalизации, связанных с усилением пролиферативных потенций, диплоидное состояние часто нарушается. Кариотипические изменения, происходящие постоянно в организме с незначительной частотой, в клеточных культурах значительно усиливаются.

Процесс образования устойчивой кариотипической структуры, характерной для любой постоянной (immortalизованной) клеточной линии, проходит в два этапа: становление и стабилизация. Первый этап связан с большой кариотипической гетерогенностью клеточных популяций. Одним из наиболее распространенных путей становления таких линий является полиплоидизация (кратное увеличение всего набора хромосом), в основном, тетраплоидизация с последующей диплоидизацией или триплоидизацией по отдельным хромосомам. Но становление линий не всегда связано с первичной тетраплоидизацией. Могут сразу образовываться псевдодиплоидные или околodиплоидные клоны (клон – это потомство одной клетки). При становлении линий имеют место и другие нарушения, связанные с экстракопированием или потерей отдельных хромосом, а также со структурными хромосомными перестройками. Именно на этом этапе происходит отбор клонов клеток, наиболее приспособленных к условиям *in vitro*.

На этапе стабилизации происходит уменьшение кариотипической гетерогенности клеточных популяций. В процессе

стабилизации постоянной клеточной линии *in vitro* устанавливается сбалансированная кариотипическая структура, необходимая для существования таких линий и характеризующаяся определенными структурными и количественными изменениями хромосом; при этом для каждой клеточной линии существуют определенные ограничения по кариотипической изменчивости. Часть возникших на этапе становления измененных хромосом сохраняется и превращается в устойчиво перестроенные (так называемые маркерные) хромосомы. Некоторые маркеры встречаются не во всех клетках, а некоторые постоянно встречаются во всех клетках популяции. Таким образом, большая часть клеточных линий на этапе стабилизации характеризуется определенным спектром перестроенных (маркерных) хромосом. В перестроенном кариотипе многие гены локализуются в других, не свойственных им хромосомных сайтах, что приводит к нарушению их экспрессии. Но есть ряд линий, которым свойственно структурное соответствие кариотипу донора, т.е. для процесса иммортализации достаточно только изменений в экспрессии генов (рис.3).

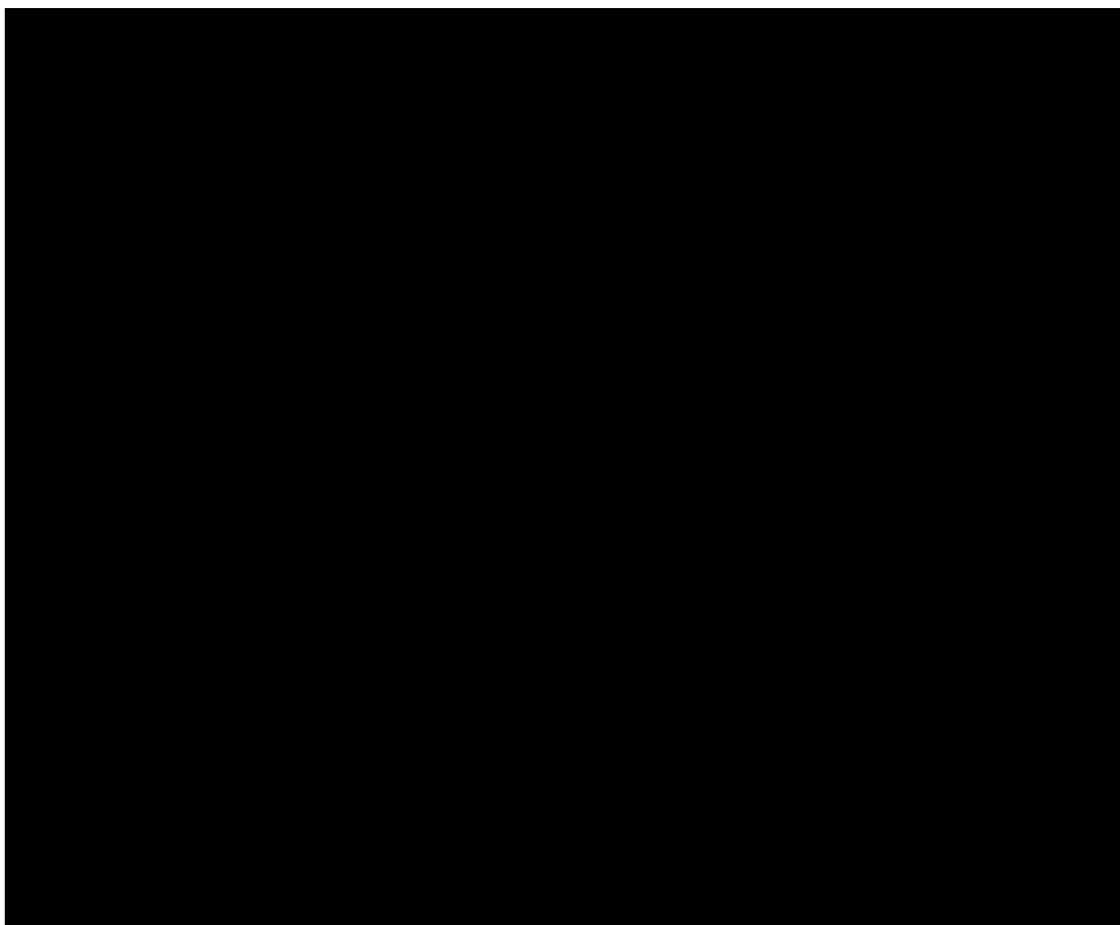


Рис.3. Примеры разных кариотипов. а – нормальный кариотип человека, б – кариотип постоянной клеточной линии человека с маркерными хромосомами, в – кариотип постоянной клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака без маркерных хромосом.

На этапе стабилизации помимо структурных особенностей, каждая клеточная линия также характеризуется выраженной в большей или меньшей степени частотой клеток с модальным числом хромосом, частотами клеток с другими числами хромосом, определенными пределами изменчивости по числу хромосом. Клетки с любым выраженным числом хромосом имеют преобладающий и дополнительные структурные варианты кариотипа (СВК). В клетках с модальным числом хромосом преобладающий СВК называется основным. СВК - это число гомологичных хромосом каждого морфологического типа (рис.3).

Рассмотрим теперь более подробно те закономерности, которые обеспечивают сбалансированность кариотипической структуры клеточной популяции, тем самым, создавая возможность для существования клеточных культур в условиях *in vitro*.

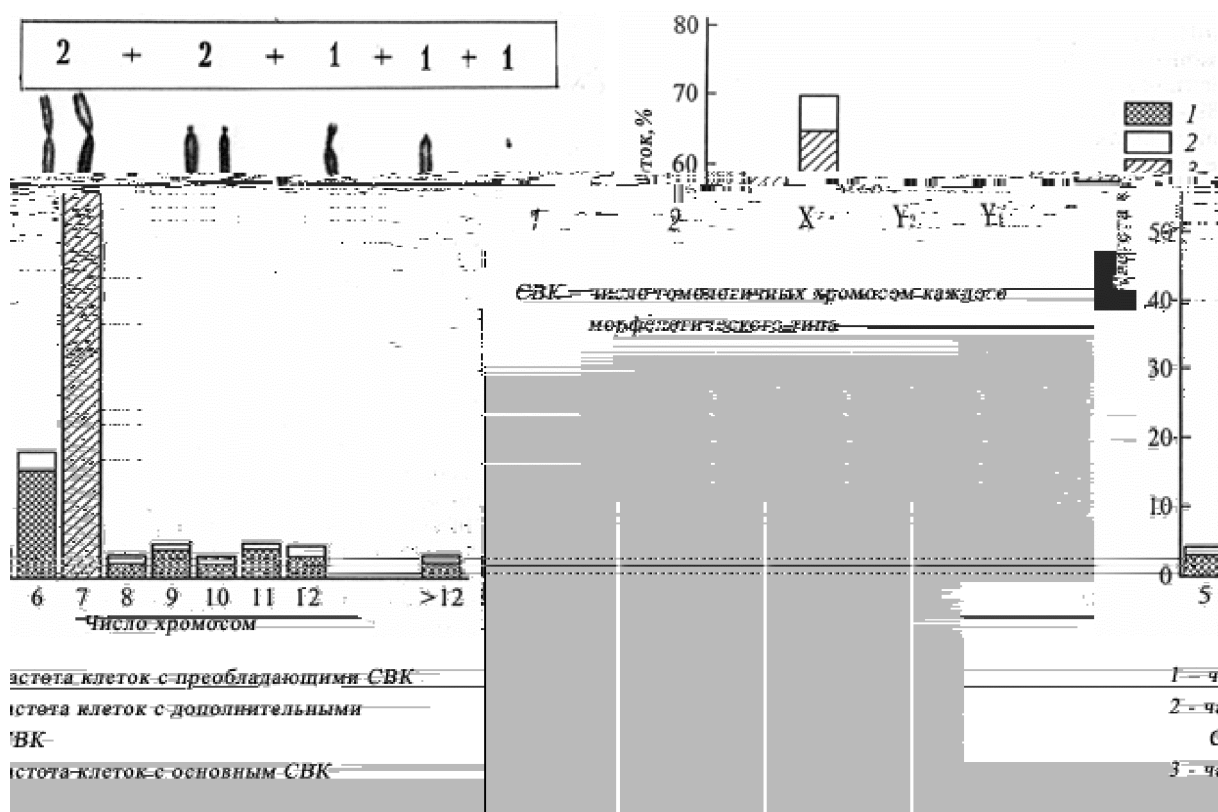


Рис.4 Кариотипическая структура клеточной популяции (фибробласты кожи индийского мунджака, клеточная линия М)

Кариотипическая структура клеточной линии не является совершенно отличной от таковой в организме, из которого она получена. Поэтому изучение закономерностей поведения клеток в культуре способствует пониманию многих процессов, происходящих в организме. Некоторые закономерности кариотипической изменчивости клеток в культуре сходны с таковыми в условиях организма. Приведем ряд примеров.

В опухолевых и лейкозных клетках человека *in vivo* численные и структурные перестройки хромосом не случайны. В условиях *in vitro* сохраняются многие специфические хромосомные перестройки, свойственные тем клеткам в организме, из которых была получена опухоль. Именно: 1) имеют место специфические транслокации между хромосомой 8 и хромосомами 14, 2 и 22, найденные у больных с лимфомой Беркитта и сохраняющиеся в линиях клеток лимфомы Беркитта. Сходство между опухолевыми клетками в организме и полученными из них нейробластоидными линиями состоит в наличии делеций районов короткого плеча хромосомы 1. В большинстве линий мелкоклеточного рака легких наблюдаются делеции районов короткого плеча хромосомы 3, сходные с опухолевыми клетками в организме. 2) Наблюдается неслучайный характер численных и структурных изменений хромосом в линиях разного гистогенеза. Например, в 7 сублиниях карциномы шейки матки человека образование 98 постоянных маркеров связано преимущественно с разрывами в центромерных районах хромосом 1, 3 и 5, реже - хромосом 7, 9, и 10. Картина же распределения точек разрывов при образовании маркеров и редких структурных перестроек в клеточной линии Raji, полученной из В-лимфоцитов больного лимфомой Беркитта, была иной: центромерные районы всех хромосом, за исключением 18-й, не участвовали в образовании маркеров; часто подвергались разрывам хромосомы 8 и 11.

Обнаруживается сходство у опухолевых и лейкозных клеток в организме с клетками постоянных линий человека по многократному копированию хромосомы 7, независимо от гистогенеза неоплазмы.

В клеточных популяциях *in vitro* при длительном культивировании имеет место частая потеря одной из двух половых хромосом. Утрата половых хромосом имеет место и в организме в процессе старения, при разных формах новообразований.

При просмотре около 150 разных линий было обращено внимание на то, что такая кариотипическая характеристика как пределы изменчивости по числу хромосом в большей степени сходна у линий одного тканевого или органного происхождения, чем у линий одного вида. Например, клеточные линии лимфоидного происхождения (лимфобластомы и лимфомы) как человека, так и мыши имеют пределы изменчивости около 5 хромосом; миелоидные клеточные линии, которые получены из миелом - опухолей антителопродуцирующих клеток, являющихся терминальным этапом дифференцировки В-лимфоцитов, имеют большие пределы изменчивости, около 15 хромосом, как у человека, так и у мыши. Линии, полученные из клеток почки разных видов животных (кот, сирийский хомячок, зеленая мартышка, кролик, свинья, кенгуровая крыса, крупный рогатый скот и человек) показывают сходные пределы изменчивости по числу хромосом (5-10).

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 vitro* и *in vivo*.

Рассмотрим характерные черты, свойственные только клеточным популяциям *in vitro*, и нехарактерные для организма в целом. Известно, что окраска хромосом азотнокислым серебром, т.н. серебрение, отражает функциональную активность рибосомных генов, обусловленную как межтканевыми различиями, так и различиями в уровне дифференцировки клеток одного гистогенеза. В организме характер серебрения хромосом сильно варьирует между индивидуумами, клетками разных тканей и одной ткани. А в клеточных культурах имеет место, как правило, постоянство числа, интенсивности серебрения и распределения по хромосомам Ag-позитивных ядрышковых организаторов, что позволяет идентифицировать любую клеточную линию.

Существенно отметить, что на стадии стабилизации, несмотря на разную степень гетерогенности в клеточных линиях, преимущественно наблюдается сохранение хромосомного материала всех аутосом (неполовых хромосом) диплоидного набора данного вида. Это обобщение было сделано на основании идентификации всех маркерных хромосом в большом количестве линий человека и лабораторных животных (мышь, крыса, хомяк). Существенной закономерностью кариотипической изменчивости клеток в культуре, является сохранение, как правило, минимум дисомии по аутосомам. Это не значит, что имеет место наличие всех пар гомологичных хромосом, а это значит, что благодаря разным хромосомным перестройкам, в разных маркерах сохраняются части всех гомологичных хромосом нормального кариотипа. Подобное явление характерно для большинства постоянных клеточных линий. Таким образом, достигается сбалансированность хромосомного набора в постоянных клеточных линиях. Но при этом надо понимать, что функции имеющихся в таких районах генов безусловно изменяются или вообще прекращаются, т.к. при изменении положения генов в хромосомах имеет место известный эффект положения, т.е. происходит адаптация определенного, измененного кариотипа к новым условиям жизни. Становление таких линий достигается, во-первых, путем отбора уже существующей *in vivo* диплоидной стволовой клетки, имеющей преимущества и в условиях *in vitro*; в этом случае иногда могут появляться линии без маркерных хромосом. Во-вторых, имеет место постепенная эволюция (адаптация) исходных гиподиплоидных и других вариантов, в процессе которой происходят определенные структурные и количественные кариотипические изменения.

Учитывая существование как «маркерных», так и «безмаркерных» линий, т.е. рассмотрев все возможные кариотипические варианты постоянных клеточных линий, можно

предположить, что основными элементами, по которым идет отбор при образовании immortalized клеточных линий, являются генные изменения, как структурные, так и эпигенетические, т.е. изменение генной экспрессии без структурных нарушений. Возникающие хромосомные aberrации - лишь инструмент, с помощью которого достигается необходимый для существования клеточной популяции генный баланс. Неважно сколько образовалось в кариотипе хромосом, важно, как в нем функционируют гены.

Очевидно, что клеточная популяция *in vitro* содержит клетки с разными числами хромосом, и только тогда она может существовать. Наглядной иллюстрацией этого утверждения являются эксперименты по клонированию, т.е. получению клеточной популяции из одной клетки. При клонировании очень быстро происходит образование кариотипической структуры схематично представленной на рис.4. Чтобы такая структура популяции образовалась, должны иметь место отклонения по числу хромосом от основного СВК. Закономерности, определяющие кариотипическую структуру, следующие: 1) случайный характер распределения клеток по числу отклонений от основного СВК, 2) специфический характер отклонений каждой хромосомы от основного СВК, 3) наличие связей между отдельными хромосомами при одновременных численных отклонениях. Анализ совместных отклонений по числу хромосом от основного СВК, в результате которых образовались дополнительные СВК, доказал, что существует корреляция между хромосомами, т.е. появление этих СВК случайно. В конечном итоге образовалось несколько постоянных сублиний фибробластов кожи индийского мунджака (рис.5). Следовательно, отбор в клеточной популяции идет не по отдельным хромосомам, а по сбалансированному кариотипу.

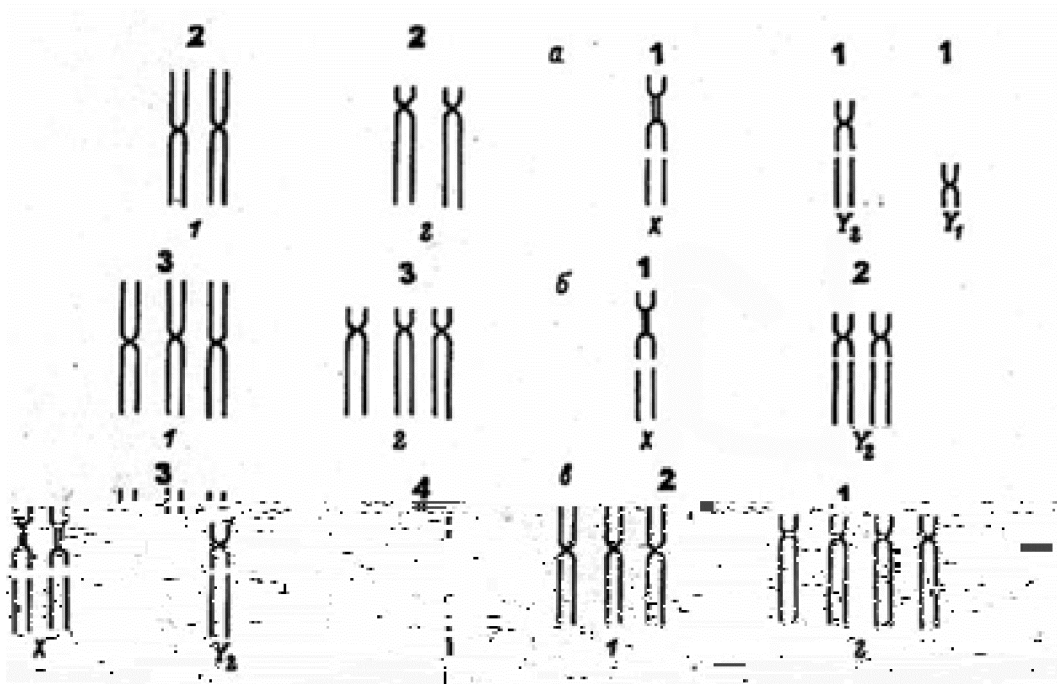


Рис.5 Основные структурные варианты кариотипов (СВК) клеточных линий фибробластов кожи индийского мунтжака:
а – линия М: 2+2+1+1+1, б – линия МТ: 3+3+1+2, в – линия М2: 3+4+2+1

Необходимо еще раз подчеркнуть, что анализ совместных отклонений по числу хромосом от основного СВК свидетельствует о том, что кариотипическая изменчивость в клеточной популяции в значительной степени обусловлена взаимодействием хромосом при добавлениях или потерях их по сравнению с основным СВК. Тем не менее, несмотря на существование общих закономерностей для любых клеточных линий, каждая клеточная линия имеет свои специфические особенности. Например, в каждой линии мунтжака имеет место вполне определенная, отличная от других линий, частота отклонений по числу хромосом от основного СВК, разная частота отклонений по одинаковым хромосомам. Хромосомы имеют тенденцию к разным численным отклонениям в зависимости от кариотипа, в котором они находятся, т.е. прослеживаются определенные ограничения по кариотипической изменчивости (табл.3).

Таблица 3.

Сравнение тенденций по численным отклонениям хромосом в клеточных линиях фибробластов кожи индийского мунржака: М

MT и M2.

Хромосома	M	MT	M2
1	трисомия	дисомия	□исомия
2	три-тетрасомия	дисомия	ди-трисомия
X	дисомия	нуллисомия	Моносомия
Y2	дисомия	моносомия	Дисомия
Y ₁	нуллисомия	—	—

По-видимому, существенным для клеточной популяции *in vitro* является доза функционирующих генов. Возможно, что определенные пределы количественной изменчивости отчасти и отражают это явление. По-видимому, биологический смысл существования определенных количественных характеристик в кариотипической структуре клеточных популяций *in vitro* состоит в том, что анеуплоидия представляет собой одну из форм адаптации клеточной популяции к условиям *in vitro*, которая обеспечивает становление в ней оптимального генного баланса.

Известно, что функционально связанные гены могут находиться в разных хромосомах. В частности, у позвоночных координированная деятельность функционально связанных генов не зависит от их локализации. Так, гены, ответственные за синтез глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГД) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, катализирующие два последовательных этапа в углеводном обмене, находятся у человека в разных хромосомах. В связи с этим действительно возможно, что стабильность кариотипической структуры клеточной популяции, обеспечиваемая, в частности, характером одновременных численных отклонений хромосом, зависит от взаимодействий на уровне функциональной активности генов. Возможно, что пределы количественной кариотипической изменчивости *in vitro* обусловлены

определенной дозой функционирующих генов, продукты которых находятся как в клетках, так и в окружающей их среде, регулируя, таким образом, структурно-функциональную организацию кариотипа клеточной популяции. Известно, например, явление экстракопирования хромосомы 7 во многих постоянных клеточных линиях человека независимо от их происхождения. В этой хромосоме локализовано много генов, в частности, гены рецептора эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, нейросекреторных белков; гены, ответственные за синтез гистонов и за теломеразную активность. Возможно, что увеличение, в частности, копий этих генов способствует повышению селективной ценности таких структурных вариантов кариотипа человека. При длительном культивировании линий ЭСК человека, часто обнаруживаются устойчивые хромосомные изменения. В частности, наблюдается экстракопирование 12 и 17 хромосом. Отмечено, что ЭСК человека, несущие в геноме дополнительные копии этих хромосом, быстро становятся доминирующими в популяции, обладая ускоренным ростом и большей эффективностью клонирования. Известно, что в этих хромосомах локализованы гены, контролирующие процессы самообновления и дифференцировки, усиление экспрессии которых при экстракопировании хромосом является оптимальным для жизнедеятельности этих линий ЭСК.

Клеточные популяции *in vitro* представляют собой автономные системы, которые, достигнув стадии стабилизации, имеют устойчивые характеристики, включая кариотипическую структуру. Тем не менее, клеточные популяции *in vitro* являются динамичными системами, и лишившись многоступенчатого организменного контроля, в значительной степени подвержены влиянию внешних факторов. Под внешними факторами следует понимать как непосредственно те, что постоянно присутствуют при культивировании (культуральная среда, сыворотка, качество

подложки в культуральной посуде, антибиотики в «терапевтических» дозах, используемые для микробной деконтаминации культур, условия криоконсервации и т. д.), так и прочие, которые могут способствовать созданию неблагоприятных условий (бактериальная или микоплазменная контаминация, токсичные дозы антибиотиков и т. д.). Некоторые факторы можно контролировать в процессе культивирования, другие же не поддаются контролю, как, например, качество сыворотки. В связи с этим в клеточных популяциях *in vitro* может усиливаться полиморфизм по некоторым признакам и, в частности, по кариотипическим характеристикам. Причиной наблюдаемой изменчивости являются накапливаемые наследственные изменения под действием меняющихся условий внешней среды. Усиление же кариотипической нестабильности может способствовать изменению других свойств, присущих определенной клеточной линии.

Рассмотрим характер кариотипической изменчивости в клеточных популяциях *in vitro*. Например, при длительном культивировании в течение 70 месяцев было значительно ослаблено свойство злокачественности в клеточных культурах мыши SLU-5 и DMS-402, полученных из плазмоцитомы MORS-21. Изменениям в степени злокачественности сопутствовал ряд нарушений в кариотипической структуре: в частности, наблюдалась структурная перестройка маркера m10. По-видимому, само по себе длительное культивирование может явиться дестабилизирующим фактором, т.к. оно сопряжено с постоянными пересевами клеток, и в связи с этим с нарушением их связи с субстратом, сменой культуральной посуды, ростовой среды и т. д.

Приведем ряд примеров, демонстрирующих кариотипическую изменчивость при изменении условий культивирования. Так, существенным фактором, контролирующим уровень хромосомных нарушений, является определенное содержание водородных ионов в

среде - рН ростовой среды. Нефизиологические значения рН (особенно в кислой области) приводят к увеличению уровня хромосомных aberrаций (кластогенный эффект) в культивируемых клетках. Следует отметить, что пределы рН, оптимальные для размножения клеток, узки и варьируют в зависимости от типа клеток. Например, для клонального роста диплоидных фибробластов эмбрионального легкого человека (WI-38) – оптимальное рН 7.3, а для фибробластов эмбриона цыпленка – 7.1.

В ряде исследований показано генотоксическое действие окислительного стресса на постоянные клеточные линии. Так, при действии кислорода в концентрациях 40-95% на фибробласты легкого китайского хомячка V-79-379А в течение 6 – 96 ч наблюдается значительный кластогенный эффект, ухудшение ростовых характеристик клеток и появление генных мутаций устойчивости к азагуанину. При действии повышенной концентрации кислорода на клетки яичника китайского хомячка СНО-99 имеет место повышенный уровень хромосомных aberrаций; причем 31% всех aberrаций показал разрывы в определенном сайте маркерных хромосом Z3 и Z4. Перемещение этих клеток в нормальную воздушную среду и культивирование в этих условиях в течение 14 сут уменьшило, но не нормализовало уровень хромосомных aberrаций. Известно, что в организме и в клеточных популяциях вне его в нормальных условиях возникают активные формы кислорода (АФК); клетки имеют защиту от чрезмерного повышения уровня АФК за счет веществ – антиоксидантов. Увеличение концентрации атмосферного кислорода увеличивает ту его часть, которая в клетках переходит в АФК, и защитные механизмы не могут справиться с этой опасной для жизни клетки ситуацией. Известно, что АФК вызывают

существенные повреждения ядерной ДНК, а также других биохимических систем клетки.

При кратковременном действии в течение 24 ч пониженной температуры (29°C) на клетки HeLa имели место аномалии митоза, связанные с нерасхождением хроматид в анафазе. Таким образом, изменение условий при культивировании клеток может существенным образом влиять на кариотипическую изменчивость клеточных популяций. При кратковременных, от нескольких минут до нескольких суток, неблагоприятных воздействиях наблюдаются хромосомные aberrации разных типов, но преимущественно разрывы хромосом, а также нарушения митоза. Причем, чем короче длительность неблагоприятного воздействия, тем больше вероятность возвращения кариотипической структуры к норме.

При длительных воздействиях, до нескольких месяцев, разными факторами, как присутствующими при культивировании, так и просто влияющими на жизнедеятельность клеток, наблюдается появление новых устойчивых кариотипических вариантов, включающих новые маркерные хромосомы и новые количественные характеристики. Например: длительное, 1 – 2 года, культивирование клеток сублинии HeLa-20 в атмосфере с повышенным содержанием кислорода в концентрации от 50 до 80% привело к селекции устойчивых клеточных вариантов. В результате возникла новая сублиния HeLa-80. Селекция сопровождалась значительной потерей хромосом; модальное число хромосом снизилось со 112 у HeLa-20 до 84 у HeLa-80. В процессе селекции наблюдалось значительное количество хромосомных aberrаций.

Было изучено влияние разных сывороток на кариотипическую структуру клеточных линий. Показано, что в разных клеточных линиях при длительном культивировании качество сыворотки, зависящее от источника получения и концентрации в среде, оказывает

существенное влияние на скорость кариотипической стабилизации, изменения модального числа хромосом, нарушения в структуре кариотипа, заключающиеся в изменении числа копий нормальных хромосом и в составе маркеров.

Длительное культивирование на среде НМЕМ клеточной линии почки кенгуровой крысы, ранее адаптированной к среде ЕМЕМ, приводит к изменению количественных кариотипических характеристик (изменяется модальное число хромосом). Эти среды различаются по количеству бикарбоната натрия (NaHCO_3), т.е. они имеют разную буферную емкость и потребность в CO_2 .

Культивирование клеток при добавлении в среду терапевтических доз антибиотиков, используемых для предотвращения микробной контаминации, в некоторых случаях может привести к изменению кариотипической структуры.

Клеточные культуры часто подвержены контаминации микоплазмами. Микоплазмы – это мельчайшие, наиболее просто организованные прокариотические организмы, способные к самостоятельному воспроизведению. Микоплазмы имеют ограниченные биосинтетические возможности. В процессе эволюции они приспособились к сосуществованию с клетками эукариот.

Длительная микоплазменная контаминация вызывает образование новых маркеров и изменение количественных характеристик. Показано, в частности, что характер кариотипической изменчивости при микоплазменной контаминации определенным видом микоплазмы (*Acholeplasma laidlawii*) различен в разных клеточных линиях. Так, в неиммortalизованной клеточной линии человека (MRC-5) и в immortalизованных, но не злокачественных клеточных линиях индийского мунджака, китайского хомячка и кенгуровой крысы (M, V-79 и NBL-3-17,) микоплазменная

контаминация либо не вызывает нарушений в распределении клеток по числу хромосом, либо вызывает небольшие, заключающиеся в изменении модального числа хромосом на 1 по сравнению с контролем. Пределы изменчивости по числу хромосом не изменяются. В контаминированных злокачественных клеточных линиях человека (SK-UT-1B и M-HeLa clone11) существенно изменяется характер распределения клеток по числу хромосом. Именно, существенно расширяются пределы изменчивости по числу хромосом по сравнению с контролем: в линии SK-UT-1B (28–55 и 42–48 хромосом, соответственно); в линии M-HeLa clone 11 (25–53 и 47–53 хромосомы, соответственно) (рис. 6). Предположительно, наблюдаемые различия связаны с опухолевым происхождением этих линий и наличием у них свойства злокачественности. Похожие изменения обнаружены при некоторых воздействиях на другие злокачественные линии. В большинстве клеточных линий наблюдается также кластогенный эффект за исключением линии M-HeLa clone11, где он в данных экспериментальных условиях отсутствует.

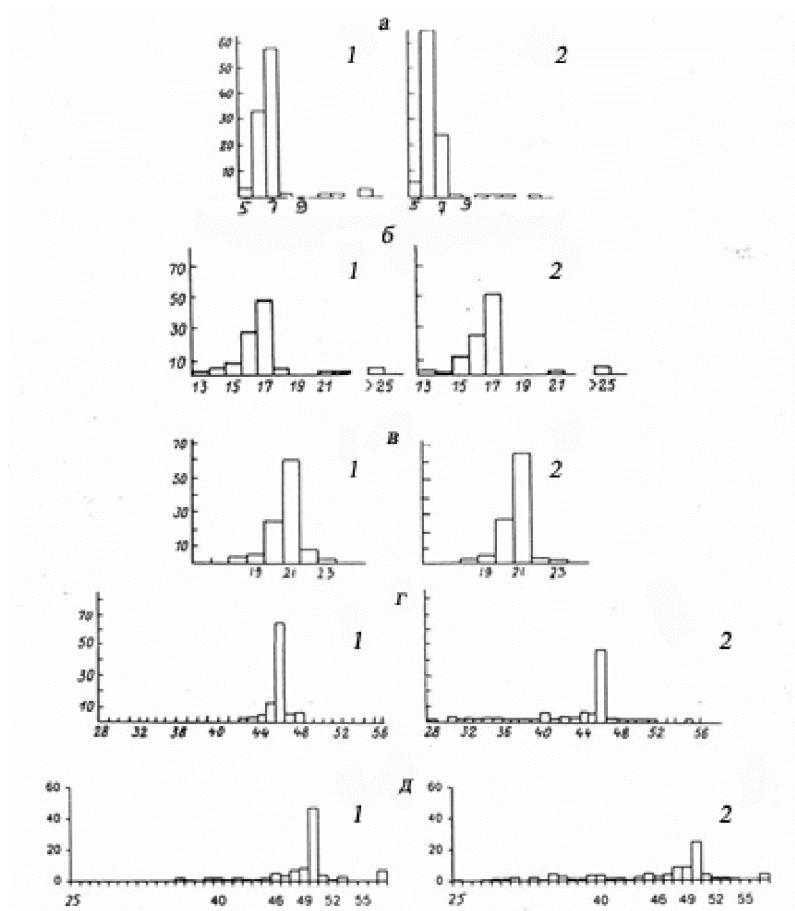


Рис.6. Распределение по числу хромосом клеток линий: М (а); NBL-3-17 (б); V-79 (в); SK-UT-1B (г); M-HeLa clone 11 (д) при длительной микоплазменной контаминации *Acholeplasma laidlawii*. 1 – интактный контроль; 2 – контаминированные клетки

Анализ многочисленных результатов свидетельствует, что генотоксическое влияние выявляется только при удачном сочетании чувствительности клеточной линии, вида и количества микоплазмы, а также оптимальной длительности воздействия.

Смена способа культивирования клеток (статический, роллерный, суспензионный, монослойный) также приводит к изменениям структурных и количественных характеристик кариотипа. Возможно, что именно изменение характера клеточных взаимодействий при смене способа культивирования культуры влияет

на процессы, связанные с кариотипической структурой. Культивирование (кратковременное и длительное) разных клеточных линий на иммобилизованных белках внеклеточного матрикса свидетельствует о существенном влиянии их на характер структурной и количественной кариотипической изменчивости и расширяет тем самым представления о важности этих белков для жизнедеятельности клеток.

Все наблюдаемые кариотипические изменения, связанные с контролируемым варьированием условий длительного культивирования, а также с самой продолжительностью культивирования как индуцирующего нестабильность фактора, выражаются в изменении количественных характеристик кариотипа и в изменении состава маркерных хромосом. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что в «маркерных» клеточных линиях эти характеристики выражают две формы адаптации к условиям *in vitro* или являются инструментами, с помощью которых устанавливается необходимый оптимальный генный баланс в клеточной популяции. В «безмаркерных» клеточных линиях при изменении условий культивирования вместо изменений в составе маркеров, в определенное время при длительном культивировании могут появиться дицентрики, образованные на основе теломерных ассоциаций, т.е. при слиянии теломер. Многолетние исследования свойств дицентриков позволили сделать вывод, что их возникновение является ответом клеточной популяции на неблагоприятные условия культивирования. Таким образом, для «безмаркерных» клеточных линий формами адаптации к условиям существования являются анеуплоидия и дицентрики (теломерные ассоциации), способствующие изменению генной экспрессии (рис.7). При этом при исследовании возможного генотоксического действия разных факторов необходимо одновременно анализировать и количественную и структурную кариотипическую изменчивость как

две стороны одного процесса, в котором эти стороны могут быть как взаимодополняющими, так и взаимозаменяемыми в разных клеточных линиях.

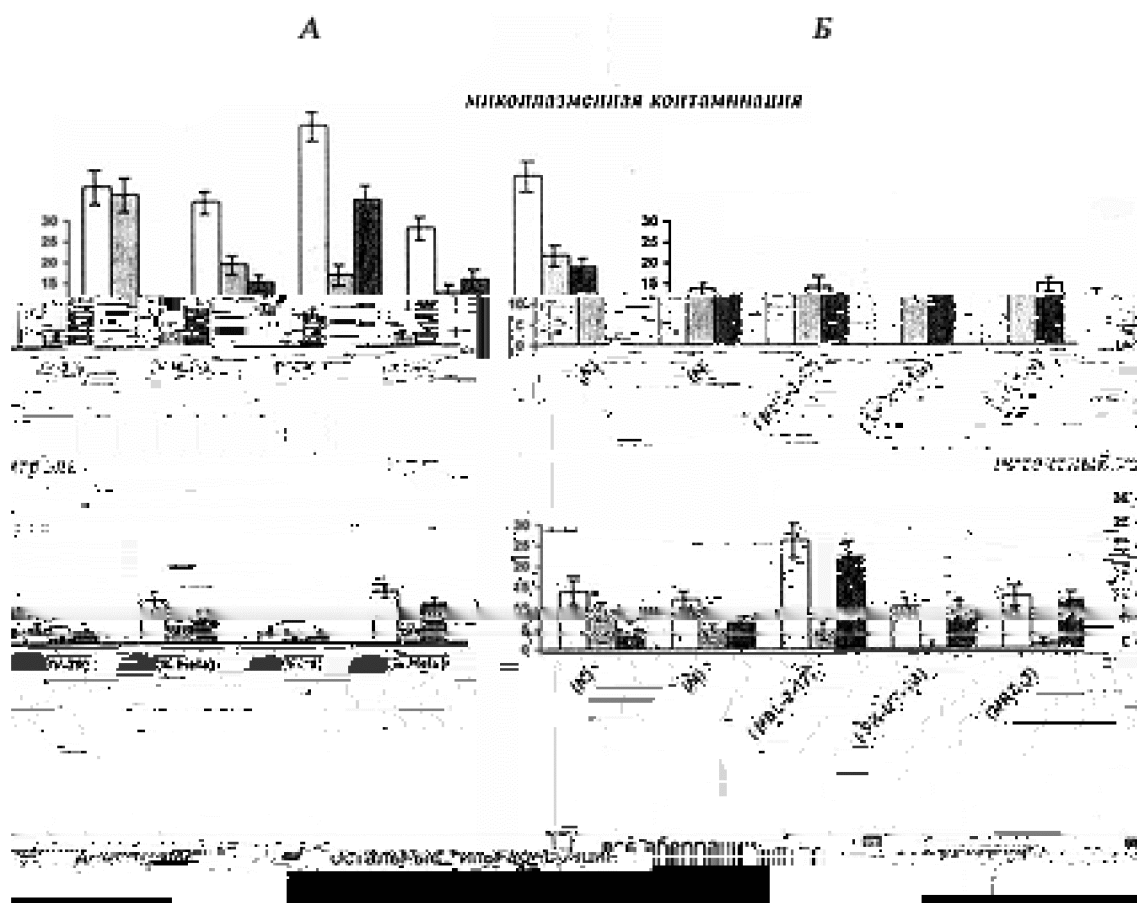


Рис.7 Количество хромосомных aberrаций в «безмаркерных» (А) и «маркерных» (Б) клеточных линиях при длительной микоплазменной контаминации. По оси абсцисс – в скобках аббревиатура клеточной линии, по оси ординат – частота хромосомных aberrаций, %

Усиление любого типа кариотипической изменчивости связано с нарушением сбалансированной кариотипической структуры под воздействием новых условий культивирования и, соответственно, с изменением генной экспрессии, возможно способствующей

нарушению других клеточных свойств. Поэтому при работе с клеточными культурами должны быть приняты меры, позволяющие избегать усиления кариотипической нестабильности.

4. Контаминация клеточных линий микроорганизмами

Заражение (контаминация) перевиваемых клеточных линий различными группами микроорганизмов – одна из основных проблем работы с культурами клеток. Причинами частой контаминации клеток в культуре являются, во многом, очень богатые по составу питательные среды и реагенты, необходимые для культивирования, некоторые компоненты которых, такие, например, как сыворотка крови, трипсин, вода могут сами служить источником инфицирования культуры, как и руки оператора.

Условно можно подразделить микроорганизмы, контаминирующие клеточные линии на две группы: мицелиальные микроорганизмы, дрожжи, а также некоторые виды бактерий вызывающие инфекции, которые легко определяются даже визуально на начальных этапах заражения; вирусы и микоплазмы, вызывающие персистирующие, т.е. постоянные инфекции.

Определение дрожжевой контаминации проводится визуальным путем. Основные признаки – помутнение питательной среды и наличие мелких округлых почкующихся клеток, которые обнаруживаются при микроскопировании. Линии, зараженные микроскопическими дрожжами, подлежат немедленному уничтожению, как и все реагенты, использовавшиеся при их культивировании.

При заражении культур клеток мицелиальными микроорганизмами обнаруживаются тонкие филаментозные нити в среде, плотные скопления спор, кроме того, по причине высокой токсичности данного контаминанта высока доля разрушенных клеток. При обнаружении контаминации клеточной линии мицелиальными

организмами на очень ранней стадии можно подвергнуть клетки обработке амфотерицином В или цистеином. Однако, как правило, такие линии должны быть ликвидированы. Для выявления заражения культуры плесневыми грибами применяются питательная среда Чапека.

Состав среды Чапека: на 1 л H₂O дист

сахароза 30 г

NaNO₃ 3 г

KH₂PO₄ 1 г

MgSO₄·7H₂O 0,5 г

KCl 0,5 г

Агар 1,5% pH 7,2–7,4

Определение заражения бактериальными инфекциями проводится как визуально, так и путем посева на питательные среды для бактерий. Первым признаком заражения является помутнение и изменение цвета среды. При просмотре культур клеток с использованием инвертированного светового микроскопа на большом увеличении (×200 и более) можно обнаружить отдельные бактериальные клетки и различить их морфологию. При бактериальной контаминации также может происходить разрушение клеток.

Для выявления заражения питательных сред и клеточных линий видами бактерий с продолжительным латентным периодом, к которым принадлежат, в частности, микрококки и коринобактерии, рекомендуется инкубировать пробы свежеприготовленных сред в течение ~28 суток, как в термостате, так и при комнатной температуре. Одним из методов проверки питательных сред и сывороток является их использование для культивирования предварительно проверенных клеток. Кондиционированную среду

культур клеток рекомендуется проверять микробиологическим высевам на питательные среды таких фирм как, например, Oxoid, Difco. Основными компонентами этих сред являются тирогликолат, пептон(казеин, на которых растет большинство бактерий. Если испытываемые линии культивировали на средах с антибиотиками, необходимо предварительно провести 4-5 пассажей на среде без антибиотиков. Для предупреждения бактериальной контаминации клетки культивируют на средах с добавлением антибиотиков, чаще всего, гентамицина (80 мкг/мл) или смеси пенициллина (100 мкг/мл) (подавляет грам-положительные бактерии) со стрептомицином (50 мкг/мл) (подавляет грам-отрицательные).

Для проверки контаминации бактериями методом микробиологического высева используется, в частности, среда, содержащая пептон и дрожжевой экстракт.

Состав среды:

Пептон 10 г

Дрожжевой экстракт 5 г

NaCl 5 г

H₂O 1 л

Кроме того, используется жидкая среда для анаэробных бактерий («Биолот») и глюкозопептонная среда Эйкмана («Биолот»):

Пептон 10 г

Глюкоза 5 г

NaCl 5 г

H₂O 1 л

При работе с коллекционными клеточными линиями применение антибиотиков недопустимо, так как клетки культивируются в течение длительного времени с целью наращивания больших объемов для криоконсервации, а антибиотики влияют на генетический аппарат клетки. Кроме того, постоянное культивирование в присутствии

антибиотиков может приводить к появлению резистентных к данному антибиотику видов бактерий. Различные способы борьбы с бактериальной контаминацией также описаны в книге Фрешни (1).

Микоплазмы – мельчайшие организмы, размером около 0,2 мкм, способные к воспроизведению в культуре. Микоплазмы занимают промежуточное положение между вирусами (которые не способны размножаться вне клетки хозяина) и бактериями, от которых их отличает отсутствие клеточной стенки. Микоплазмы имеют очень малый размер генома (в среднем около 1000 нуклеотидных оснований) и, как следствие этого, минимальное количество метаболических путей, что и определяет их зависимость от эукариотической клетки. В то же время, они способны синтезировать большое количество ферментов деградации (нуклеаз и протеаз), что позволяет им отбирать питательные вещества у клетки-хозяина.

В природе все микоплазмы являются факультативными паразитами или комменсалами животных и растений. Комменсализм – форма существования разных видов, при которой один вид живет за счет другого, не причиняя ему в течение длительного времени видимого вреда.

К видам, спонтанно контаминирующим перевиваемые клеточные линии относятся 6 видов рода *Mycoplasma* (*Mycoplasma orale*, *M.salivarium*, *M.hyorhinis*, *M.hominis*, *M.fermentans*, *M.arginini*), а также представители рода ахолеплазм *Acholeplasma laidlawii*. По данным разных авторов уровень зараженности культур клеток в разных лабораториях составляет от 60 до 90%. Помимо того, что микоплазменная инфекция культур клеток может приводить к неправильным результатам при работе с ними и даже полной потере линии, микоплазмы могут изменять свойства клеток, в том числе и те, ради которых линия используется. Характер взаимодействия зависит как от вида микоплазмы-контаминанта, так и от типа клеток. Некоторые микоплазмы вызывают ярко выраженный цитопатический

эффект, проявляющийся в изменении морфологии клеток, что указывает на возможную контаминацию. По данным Говоруна с соавторами (2) в культурах, контаминированных микоплазмой, происходит нарушение метаболических путей, что может приводить к изменениям уровня синтеза белков и РНК. Микоплазмы вызывают нарушение функционирования мембранных рецепторов, что проявляется в неспособности клеток прикрепляться к подложке и образовывать монослой и может служить одним из диагностических признаков контаминации. Присутствие микоплазмы влияет на генетический аппарат клетки-хозяина (3, 4). Аргинин-зависимые микоплазмы активно потребляют его из среды, а недостаток аргинина может вызывать хромосомные абберации у соматических клеток.

При получении гибридом микоплазмы, присутствующие в культурах, влияют не только на выход продукта синтезируемого гибридными клетками, но и могут препятствовать самому процессу слияния клеток.

В свою очередь эукариотические клетки иногда стимулируют появление устойчивости микоплазмы к антибиотикам.

В 1985 году журнал “In vitro” опубликовал требования к авторам работ, выполненных на культурах клеток, а именно, статьи этих авторов должны быть снабжены указанием на отсутствие в культурах контаминации микоплазмами и методов, использованных для ее обнаружения.

Существование более 20 методов обнаружения микоплазм в клеточных культурах отражает, с одной стороны, разногласия в оценке эффективности этих методов, с другой – возможность их применения в зависимости от специализации лаборатории. Практически каждый из этих методов имеет достоинства и недостатки. Так, метод электронно-микроскопического исследования ультратонких срезов клеток весьма трудоемок и требует высокой квалификации сотрудников, в связи с чем, он используется, как

правило, в тех лабораториях, где электронная микроскопия является основным методом. Анализируя культуры клеток на наличие микоплазменной контаминации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) необходимо учитывать, что этот метод не позволяет определить жизнеспособность обнаруженной микоплазмы. Важно подчеркнуть, что при анализе клеток для обнаружения микоплазмы необходимо использовать одновременно не менее 2–3-х методов. Подробное описание методов детекции микоплазмы в клеточных культурах приводится также в статье Миллер с соавторами (5) и в книге Борхсениуса и др. (6).

В Коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) для постоянного контроля используются следующие основные методы: высев на селективные питательные среды, окраска исследуемых линий с помощью флуорохрома Hoechst-33258 (2 – [2-(4-гидроксифенил) – 6 – бензимидазолил] – 6 – (1-метил-4-пиперазил)–бензимидазол–тригидрохлорид) (7) и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Микробиологический высев производится из кондиционированной среды, на которой культивируются клетки. Срок культивирования клеток для анализа не менее 3-х суток. Аликвота кондиционированной среды высевается на две жидких питательных среды для микоплазм. Объем аликвоты определяется объемом среды для микоплазм и обычно составляет 1/5 часть этого объема. Среда для микоплазм разливается в стерильные пробирки, под стерильные резиновые пробки, либо в одноразовые пластиковые стерильные пробирки и в зависимости от размера пробирки составляет 2,5–5,0 мл. Состав среды для микоплазм стандартный, на основе PPLO-триптического перевара бычьего сердца. Обязательными добавками служат лошадиная сыворотка крови и дрожжевой автолизат. При приготовлении сред из сухого порошка PPLO очень важным является использование свежей лошадиной сыворотки. Дрожжевой экстракт в

этом случае можно приготавливать из сухого порошка. В случае использования старой лошадиной сыворотки дрожжевой экстракт обязательно готовится из свежих дрожжей. Использовать приготовленный экстракт желательно в течение не более чем 2-х недель. Готовую среду необходимо держать в холодильнике и использовать в течение 1 месяца. Две основных питательных среды отличаются друг от друга по присутствию в них либо глюкозы, либо аргинина, в соответствии с метаболическими потребностями двух основных групп микоплазм, контаминирующих постоянные клеточные линии. Обязательным компонентом является ацетат таллия для подавления бактериальной контаминации, выявляемой на приведенных выше средах.

Состав жидких сред для определения микоплазменной контаминации:

PPLO-среда для микоплазм

На 100 мл основной среды:

PPLO Broth Difco	1,48 г на 70 мл H ₂ O дист
Дрожжевой экстракт (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

Далее основная среда разливается по 50 мл, после чего в каждую добавляются следующие компоненты: глюкоза – 250 мкл (среда ОХГ, pH 7,2-7,4 доводится 2N NaOH) или 2% раствор аргинина – 500 мкл (среда ОХА, pH 6,0-6,5, доводится 2N HCl).

Наличие или отсутствие роста микоплазм при анализе кондиционированных питательных сред определяется не ранее чем через 3 суток по изменению окраски среды (для чего в нее добавляется индикатор фенол-рот). Глюкозосодержащая среда при наличии в испытуемом растворе микоплазмы приобретает желтый

цвет (кислая реакция среды); аргинин содержащая среда – малиновый, рН сдвигается в щелочную сторону. Необходимо отметить, что при анализе суспензионных линий культуральную среду перед высевом центрифугируют в течение 2–3 минут при скорости 1000 об/мин. То же относится и к кондиционированной среде монослойных клеток, если она содержит большое количество отмерших, открепившихся клеток. В противном случае цвет среды для микоплазм может меняться под влиянием находящихся в ней клеток.

После инкубирования проверяемой суспензии на жидкой среде не менее 7 дней производится высев данной суспензии на агаризованную среду того же состава (глюкоза и аргинин в такую среду уже не добавляются). Также можно не добавлять фенол-рот. Через 3-е суток на твердом агаре определяют наличие или отсутствие микоплазмы (рис.8).

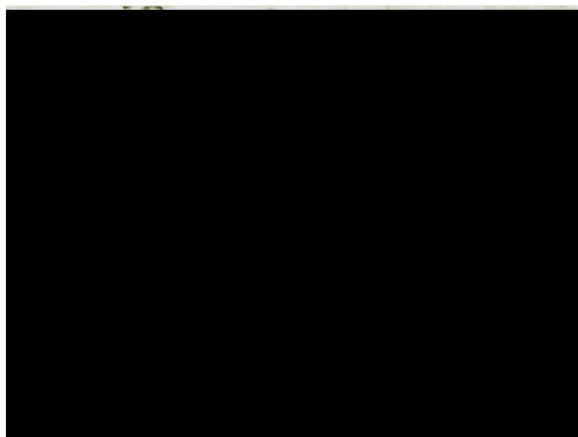


Рис.8 Колонии микоплазмы на твердом агаре

Состав твердой среды для определения микоплазменной контаминации:

Агаризованная питательная среда Хейфлика	200 мл
Дрожжевой экстракт	20 мл
Лошадиная сыворотка	40 мл
2,5% ацетат таллия	6 мл

Определение микоплазменной контаминации также проводится методом окраски Hoechst-33258. Монослойные клетки выращивают на покровном стекле в течение не менее 3-х суток. Плотность посева определяется таким образом, чтобы через 3-е суток клетки на стекле составляли не менее 70% монослоя. На 3–4 сутки клетки фиксируются смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Фиксатор готовят непосредственно перед использованием. В чашку Петри, где находится стекло с клетками, сначала капают 2–3 капли фиксатора, не сливая кондиционированной среды, через 2–3 минуты среду сливают и вновь заливают фиксатор. Через 5 минут фиксатор сливают, стекла высушивают на воздухе, затем окрашивают с помощью флуорохрома Hoechst-33258 в течение 10 минут. После окраски стекла ополаскивают в дистиллированной воде, высушивают на воздухе, и монтируют на предметных стеклах (предварительно обезжиренных спиртом) в капле заключающей среды (Viecteshield) препаратом вниз для микроскопирования. Для исследования суспензионных клеточных линий применяется методика использования контрольных индикаторных клеток. В качестве индикаторных обычно используются монослойные клетки (чаще всего клетки почки зеленой африканской мартышки Vero, или мышинные фибробласты LMTK). Указанные клетки (объем суспензии 1,5 мл) выращиваются в течение суток на покровном стекле, после чего к ним добавляются испытуемые суспензионные клетки (объем суспензии 1 мл). Продолжительность совместного культивирования не менее 3-х суток. Далее фиксация и окрашивание препарата

производится по методике, описанной для монослойных клеток. Необходимость такого анализа суспензионных клеток определяется следующими моментами. При анализе непосредственно на стекле мазка кондиционированной среды суспензионных клеток определение наличия микоплазмы затруднено: 1) наличием большого количества обломков клеток, содержащих фрагменты ДНК, с которой непосредственно взаимодействует флуорохром, дающих большое количество артефактов; 2) малый размер цитоплазмы суспензионных клеток также является препятствием при их анализе, так как местом локализации микоплазмы на клетках, как правило, является их цитоплазматическая мембрана. Совместное культивирование суспензионных и монослойных клеток позволяет микоплазме (в случае ее наличия в испытуемых суспензионных клетках) контаминировать монослойные клетки, на которых ее легче идентифицировать.

Тем не менее, в случае отсутствия возможности использования индикаторных клеток для проверки контаминации суспензионных линий, используется следующий метод (по рекомендации И.В. Раковской, Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея, (Москва): из клеток, отмытых от сыворотки центрифугированием (1,5 тыс. об. в/мин., 3–5 мин.) делают мазки на предметные стекла (обезжиренные 70% этанолом) – споты multiwell, подсушивают на воздухе, фиксируют 96% этанолом, окрашивают ядерным красителем Hoechst и анализируют в люминесцентном микроскопе; параллельно делают микробиологический высев.

Микроскопирование препаратов проводят, используя люминесцентный микроскоп при возбуждении флуоресценции в ультрафиолетовой области спектра (405 нм) на увеличении объектив.×100. 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.9, а, б).

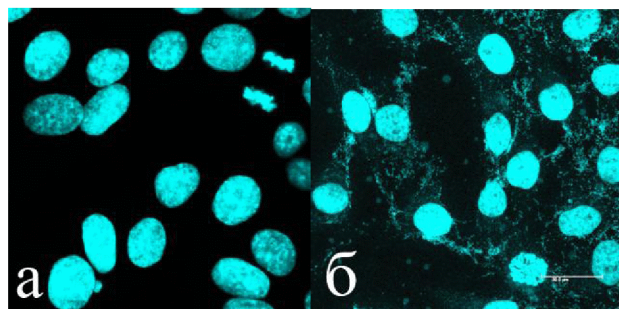


Рис. 9. а – контрольные клетки Vero, б – клетки линии Vero, контаминированные микоплазмой (окраска Hoechst, об. $\times 100$).

0).

Приготовление растворов для окраски:

Основной раствор 1: 5 мг сухого порошка Н-краски разводят в 100 мл р-ра Хенкса (без фенолового красного),

Основной раствор 2: 0,1 мл р-ра 1 разводят в 10 мл р-ра Хенкса,

Рабочий раствор: 0,5 мл основного р-ра 2 разводят в 5мл р-ра Хенкса.

Основной раствор 2 можно использовать в течение одной недели, рабочий раствор готовится непосредственно перед употреблением.

Для определения микоплазменной контаминации клеток методом ПЦР используется тест-система GenePak® *DNA* PCR test (biosom), включающая помимо реактивов положительный и отрицательный контрольные образцы (Prucier et al., 1995). Используются следующие праймеры для определения общей микоплазмы:

GP01 set 1 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3'

MGSO set 1 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'

GP02 nested 5'-B-CTTAAAGGAATTGACGGGAACCCG-3'

MGSO nested 5'-

TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'

С момента обнаружения микоплазм в клеточных культурах в литературе постоянно появляются сообщения о методах деконтаминации. Наибольшее распространение получил метод обработки контаминированных клеток антибиотиками. Деконтаминация в этих случаях заключается в простом культивировании зараженных клеток на средах, содержащих антибиотики. Противомикоплазменным действием обладают антибиотики группы тетрациклинов. В 1988 году Дж. Мовлесом (8) был предложен метод деконтаминации с помощью антибиотика ципрофлоксацина, относящегося к группе фторхинолонов. Обработка фторхинолонами (ципрофлоксацин, ципробай, офлоксацин и др.) широко применяется до сих пор. Однако чаще всего культивирование клеток на средах с антибиотиками приводит к снижению уровня микоплазмы в клетках за пределы чувствительности стандартных методов их выявления, а не к полному их уничтожению. Кроме того, следствием такой обработки является повреждение генетического аппарата клетки-хозяина и быстрое развитие резистентности микоплазм к этим антибиотикам. Многие фирмы выпускают наборы реагентов, специально маркированные «предназначено для деконтаминации *in vitro*». Наиболее известные из них – **MRA (Mycoplasma Removal Agent** фирмы Flow), **ВМ-циклин**, **Сурпробу (Bayer)**. Активным началом в этих препаратах также являются антибиотики. Новым подходом к деконтаминации является предложенное Александровой с соавторами (9) применение принципиально нового препарата – амфипатического пептида мелитина, обладающего антимикробным действием. Мелитин – линейный пептид, состоящий из 25 аминокислот, был выделен из пчелиного яда. При очень высоких концентрациях может

приводить к полному лизису мембран эукариот, поэтому, предполагаемая возможность его применения для деконтаминации от микоплазм *in vitro*, требует целого ряда генноинженерных операций с целью введения гена этого петпида для обеспечения его селективной экспрессии в клетках микоплазм.

В статье Миллер с соавторами (5) даются рекомендации исследователям, работающим с культурами клеток, для предупреждения их контаминации микоплазмами, которые мы приводим здесь полностью.

1. Приобретать клеточные линии из надежных источников, гарантирующих отсутствие микоплазм. Проводить криоконсервацию клеток на первом пассаже.

2. Осуществлять регулярный контроль контаминации. Контаминированные линии по возможности уничтожать.

3. Использовать карантинное отделение для непроверенных линий и, особенно, контаминированных линий. С такими культурами необходимо работать в отдельных боксах. В случае если это невозможно, не использовать один и тот же флакон со средой для культивирования контаминированных и чистых линий; заранее разливать сыворотки и среды небольшими объемами.

4. По возможности применять питательные среды без антибиотиков.

5. Тщательно проверять все ингредиенты сред и рабочие растворы (особенно сыворотки) на контаминацию микоплазмами.

6. Разливать среды и суспензии клеток не через край, а только с помощью пипеток. Использованные пипетки помещать в стакан с гипохлоритом. А культуральную жидкость также сливать в стакан с дезинфицирующим раствором. В настоящее время в качестве дезинфицирующих растворов рекомендуется использовать «Новодез» или «Септоцид Р плюс».

7. После работы тщательно продезинфицировать рабочую поверхность стола, боковые стенки бокса, все предметы, находящиеся

в боксе растворами хлорамина, карболовой кислоты или 70% этанолом. Регулярно контролировать чистоту внутренних поверхностей CO₂-инкубатора. Ввести строгие меры контроля чистоты помещений, находящихся рядом с боксом.

Необходимо также уделять внимание безопасности сотрудников, т.к. работа с перевиваемыми клеточными линиями дает дополнительный риск заражения различными вирусными и микробными агентами. Этот риск особенно велик для оператора при работе с материалами биопсии человека и линиями клеток человека, т.к. известно, что некоторые линии могут быть контаминированы вирусами. Материал биопсии человека может содержать вирус гепатита В, а также вирус иммунодефицита. Для работы с биоптатами тканей человека необходимо использовать ламинарные боксы с вертикальным потоком воздуха. Образцы тканей, включая кровь, никогда нельзя брать от сотрудников своей лаборатории. Операторам необходимо работать в перчатках и, при отсутствии хороших ламинаров, применять защитные маски.

5. Развитие криобиологии, обеспечившее сохранность клеточных линий.

Необычный мир низких температур постоянно привлекает внимание исследователей из самых различных областей знаний и является источником новых идей и открытий. Явления, эффекты и свойства, проявляющиеся в низкотемпературной области, открывают перед учеными и инженерами широкий круг новых возможностей.

Яркую характеристику низкотемпературной области и ее значения для науки дал один из авторитетов в этом вопросе английский физик Фрэнсис Саймон. В своем обзоре низкотемпературных проблем он отметил, что "...это область, в которой человек существенно превзошел саму природу".

Естественно, что эти слова не следует понимать в их буквальном смысле. Дело не ограничивается тем, что человек научился искусственно создавать столь низкую температуру, которая пока что не обнаружена в окружающем нас мире (исключая космическое пространство); ведь установление рекордов не входит в задачу науки.

Достижение низких и сверхнизких температур ценно для нас тем, что в этих условиях мы встречаемся с новыми явлениями и фактами, которые помогают проникать в суть строения материи, позволяют использовать новые методы исследования; наконец, низкие температуры являются важным инструментом технического прогресса, особенно в области новых технологий.

С середины прошлого века сложилось научное направление, связанное с изучением и использованием низкотемпературных систем, причем для его характеристики широко используется термин "криогенный ", введенный известным физиком Камерлинг-Оннесом в 1895 г. при основании им знаменитой Лейденской лаборатории. В этой лаборатории были проведены многочисленные исследования свойств различных веществ при низких температурах, а, также, был ожижен последний из " постоянных " газов - гелий, температура кипения которого при нормальных атмосферных условиях - 269 °С. Сжиженный водород, например, был получен в 1898 г. Д. Дьюаром при достижении им температуры -253 °С. Кстати, используемый в биологии и медицине в качестве доступного и безопасного хладагента жидкий азот имеет температуру кипения -196 °С. В переводе с греческого термин " криогенный" означает "производящий холод"; с тех пор он служит для определения всей широкой области получения и применения низких температур. Тогда же в международной практике термин "криогенная техника" стал применяться почти исключительно для области температур сжижения атмосферных газов.

Когда же возникает необходимость определить биологу, что такое низкие температуры, холод, он встречается с большими трудностями. Физическое определение холода чисто условное, так как оно заключается в степени близости теплового состояния материи к температуре абсолютного нуля (-273°C) или точке замерзания воды (0°C). Биологические объекты, начиная от биоценозов и видов и кончая биологически важными химическими соединениями, по-разному реагируют на степень отклонения температуры от абсолютного нуля, а также от 0°C , хотя вода в живых системах составляет основную массу вещества. Часто с представлениями о холоде связываются температуры ниже зоны комфорта человека. В таком случае можно было бы принять, что низкими температурами следует считать те, которые ниже оптимальной адаптивной температурной зоны для организма или вида и которые вызывают специфическую реакцию биологической системы независимо от температурной шкалы.

Исходя из этого, для организма, обитающего в горячем источнике, температура, например, 40°C может считаться холодной, а для высокоарктических видов морских беспозвоночных температура 5°C будет высокой. Как видим, критерий адаптированности не разрешает затруднений в определении того, что принято считать "низкими" температурами.

Поэтому необходимо условиться, что имеется в виду в биологии, когда речь идет о низких и сверхнизких температурах. Отрицательные или субнулевые температуры следует разделить на три области:

1) низкие температуры от 0 до -20°C , при которых еще возможна клеточная активность; в этой области обычно наблюдается переохлаждение;

2) весьма низкие температуры в условиях Земли - от -20 до -80°C , при которых живые системы (за исключением теплокровных

животных) находятся в анабиотическом и преимущественно в замерзшем состоянии, эту область можно также отнести к критической, или наиболее опасной для жизни. Возможность по желанию прерывать жизнь, приводить ее в скрытое состояние и вновь оживлять видимо мертвое тело так заманчива, настолько граничит с чудом и рождает столько пока несбыточных надежд на удлинение жизни, на отдаление смерти, что вполне понятно то увлечение, с которым было встречено в начале прошлого века открытие П.И. Бахметьевым анабиоза у насекомых и млекопитающих.

3) ультранизкие (или сверхнизкие) температуры, отсутствующие на Земле, - ниже 80°C , при которых возможна более или менее полная консервация биологических объектов.

Вряд ли можно назвать экологический фактор, который бы на Земле оказывал столь мощное влияние на пойкилотермные организмы, как низкие температуры. Только тропическая область планеты, если еще исключить ее высокогорные районы, свободны от действия этого фактора. Поэтому необходимость в изучении действия охлаждения на биологические объекты очень велика и не требует особых доказательств.

Так сформировалась криобиология и криомедицина - сравнительно молодая отрасль биологии, предметом изучения которой является действие низких температур на объекты животного и растительного мира.

Развитию криобиологии и криомедицины способствовали фундаментальные разработки физики низких температур, а также достижения в биологии, медицине, химии, биотехнологии, криогенном машиностроении и других областях науки и техники.

В настоящий момент успехи криобиологии тесно соприкасаются с углублением понимания принципов морфофункциональной организации, метаболических циклов, углублением процессов жизнедеятельности на основе новых идей молекулярной и клеточной биологии.

Характер изменений в биологических структурах при действии охлаждения и замораживания - основной вопрос криобиологии.

Следует отметить, что общие закономерности клеточного и тканевого кристаллообразования зависят от структуры и функции их образования.

Максимальное сохранение функциональной способности тканей и органов при охлаждении и замораживании в настоящее время является первостепенной задачей. Эти вопросы могут быть решены лишь на основе всестороннего исследования действия низких температур на клетки, новых биологических подходов, что позволит ближе подойти к пониманию основных процессов, протекающих в живых биологических объектах в условиях глубокого холода.

Принято считать, что возникающие при замораживании биологических систем фазовые превращения и концентрационные градиенты приводят к появлению следующих процессов:

- 1) разрушению биологических мембран при температурах от 0 до -11 °C - "температурный шок";
- 2) кристаллизации внутри- и внеклеточной воды при фазовом переходе, вызывающей механические разрушения клеток;
- 3) росту кристаллов льда и повышению концентрации электролитов в оставшейся жидкой фазе, что приводит к денатурации белков;
- 4) потере "структурированной" воды биомакромолекулами и необратимыми изменениями биоструктур (дегидратация);
- 5) рекристаллизации, приводящей к механическим разрушениям клеток, при хранении биологических объектов в условиях температур выше -130 °C;
- 6) изменению морфо-функциональной структуры клеток вследствие обменных процессов, идущих при длительном хранении биологических объектов даже в зоне низких температур.

Всесторонне изучая механизмы криповреждений и криозащиты, разрабатывая на этой основе необходимые и достаточные условия эффективного низкотемпературного консервирования биообъектов, криобиология обеспечила решение основной своей задачи - разработку и внедрение в практику высокоэффективных методов глубокого охлаждения и долгосрочного хранения биологического материала. Низкотемпературное консервирование - многоэтапный и многофакторный процесс, при котором биологические объекты подвергаются действию разных физико-химических факторов

.Главную роль в организации криповреждений и обеспечении выживаемости клеток при замерзании играет скорость охлаждения биологического материала. Обычно, в криобиологии помимо точных определений скорости изменения температуры в эксперименте, выраженных в градусах за единицу времени, охлаждение характеризуют как медленное, быстрое, сверхбыстрое и т.д.

Вот как выглядит принятое основной массой криобиологов классификация скорости охлаждения:

- 1) очень медленное . Скорость процесса до 10 град в час и медленнее;
- 2) медленное; скорость процесса от 10 град в час до 10 град в мин;
- 3) быстрое; скорость процесса от 10 до 60 град в мин;
- 4) очень быстрое; скорость процесса до 100 град в сек;
- 5) сверхбыстрое; скорость процесса свыше 100 град в сек.

Для 1-й группы характерно замерзание вне клеток с образованием крупных, быстро растущих кристаллов льда, имеющих неустойчивую форму. При медленном охлаждении, с одной стороны, возможна адаптация к температуре, а с другой - для более чувствительных объектов - повреждение холодом в результате его

длительного действия. В меньшей степени эти же факторы могут иметь значение во 2-й группе скорости охлаждения. В 3-й группе происходит преимущественно внутриклеточное замерзание; скорость охлаждения слишком велика для возникновения закаливания и для развития повреждений. Преобладает образование кристаллов кубической и радиальной волокнистой структуры. При еще более быстром охлаждении (4 группа) кристаллы образуются всегда внутри клеток, исключая наиболее мелкие клетки с большой проницаемостью для воды, например эритроциты. При этом размеры образовавшихся внутриклеточных кристаллов, как правило, очень малы. В 5-й группе мгновенное охлаждение вызывает значительную аморфизацию, вследствие чего клетки прозрачны и повреждаются в наименьшей степени.

Следует отметить, что в мировой практике в основном применяются методики криоконсервирования биоматериала с медленными скоростями охлаждения. Считается, что внеклеточные кристаллы льда менее травматичны для клеток, чем внутриклеточные, образующиеся обычно при быстрых темпах понижения температуры. Обычно используемый исследователями способ замораживания биообъектов (в первую очередь, культур клеток и тканей) представляет собой двухэтапный метод криоконсервации, предложенный еще в начале шестидесятых годов японским криобиологом Е. Асахино. Данная методика заключается в том, что консервируемый материал в диапазоне температур от $+20^{\circ}\text{C}$ до -40°C охлаждается медленно (1град/мин), а затем до температур кипения жидкого азота -196°C - быстро (до 10-15 град/мин). В последующие годы этот метод не раз подвергался различным модернизациям (использование в зоне фазового перехода автосиндинга - искусственного инициирования льдообразования, коррекция температурных границ для темпов скоростей охлаждения объектов), но суть его остается прежней.

Однако при сверхбыстром замораживании вода превращается не в кристаллический, а в аморфный или стеклообразный лед, который не изменяет структуру клетки, и поэтому сохраняет ее жизнеспособность. К сожалению, это открытие сохраняет свое значение в значительной степени в теории, но не в практике

криобиологии. Витрифицировать с требуемой скоростью более или менее крупные клетки их популяции практически невозможно. Однако в криокомплексе Отдела клеточных культур Института цитологии РАН был разработан метод сверхбыстрого охлаждения биологических объектов с использованием в качестве хладагента азота в шугообразном состоянии. Шугообразный азот - смесь твердой и жидкой его фаз, имеющая температуру -215°C со специальной консистенцией, что обеспечивает чрезвычайно высокий градиент замораживания.

Теоретической основой использования эффекта витрификации биообъектов при исполнении способа их сверхбыстрого охлаждения в шугообразном азоте является следующее: при быстром погружении объекта в азотную шугу выделяемое им тепло расходуется на плавление твердой фазы смеси. Жидкий азот, получаемый в результате такого расплавления, в свою очередь, охлаждается окружающей его шугой. Поэтому он не успевает достичь точки кипения и, соответственно, не образует газового пузыря вокруг объекта. При замораживании образца в жидком азоте газовый пузырь, препятствуя теплоотдаче, снижает скорость охлаждения объекта, по меньшей мере, до $1000 - 1500^{\circ}\text{C/сек}$. При погружении объекта в шугообразный азот скорость его охлаждения максимальна. Она зависит только от величины объекта, находясь в обратной пропорции от нее. Поэтому градиент замораживания биоматериала в шугообразном азоте находится в пределах $(3-10) \times 10$ град/сек. Этот градиент установлен с помощью современного оборудования и подтвержден проверочными теплофизическими расчетами. Благодаря этому методу удалось впервые криоконсервировать ранее безуспешно замораживаемые крупные одноклеточные организмы.

Важнейшим условием обеспечения успешного криоконсервирования биоматериала является введение в среду замораживания криопротекторов, веществ, в значительной степени защищающих охлаждаемые объекты от губительного влияния ультранизких температур. Высокие криопротекторные свойства выявлены у большого количества спиртов, сахаров, синтетических веществ. На сегодняшний день наиболее универсальным криопротектором считается диметилсульфоксид (ДМСО), хотя он

обладает умеренным токсическим эффектом на животные и растительные организмы. При подготовке суспензии с клетками к замораживанию в криоконсервационную среду обычно добавляют 5-10 % ДМСО, однако надо иметь в виду необходимость отмывки размороженной суспензии от криопротектора. Длительный контакт ДМСО с биоматериалом крайне не желателен. К сожалению, предлагаемые сегодня безопасные, не требующие отмывки криопротекторы существенно уступают диметилсульфоксиду в защитных свойствах. Методами ЯМР высокого разрешения установлено, что криопротекторы защищают макромолекулы при замораживании в значительной мере путем образования непрерывной сетки водородных связей между молекулами криопротектора и воды, причем резко снижаются осмотические градиенты солей за счет активного образования комплексов с электролитами и другими биологически важными ионами.

В цикле "охлаждение-отогревание" или "замораживание-оттаивание" клетка проходит все этапы повреждения и восстановления; они представляют одну цепь, одну систему криогенных процессов. Потому для обеспечения жизнеспособности биообъектов при криоконсервировании необходимо неукоснительно следовать правилам деконсервации или размораживания. Оптимальным методом был и остается способ деконсервации в водяной бане с интенсивным перемешиванием теплоносителя в течение 1-2 мин. Для разных видов животных и растительных объектов температура воды может варьироваться от + 37 °С (для культур клеток животных и человека) до +12 °С (для клеток морских беспозвоночных). Практическим воплощением достижений теоретической и прикладной криобиологии является создание и успешное функционирование криобиологических банков, где проводятся работы по низкотемпературному консервированию различных биологических объектов, и обеспечивается их длительное

хранение в атмосфере жидкого азота. То есть, криобанком является комплекс оборудования для обеспечения процесса криоконсервации, длительного хранения и реализации биологического материала, а также для криобиологических исследовательских работ. Оборудование криобанка можно разделить на две основные функциональные части, состав которых зависит от целевого назначения проводимых работ.

1. Аппаратура для подготовки и криоконсервирования материала - здесь наряду с общелабораторным оборудованием и специальным, ориентированным на объект работы, основную роль играет программный замораживатель, осуществляющий регулируемое, контролируемое, протоколируемое и воспроизводимое серийно охлаждение биообъекта до заданной температуры. Кроме него для работ по криоконсервированию необходимы сосуды Дюара, обеспечивающие программный замораживатель жидким азотом и используемые для транспортировки данного хладагента или криоконсервированного материала.

2. Аппаратура для обеспечения длительного хранения криоконсервированных биообъектов в атмосфере сжиженного азота - комплекс сосудов Дюара большого объема (от 100 до 1000 л), называемых обычно криохранилищами. Для обеспечения надежности сохранения материала криохранилища в ряде случаев оборудуют системами сигнализации уровня жидкого азота, контроля температурных параметров, влажности и оксигенации. Некоторые крупные криобанки оснащены холодильно-газовыми установками для получения жидкого азота в целях автономного и бесперебойного функционирования всех звеньев данного подразделения.

Криобиология как системная наука возникла в послевоенное время, когда роль низких температур стала приобретать во многих

отраслях практических знаний большое значение, и для использования низких температур потребовалось знание механизмов повреждаемости и причин устойчивости не только к природным, но и к сверхнизким температурам, создаваемым искусственно. Вследствие этого стало необходимым изучить причины различной холодоустойчивости на организменном, клеточном и молекулярном уровнях и ее возникновение. Эти задачи выдвинули строго научную проблему взаимосвязи криоанабиоза с происхождением жизни и возможностью ее продления в различных экологических системах и позволили поставить вопрос о потенциальном бессмертии, хотя бы в теоретическом плане.

Вместе с тем на основе фундаментальных исследований расширяется диапазон прикладных разработок. Методы криоконсервации отдельных объектов: клеток крови, костного мозга, спермы крупного рогатого скота и других животных, созданные в системе специализированных учреждений и служб, применяются в банках замороженного биологического материала.

В настоящее время разрабатываются и успешно внедряются в практику методики криоконсервирования таких ранее проблемных биообъектов, как гранулоциты, тромбоциты, ряд простейших и водорослей, эмбрионы и эмбриональная ткань - богатый источник региональных стволовых клеток, изучение и использование которых открывают новые перспективы в прикладной криобиологии и медицине. Важным аспектом прикладной криобиологии является разработка методов криоконсервации лечебных и профилактических сывороток, иммунокомпетентных клеток, клеток крови.

Весьма перспективной областью криобиологии является создание методов криоконсервации репродуктивных клеток - спермиев и зигот различных животных, птиц, рыб, а, также, человека. Решение этой проблемы имеет большое хозяйственное значение,

поскольку позволяет сохранять высокопродуктивные породы сельскохозяйственных животных, увеличить стада промышленных видов рыб и сохранить генофонд исчезающих видов животных, во многих случаях преодолевать проблемы женского и мужского бесплодия. Началом новой эры в искусственной репродукции человека считается рождение 25 июня 1978 г. Луизы Джой Браун, как первый случай оплодотворения яйцеклетки человека вне организма с последующей успешной имплантацией в матку. Сейчас в мире функционируют сотни, если не тысячи научных центров по внедрению методов искусственного оплодотворения, включая использование криоконсервированных биоматериалов.

Сложные проблемы предстоит решить при консервации органов, особенно с использованием низких температур, поскольку разработать эффективную методику низкотемпературного консервирования этих объектов пока не удается как в нашей стране, так и за рубежом.

Очень важной является проблема низкотемпературной консервации культуры клеток растительных тканей и использование их для селекции высокопродуктивных сортов.

Для целей микробиологической промышленности разрабатываются способы низкотемпературной консервации клеток культур тканей, а также, методы длительного хранения микробов, используемых при производстве энтомопатогенных препаратов, повышающих эффективность борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений. Разработаны методы криоконсервации штаммов-продуцентов антибиотиков и биологическиактивных веществ.

В медицинской практике значительное развитие получила проблема криоконсервации кожи, роговицы, некоторых других тканей.

Достижения криомедицины привели к существенным успехам в лечении патологических, преимущественно опухолевых образований методом криодеструкции.

Криобиология одно из самых молодых "дочерних" ответвлений науки о жизни. В то же время применение холода для сохранения того, что может поддерживать жизнь (сохранение пищи) старо, как само человечество. Потребовалось многовековое развитие культуры, науки и техники, нужны были тысячелетия, чтобы можно было реально поставить вопрос о сохранении холодом не только пищевого материала для поддержания жизни, но сохранения и самой жизни. Так родилась основная движущая проблема криобиологии, науки, которая в своем развитии вносит новые аспекты во многие области биологии, расширяя наши представления о возможностях жизни, границах ее проявления, механизмах возникновения и развития.

6. Коллекции клеточных культур

Развитие наиболее важных и перспективных фундаментальных и прикладных исследований в области молекулярной и клеточной биологии, генетики, эмбриологии неразрывно связано с широким использованием культур клеток человека, животных и растений.

Такие центральные общебиологические проблемы как дифференцировка, канцерогенез, клеточная подвижность, пролиферация, передача наследственной информации, регуляция экспрессии генов и другие решаются, в основном, на клеточных культурах. Клеточные культуры имеют также большое значение для решения прикладных задач медицины, сельского хозяйства, биотехнологии и биологической промышленности. К основным задачам следует отнести массовое промышленное производство вакцин и физиологически активных соединений, получение моноклональных антител методами гибридомной технологии, лечение тяжелых заболеваний методами генотерапии и клеточной заместительной терапии, повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и выведение новых сортов растений, сохранение биоразнообразия генофонда путем криоконсервации соматических и половых клеток животных и растений.

Клетки в культуре подвержены высокой наследственной изменчивости при длительном культивировании под действием меняющихся условий внешней среды. Но в большинстве случаев невозможно определить, изменение каких конкретных свойств имело место. Поэтому при работе с клеточными культурами должны быть приняты меры, позволяющие **избегать усиления генетической нестабильности. Успешное сохранение исходных или направленно измененных** характеристик клеточных линий, а также

получение воспроизводимых экспериментальных результатов достигается путем соблюдения строго выдерживаемых условий культивирования и криоконсервации клеточных культур. Поддержание исходных клеточных свойств и контроль их состояния осуществляют Национальные коллекции разных стран, создание которых происходило, в основном, во второй половине 20 века.

Наиболее крупной мировой коллекцией является Американская коллекция типовых культур (ATCC). Создана Европейская коллекция клеточных культур животных. Бурное развитие биоиндустрии и стремительно возрастающая ценность клеточных линий с сопутствующим ограничением международного распространения клеток, имеющих практическое применение, стимулировало создание в течение последних десятилетий ряда новых Национальных коллекций клеточных культур в Германии, Англии, Японии, Китае, Франции, Италии, Дании. Таким образом, Национальные коллекции становятся сейчас областью государственных и деловых интересов.

В 70-х годах 20 века в период бурного развития молекулярной и клеточной биологии, молекулярной генетики и биотехнологии выявилась невозможность интенсивного развития в нашей стране исследований с широким использованием клеточных культур в связи с отсутствием централизованной коллекции клеточных линий и с отсталостью материально-технической базы. Существовавшие в отдельных институтах коллекции клеточных культур были невелики по объему, а по способу организации не предназначены для обеспечения клеточным материалом ведущихся в стране исследований. Клеточные линии и штаммы, хранившиеся в коллекциях, были, как правило, недостаточно охарактеризованы. В 1978 году на уровне Государственного комитета Совета Министров СССР по науке и техники и Президиума Академии наук СССР было

принято решение о создании Всесоюзной коллекции клеточных культур путем организационного объединения уже имевшихся в отдельных институтах коллекций человека, животных и растений.

Объединение существующих небольших коллекций на основе сохранения автономности имело важный практический смысл. Оно позволило в результате длительной совместной работы выработать общую стратегию и тактику развития Коллекции, ревизовать имевшийся в фондах коллекций клеточный материал, унифицировать требования к паспортизации, контролю качества и хранению клеточного материала на уровне современных международных требований (за основу была взята АТСС), а также разработать общие правила работы с клеточными культурами.

Сохранение специализированных коллекций при научных учреждениях соответствующего профиля, располагающих высококвалифицированными специалистами в соответствующих областях биологии, медицины и сельского хозяйства, позволило с самого начала поддерживать высокий профессиональный уровень сотрудников коллекций. Кроме того, это обеспечило тесную связь коллекционной работы с фундаментальной наукой и с разработками новых наукоемких клеточных технологий.

В настоящее время Российская коллекция клеточных культур человека, животных и растений состоит из 9 специализированных коллекций.

6.1. Коллекция культур клеток позвоночных –

Центральный банк Российской коллекции клеточных культур.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Профиль коллекции: Постоянные клеточные линии человека и животных. Изучение фундаментальных основ биологии клетки в культуре. Исследование влияния факторов внешней среды на изменчивость клеточных линий, на изменение кариотипа. Выведение новых клеточных линий, создание гибридом. Депонирование

клеточных культур человека и животных, имеющих промышленное значение. Создание банка клеток для целей клеточной заместительной терапии. Выпуск каталогов Российской коллекции и осуществление информационной службы совместно с Межрегиональной общественной научной организацией «Ассоциация специалистов по клеточным культурам».

6.2. Специализированная коллекция генетически - трансформированных корней высших растений.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва.

Профиль коллекции: Поддержание в культуре генетически трансформированных корней ценных лекарственных и сельскохозяйственных растений с целью их использования в качестве источника физиологически активных веществ, для изучения взаимодействия с везикулярными микоризными грибами и для сохранения генофонда редких и исчезающих растений.

6.3. Специализированная коллекция клеток высших растений.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва.

Профиль коллекции: Получение клеточных линий из растений редких, имеющих узкий ареал распространения и исчезающих видов; линии, представляют собой модельные системы с маркерными признаками, и штаммы-продуценты вторичных метаболитов, в том числе фармакологического профиля. Изучение криоустойчивости растительных клеток и роли осмотических повреждений в процессе глубокого замораживания. Разработка методов криоподготовки и криоконсервации клеточных культур. Селекция и отбор штаммов - сверхпродуцентов.

6. 4. Специализированная коллекция перевиваемых соматическихклеток позвоночных.

Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, Москва.

Профиль коллекции: Клеточные линии человека и животных, используемые в области вирусологии и медицины. Выведение новых линий, чувствительных к вирусам. Разработка условий культивирования для производства вакцин.

6. 5. Специализированная коллекция диплоидных клеток человека и животных для исследований в области вирусологии.

Научно-исследовательский институт гриппа РАМН, Санкт-Петербург.

Профиль коллекции: Сбор, поддержание и выведение новых культур диплоидных клеток для исследования взаимодействия вирусов с клеткой. Разработка методов тестирования вирусов, производства вакцин и диагностических препаратов.

6.6. Специализированная коллекция соматических клеток человека от больных наследственными заболеваниями.

Институт биологии развития РВН. Москва.

Профиль коллекции: Цитогенетический анализ клеток человека с хромосомными аномалиями и от больных наследственными заболеваниями. Использование культур для выявления молекулярных механизмов различных наследственных заболеваний.

6.7. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных медицинского назначения.

Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций Роспотребнадзора Минздравсоцразвития РФ, Екатеринбург.

Профиль коллекции: Обеспечение вирусологических исследований, производства и контроля иммунобиологических препаратов. Выведение новых линий, чувствительных к вирусам, для производства вакцин.

6.8. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных.

Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко РАСХН, Москва.

Профиль коллекции: Кариотипирование культур клеток, разработка методов диагностики контаминантов и деконтаминации клеточных линий. Получение новых гибридных и генетически трансформированных линий клеток.

6.9. Специализированная коллекция постоянных линий клеток беспозвоночных.

Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко РАСХН, Москва.

Профиль коллекции: Коллекция содержит клеточные линии насекомых, используемых для исследований в области генетики соматических клеток, вирусологии, криобиологии, а также как тест-системы для экологического цитомониторинга. Разработка криобиологических технологий для сохранения гамет, соматических клеток и целых эмбрионов, необходимых для поддержания биоразнообразия редких и исчезающих видов, а также уникальных генетически чистых линий насекомых.

Работа, выполняемая с 1978 г. по настоящее время, по созданию и развитию Российской коллекции клеточных культур состояла из следующих разделов.

1. Создание, непрерывное поддержание и развитие фондов коллекции путем сбора, выведения, паспортизации и хранения клеточных линий человека, животных и растений.

2. Разработка единых требований к качеству коллекционного клеточного материала, единых паспортов, методов анализа, хранения и контроля клеточных линий.

3. Совершенствование методов ведения коллекции и работы с клеточными линиями на основе проведения многолетних научных исследований, посвященных: изучению влияния условий культивирования, криоконсервации и контаминации на генетическую изменчивость клеточных линий; получению новых клеточных линий и гибридом; разработке новых методов криоконсервации; селекции клеточных линий, имеющих промышленное значение; разработке бессывороточных сред.

4. Депонирование уникальных клеточных линий и гибридом, патентуемых в связи с их практической ценностью.

5. Создание информационных баз данных по клеточным культурам и постоянно действующей службы информации путем ежегодного издания информационного бюллетеня «Клеточные культуры».

6. Обеспечение образцами стандартного и полностью охарактеризованного клеточного материала фундаментальных и прикладных биологических, медицинских, сельскохозяйственных и биотехнологических исследований страны, а также биологической и медицинской промышленности России.

7. Оказание научно-методической помощи сотрудникам научных учреждений страны по методам культивирования и анализа клеточных линий путем проведения кратковременных и длительных стажировок в базовых коллекциях, а также путем издания методических руководств, проведения конференций, совещаний и школ.

Работа по созданию Всесоюзной коллекции клеточных культур была начата с ревизии фондов специализированных коллекций, которая показала, что в них не было ни одной клеточной линии, полностью охарактеризованной по международным стандартам. Только 38 линий можно было считать условно коллекционными, так как они были охарактеризованы лишь по некоторым характеристикам. Остальной клеточный материал совершенно не удовлетворял требованиям, предъявляемым к коллекционным линиям. Таким образом, первоочередными задачами коллекции были паспортизация имеющихся клеточных линий и расширение коллекционных фондов.

Пополнение и расширение фондов Коллекции осуществлялось разными способами: путем приобретения клеточных линий из Американской коллекции типовых культур (ATCC) или фирм посредников Gibco и Flow Laboratory, на основе обмена линиями с другими Национальными коллекциями, передачи в Коллекцию

авторских линий из научных лабораторий и, наконец, путем выведения новых линий непосредственно в специализированных коллекциях. Были налажены постоянные связи с Американской (ATCC), Немецкой (DSM), Болгарской, Английской и Итальянской коллекциями клеточных культур.

Анализ поступающих в Коллекцию клеточных линий показал, что только линии, приобретенные в Национальных коллекциях, соответствуют указанным в паспорте характеристикам. Культуры клеток, прошедшие через исследовательские лаборатории, как правило, теряют исходные характеристики вследствие произвольного изменения условий культивирования и хранения. Ввиду отсутствия постоянного контроля качества культур клеточные линии оказываются зараженными микоплазмой или контаминированы клетками другого происхождения. Так, в начале деятельности Коллекции из 95 проверенных клеточных линий 88 оказались зараженными микоплазмой. В связи с этим был разработан следующий порядок введения в фонды Коллекции нового клеточного материала. Все вновь поступающие линии выдерживают в карантине в течение времени, необходимого для определения чистоты культуры. Затем клетки размножают и закладывают на хранение до тех пор, пока они не будут полностью охарактеризованы согласно пунктам разработанного международного паспорта. После осуществления паспортизации клеточные линии переходят в разряд коллекционных и становятся доступными для потребителя.

Расширение фондов Коллекции определялось, в первую очередь, запросами фундаментальных исследований, потребностями биомедицинской промышленности и практическими задачами здравоохранения.

Так, например, в период расцвета биотехнологии основное внимание Коллекции было сосредоточено на приобретении и выведении клеток животных и растений-продуцентов биологически активных веществ. В связи с этими задачами в Коллекции были получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела для диагностики и терапии опасных заболеваний человека, Разработке исследований по Государственной научно-технической программе «Геном человека» способствовало значительное расширение спектра линий клонированных из разных тканей человека. Необходимость обеспечения санитарно-гигиенических качественным клеточным материалом индуцировало получение новых линий и клонов, пригодных для выявления вирусных заболеваний.

В последние годы в Коллекции развернуты работы по созданию новых наукоемких клеточных технологий для терапии обширных повреждений органов и тканей человека, неподдающихся традиционным методам лечения.

□ На настоящее время в фондах Российской коллекции клеточных культур содержится 2700 клеточных линий, из которых около 40% являются уникальными, полученными в Российской Коллекции клеточных культур. Около 700 референтных клеточных линий и гибридом депонировано в связи с их патентованием.

В задачу Коллекции входит не только сбор и обеспечение сохранности клеточных линий, но и их подробная характеристика или паспортизация. Паспортизация осуществляется на клетках ранних пассажей после размораживания криоконсервированного клеточного материала. В РККК создан единый паспорт, соответствующий международным требованиям с некоторыми модификациями для соматических клеток человека, животных и растений.

6.10. Пример паспорта клеточных линий человека

HL-60

Происхождение: человек, периферическая кровь, промиелоцитарная лейкемия.

Nature 1977. 270: 347-349; Blood 1979. 54: 713-733; Цитология 1992. 34: 123; Атлас хромосом постоянных линий человека и животных, С.Е. Мамаева, 2002. М. Научный мир.

Морфология: гимфобластоподобная

Способ культивирования: суспензионный

Условия культивирования: среда - RPMH 1640 (для инициации роста можно использовать Iscove's MDM)

сыворотка - эмбриональная бычья 20%

процедура посева кратность посева 1:2, оптимальная плотность $1.0-5.0 \times 10^5$ клеток/мл

криоконсервация - ростовая среда, 5% DMSO, $3.0-5.0 \times 10^6$ клеток/мл в ампуле

Жизнеспособность после криоконсервации: 80% (окраска трипановым синим на нулевом пассаже)

Контроль контаминации: бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены

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

Кариология: $2n=46$, пределы изменчивости по числу хромосом 43-47, модальное число хромосом 45, количество маркеров - 7 (дифференциальная окраска), в клетках наблюдались двойные минихромосомы, количество полиплоидов 3%.

Эффективность клонирования: не клонируется (ATCC)

Туморогенность: опухоленогенны в мышах nude

Другие характеристики:

чувствительность к вирусам: вирус иммунодефицита человека 1, вирусу Т-клеточной лейкемии человека 1.

Изоэнзимы G6PD, B; PGM1,1; PGM3,1; ES D, 1; Me-2,1; AK1, 1; GLO-1,1.

Тест розеткообразования с эритроцитами: E, 4%; EA, 17%; EAC, 1%.

Область применения: дифференцировка, фармакодинамика, канцерогенез.

Коллекции: ATCC CCL 240; ECACC 8 112500; DSM ACC 3; IBLC HTL 95010; ИНЦ РАН.

Рассмотрим подробнее характеристики, входящие в паспорт коллекционной клеточной линии.

А. Жизнеспособность клеток после их размораживания, которая определяется числом клеток, выживших после криоконсервации. Жизнеспособность клеток устанавливают по эффективности клонирования, по окрашиванию витальными красителями и по скорости увеличения клеточной массы в процессе культивирования.

Б. Морфология клеток в культуре и способ культивирования. В зависимости от тканевого происхождения морфология или тип роста клеток в культуры будет разный. Основными типами роста являются фибробластоподобный, эпителиоподобный, нейробластоподобный и лимфобластоподобный (гл.4, рис.1). Первые три типа культур относят к монослойному способу культивирования, т.е. клетки прикрепляются и распластываются на поверхности культуральной посуды, а последний тип относится к суспензионному или полусуспензионному способу культивирования, т.е. клетки растут в суспензии, иногда частично прикрепляясь, но, не распластываясь на субстрате. Морфология документируется микрофотографиями живых или фиксированных культур.

В. Видовая идентификация клеточных линий. В условиях культивирования клетки 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. Так, при цитогенетическом обследовании фондов Американской коллекции клеточных культур было обнаружено, что некоторые постоянные клеточные линии являются дериватами одной из самых распространенных линий человека – HeLa (карцинома шейки матки).

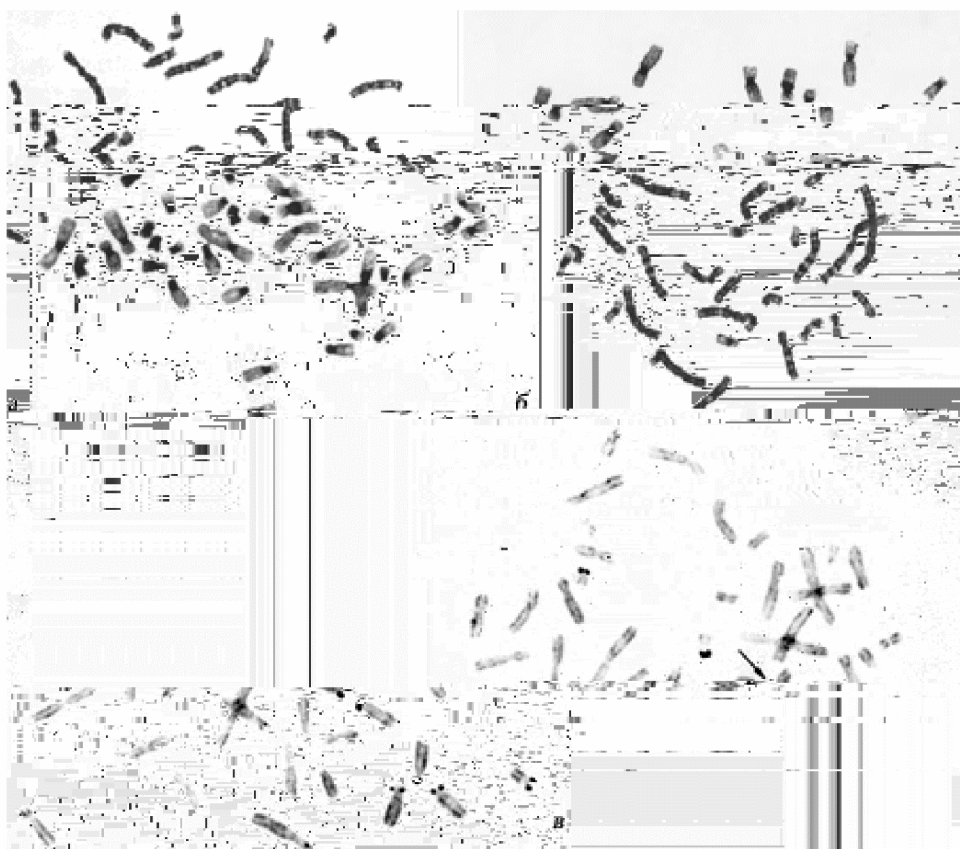


Рис. 8 Дифференциальные окраски хромосом человека

а – G-окраска; б – C-окраска; в – Ag- окраска

Первым методом определения видовой идентичности является подробный кариологический анализ, позволяющий с помощью дифференциальных окрасок хромосом определить

видоспецифичность данной клеточной линии. Рассмотрим часто используемые виды дифференциального окрашивания (рис.8).

Дифференциальная окраска на G-диски является наиболее распространенным и информативным из всех методов дифференциального окрашивания. С его помощью определяют гомологи нормальных хромосом, структурно перестроенные хромосомы, а также происхождение маркерных хромосом. Дифференциальное окрашивание на C-диски выявляет структурный гетерохроматин. Дифференциальное окрашивание хромосом с помощью нитрата серебра позволяет выявить специальные участки хромосом – ядрышковые организаторы, активно синтезирующие рибосомную РНК. Все 3 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. На рис.9 приведен характер C и Ag окрашивания хромосом, способствующий определению видовой принадлежности клеточных линий.

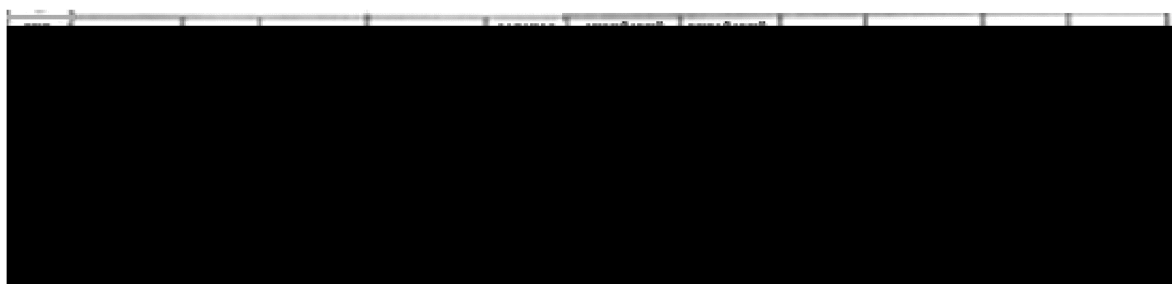


Рис.9 Характер C- и Ag- окрашивания хромосом ряда видов, способствующий определению видовой принадлежности клеточных линий (Мамаева, 1988).

Вторым, используемым для этой цели методом, является изоферментный анализ, основанный на разной электрофоретической подвижности определенных ферментов у разных таксономических групп животных и человека. Для тестирования используются изоферменты: лактатдегидрогеназа и глюкозофосфатдегидрогеназа.

Г. Кариологическая характеристика. Помимо необходимости использования кариологического анализа для определения видоспецифичности, каждая клеточная линия должна иметь полную кариологическую характеристику, которая строго специфична для каждой линии и включает: определенный спектр перестроенных (маркерных) хромосом или отсутствие таковых; модальное число хромосом, пределы изменчивости по числу хромосом, количество полиплоидов. Исходя из специфичности кариологической характеристики каждой клеточной культуры, в ряде случаев кариологический анализ может помочь не только в видовой идентификации, но и в идентификации конкретной линии.

Д. Контаминация культур микроорганизмами. Эта характеристика является первой и решающей для дальнейшей судьбы клеточной линии. Проводится исследование культур на присутствие грибов, бактерий, микоплазм, вирусов. Определение наличия контаминаций представляет для коллекций особую важность, так как в них культивирование клеточных линий ведется в отсутствие антибиотиков. Присутствие грибов и бактерий определяется обычными и широко распространенными микробиологическими методами.

Наибольшую опасность для клеточных культур представляют микоплазмы. Во многих случаях контаминация такого рода протекает бессимптомно. Тем не менее, латентное присутствие микоплазм существенно влияет на метаболизм клеток, вызывает хромосомные aberrации и изменяет клеточные функции. Основные методы выявления микоплазм следующие: микробиологический

высев на селективные питательные среды, окраска клеток флуорохромами Hoechst 33258, Dapi или оливомицином, автордиография, электронная микроскопия и ПЦР анализ. Большую трудность представляло выявление вирусов в коллекционных линиях. Эта работа была проведена на основе сотрудничества с высококвалифицированными специалистами и осуществлялась с помощью электронной микроскопии.

Кроме перечисленных основных характеристик в паспорте приводятся данные, представляющие большую важность для исследователей, пользующихся Коллекционными линиями. К ним относятся:

- а) условия культивирования (тип питательной среды, сыворотки и другие компоненты, необходимые для конкретной линии клеток);
- б) среда для замораживания, способ и режим криоконсервации, тип криопротектора;
- в) чувствительность к вирусам;
- г) специфические особенности линии, включающие эффективность клонирования, туморогенность, наличие биохимических и генетических маркеров.

Таким образом, каждая, поступающая в Коллекцию клеточная культура, тщательно анализируется по многим параметрам, прежде чем ее включают в состав коллекционных линий.

В 1987 году Государственным институтом патентной экспертизы была обоснована необходимость патентования штаммов культивируемых клеток животных и растений, представляющих практическую ценность для народного хозяйства. В число патентуемых клеточных линий входят: клетки-продуценты биологически активных веществ; клетки, используемые для производства иммунобиологических препаратов и диагностикумов, а также гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, которые широко применяются в научных исследованиях и в

практической медицине. Все патентуемые линии должны быть депонированы в одной из официальных коллекций для хранения и выдачи образцов референтных штаммов.

В качестве официальных депонирующих организаций для клеточных культур человека и животных были утверждены две коллекции Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур: Коллекция культур клеток позвоночных (ИНЦ РАН) и специализированная Коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных (СХЖ РАСХН). Начиная с 1988 года, Коллекция регулярно принимает на депонирование патентуемые клеточные линии и гибридомы. В обязанность Коллекции входит прием, регистрация и криохранение депонированных штаммов, которые должны обладать высокой жизнеспособностью и стерильностью. Коллекция обязана проверять жизнеспособность культуры в течение 30 лет с момента выдачи патента. С 1988 до 2010 год в Коллекции депонировано более 700 гибридом и авторских клеточных линий.

Фонды Коллекции содержат большое количество разных по своим свойствам клеточных культур. Поэтому клеточный материал широко используется для решения разнообразных фундаментальных и прикладных задач биологии, биотехнологии, вирусологии, медицины и сельского хозяйства. Обеспечение научных и производственных организаций стандартным и всесторонне охарактеризованным эталонным клеточным материалом является одной из главных задач Российской коллекции клеточных культур. По официальным запросам учреждений Коллекция предоставляет образцы клеточных линий человека, животных и растений. Образец клеточной культуры представляет собой 1 или 2 пластиковых флакона, содержащих от 3 до 10 млн. клеток. Запросы на клеточные культуры поступают из разных городов России и стран ближнего и

дальнего зарубежья. Услугами Коллекции пользуются более 270 научных учреждений разных ведомств из разных городов России и стран ближнего и дальнего зарубежья. В частности, Коллекция культур клеток позвоночных ИНЦ РАН ежегодно выдает около 200 клеточных образцов.

Многоплановая деятельность РККК не может быть осуществлена без создания системы информации. С 1986 года издано 27 выпусков Информационного бюллетеня «Клеточные культуры». В бюллетене регулярно даются сведения о составе фондов Коллекции, о новых поступлениях клеточных линий, о новых методах культивирования клеток животных и растений, а также о других вопросах технологии культивирования клеток и о разрабатываемых научных проблемах.

Создана информационная база данных по клеточным линиям, имеющимся в фондах Коллекции. В 1991 году был выпущен первый Каталог клеточных линий Всесоюзной коллекции клеточных культур. В 1999 году вышел из печати расширенный Каталог Российской коллекции клеточных культур в двух томах на русском и английском языках. Каталог был переиздан в 2004 году в связи с большим спросом на представленную в нем информацию. Данные о фондах Коллекции размещены в Интернете на сайте Института цитологии РАН: www.cytspb.rssi.ru; эти данные периодически обновляются. Также данные о фондах Коллекции есть в каталоге Европейского общества тканевых культур (ETCS) на сайте www.rccc.cytspb.rssi.ru.

Информация о клеточных линиях Коллекции опубликована в Международном Каталоге клеточных линий: «Human and animal cell lines catalogue», 1993(Interlab project), а данные об имеющихся в Коллекции гибридах включены в Международную базу данных Всемирной Федерации коллекции культур.

В заключение рассмотрим перспективы дальнейшего развития Российской коллекции клеточных культур. В последние годы интересы фундаментальной и прикладной науки в области клеточной биологии и биотехнологии постепенно смещаются в область изучения и использования стволовых и дифференцированных клеток в культуре. Одним из перспективных и интенсивно развивающихся направлений биомедицинских исследований является лечение серьезных заболеваний человека путем замены поврежденных клеток нормальными или путем улучшения микроокружения поврежденных тканей за счет продукции стволовыми клетками цитокинов и паракринных факторов.

Широкое использование методов клеточной заместительной терапии и генотерапии требует создания банка нормальных клеток человека для их размножения и последующей трансплантации. Представляется перспективным создание профилактических банков нормальных клеток человека от людей, профессия которых связана с высокой степенью риска. Американская коллекция клеточных культур, например, получила в 1996 году от Национального института здоровья США грант размером в 3 миллиона долларов на создание коллекции нормальных клеток человека для трансплантаций.

В последние годы стало очевидным, что успешное развитие биомедицинской промышленности требует создания специальных посевных банков клеток, используемых для производства иммунобиологических препаратов. Аналоги таких банков существуют, но они не совершенны, и их фонды должны по своему уровню соответствовать качеству клеточных линий Российской коллекции клеточных культур.

Для решения проблемы сохранения биоразнообразия необходимо осуществлять направленное получение клеточных линий от редких и исчезающих видов животных и растений. Решение этой проблемы, однако, требует больших затрат на создание специальных передвижных экспедиционных лабораторий клеточных культур.

Необходимо продолжать развивать методы получения постоянных клеточных линий морских беспозвоночных. Несмотря на большие успехи в криоконсервации растительных клеток и тканей, число культур, выдерживающих замораживание, еще не велико и требует продолжения работ в этом направлении.

Большие перспективы открываются в области использования иммортализованных клеток с направленно вызванными генетическими изменениями для изучения механизмов экспрессии генов и для получения клеток продуцентов биологически активных веществ.

Таким образом, перед Российской коллекцией клеточных культур раскрываются широкие перспективы дальнейшего развития и практического использования результатов ее деятельности в фундаментальной науке, в здравоохранении и в биологической промышленности.

7. Эмбриональные стволовые клетки человека.

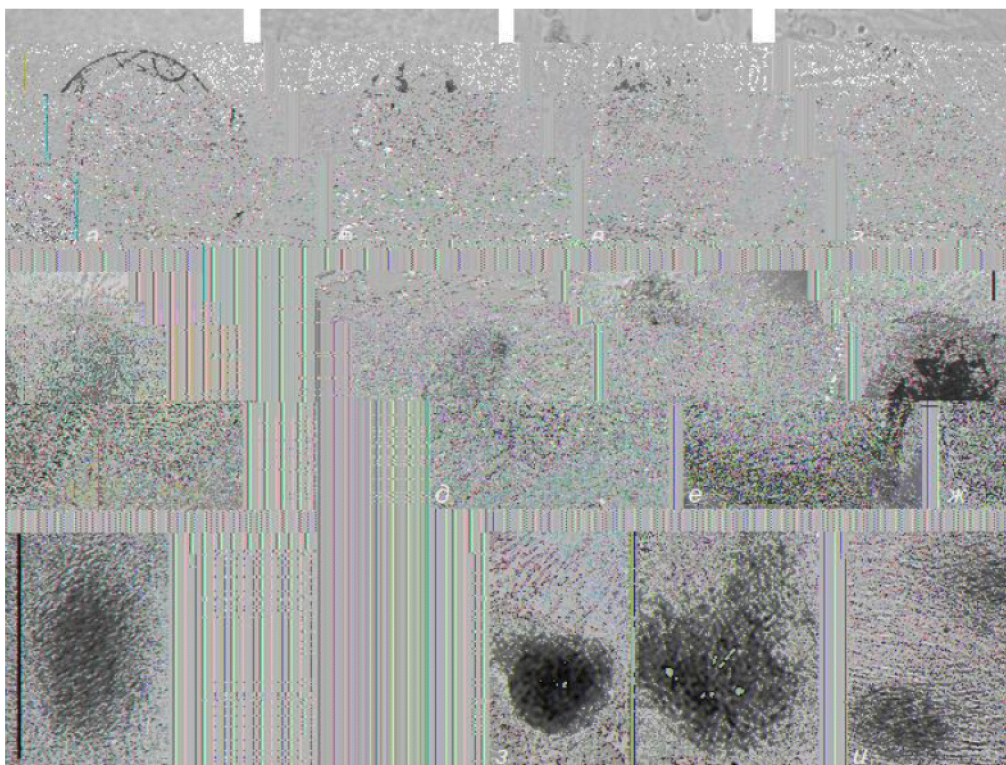


Рис.10 Начальные стадии получения линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека.

а – бластоциста перед выделением внутренней клеточной массы (ВКМ); б – ВКМ сразу после выделения из бластоцисты механическим способом; в–е – ВКМ после выделения через 1 ч, 1, 2, 4 сут соответственно; ж–и – разный тип колоний ЭСК на 1, 3 и 10 пассажах соответственно.

Открытием последних лет явилось получение нового типа клеточных линий, называемых линиями эмбриональных стволовых клеток. Эти линии стоят особняком от остальных постоянных клеточных линий. Источником их получения являются ранние эмбриональные клетки, не позднее стадии бластоцисты. Источником получения большинства остальных постоянных клеточных линий являются клетки, составляющие уже вполне определенные ткани либо

эмбриона, либо взрослого организма. Промежуточное положение занимают линии тератокарцином и эмбриональных герминативных клеток, полученные из зародышевых половых клеток различных стадий развития. Стадия бластоцисты – это 4–6 сут после начала развития эмбриона (рис.10).

В бластоцисте находится внутренняя клеточная масса, состоящая из плюрипотентных клеток, которые образуют собственно зародыш. На рис. 1 представлены начальные стадии получения ЭСК человека. Тип роста ЭСК отличается от других клеточных линий. Из рисунка видно, что клетки растут колониями, которые могут быть многослойными или плоскими. Существенным свойством этих линий является то, что колонии неоднородны, в них есть как плюрипотентные ЭСК, так и клетки, находящиеся в начале дифференцировочного процесса, т.н. прогениторные клетки. Соотношение этих типов клеток существенно зависит от условий, в которых культивируются клетки. Плюрипотентные ЭСК морфологически представляют собой мелкие, плотно упакованные в колонии клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением.

Что же такое эмбриональные стволовые клетки? Это клетки млекопитающих, изолированные из морулы или бластоцисты. Недавно удалось получить ЭСК из единичного бластомера до стадии морулы. Стволовые клетки – это уникальные клетки, обладающие способностью к быстрому размножению и к дифференцировке в клеточные элементы, образующие разные ткани. Эти клетки содержат программу всего онтогенеза. Что такое плюрипотентные клетки и чем они отличаются от других клеток? Различают 3 типа стволовых клеток по их потенциям в развитии: тотипотентные – это клетки, которые способны обеспечить развитие целого организма из одной клетки (зигота и бластомеры первых делений дробления); плюрипотентные – это клетки, способные дифференцироваться во все типы соматических клеток и в половые клетки, но теряющие

способность образовывать целый организм из единственной клетки; мультипотентные клетки – это предшественники разных тканей, т.е. тканеспецифичные клетки. К ним можно отнести клетки некоторых постоянных клеточных линий и стволовые клетки взрослого организма.

Любые стволовые клетки являются уникальными клеточными популяциями не только потому, что они обладают способностью к дифференцировке, но и потому, что обладают еще и способностью к самообновлению, т.е. к активной пролиферации. Надо отметить, что в организме в нормальных соматических клетках, как и в неиммортизированных культурах, еще в эмбриональном развитии активность теломеразы идет на убыль и довольно быстро прекращается совсем, т. е., в отличие от раковых, бессмертных клеток, нормальные, смертные клетки не имеют активной теломеразы. Использование чувствительных методов исследования показало наличие низкого уровня теломеразной активности у стволовых клеток взрослого организма. Эти клетки находятся в разных тканях, в частности, в костном мозге (гематопоетические и мезенхимные предшественники), в мужской генеративной ткани, в базальном слое эпидермиса и в волосяных фолликулах, в эпителии кишечника, в нервной ткани и т.д. Стволовые клетки взрослого организма необходимы для периодической замены отмирающих соматических клеток или в некоторых экстремальных ситуациях, в частности, при инфекциях, травмах или большой потере крови. В клетках-предшественниках в периоды пролиферативной активности может увеличиваться теломеразная активность, но она недостаточна для того, чтобы стабильно поддерживать теломерную длину и тем самым избежать репликативное старение. Таким образом, стволовые клетки взрослого организма стареют, благодаря постепенному укорочению теломер.

Это надо учитывать при подборе доноров для клеточных трансплантаций. Что касается раковых клеток, то они приобретают свойство иммортальности, сопровождающееся высокой теломеразной активностью и удлинением теломер. Возникнуть они могут как из стволовых, так и из соматических клеток.

Линии ЭСК млекопитающих и человека, в отличие от линий стволовых клеток взрослого организма изначально являются immortalized. Впервые линии ЭСК человека были выделены из внутренней клеточной массы предимплантационных бластоцист, полученных при искусственном оплодотворении, в 1998 году. В настоящее время в разных странах мира, включая Россию, имеется уже более 600 постоянных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека. На рис.11 схематично представлено получение и дифференцировка плюрипотентных ЭСК.

Основные характеристики этих линий следующие: 1) неограниченная пролиферация клеток, значительно превышающая 60 удвоений клеточной популяции (число Хейфлика) при отсутствии периода репликативного старения; 2) поддержание высокой теломеразной активности, обеспечивающей стабильную длину теломер, необходимую для поддержания пролиферативной активности; 3) наличие нормального кариотипа; 4) экспрессия специфических поверхностных эмбриональных антигенов и экспрессия транскрипционных факторов Oct-4 и Nanog; 5) способность к ненаправленной дифференцировке в производные трех зародышевых листков и в линию половых клеток *in vitro* и *in vivo*.

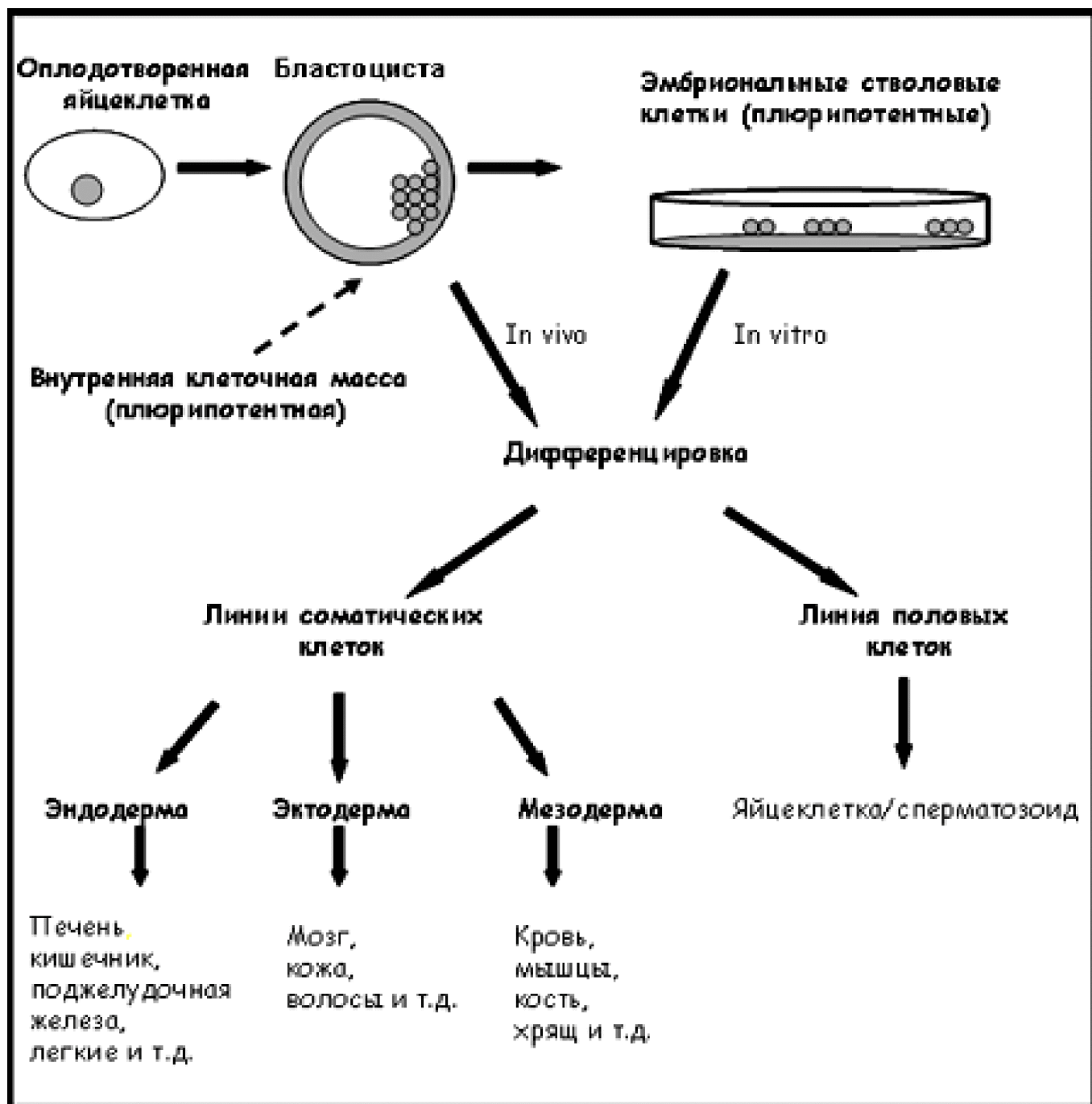


Рис.11. Схема получения плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток и их дальнейшей дифференцировки

Для работы с ЭСК необходимо получать именно постоянные клеточные линии, т. к. такой клеточный материал будет стабилен и охарактеризован по ряду необходимых параметров. Надо

подчеркнуть, что не любая бластоциста дает линию, отвечающую всем перечисленным свойствам. Встречаются дефектные бластоцисты, из внутренней клеточной массы, которых, не образуются популяции активно пролиферирующих ЭСК. Такие ЭСК могут постепенно прекратить деления и погибнуть. Для получения постоянных линий необходимо соблюдать определенные условия культивирования, которые отличны от условий, в которых растут другие клеточные линии. Так, в отличие от линий специализированных клеток, культивирующихся в определенной питательной среде с добавлением сыворотки, содержащей определенный набор ростовых факторов, линии ЭСК помимо этого нуждаются в дополнительных условиях. Для поддержания линий ЭСК человека в недифференцированном плюрипотентном состоянии разработаны различные системы культивирования. Исходно, для поддержания самообновления ЭСК человека *in vitro* клеточные линии культивировали на слое фидерных клеток, которые экспрессируют факторы роста, способствующие пролиферации ЭСК и блокирующие их дифференцировку. В качестве фидерных клеток используют фибробласты разного происхождения. В настоящее время многие исследователи используют в качестве фидерных клеток фибробласты человека, чтобы избежать заражения ЭСК человека ретровирусами или другими патогенами грызунов.

В последнее время активно разрабатываются бесфидерные системы культивирования с разными, покрывающими поверхность культуральной чашки, субстратами, которые состоят преимущественно из белков внеклеточного матрикса. При этом в культуральную среду добавляют ростовые факторы и другие агенты, стимулирующие клеточную пролиферацию. Бесфидерные субстраты, как и фидеры, различаются по метаболическим, адгезивным и секреторным функциям, благодаря которым ЭСК человека сохраняют статус пролиферирующих плюрипотентных популяций.

Перечисленные свойства способствуют перспективному использованию линий ЭСК для решения различных фундаментальных и прикладных биомедицинских проблем, таких как стадии нормального и аномального эмбриогенеза человека, пролиферация и клеточное старение, лекарственное и тератогенное тестирование, трансплантации и генная терапия. Сейчас широко развиваются молекулярно–генетические исследования по изучению экспрессии генов раннего эмбрионального развития, выявлению генов, ответственных за «стволовость» этих клеток. Но если ЭСК человека действительно являются адекватной моделью для проведения многосторонних фундаментальных исследований, то для использования их в трансплантационной терапии необходимо преодолеть ряд препятствий, основные из которых рассмотрим ниже.

Прежде всего, для использования ЭСК человека в регенеративных медицинских технологиях необходимо исключить все ингредиенты животного происхождения при культивировании ЭСК, а также исключить любые фидерные клетки в качестве субстрата, свойства которого существенно зависят от условий культивирования. В связи с этим, использование бесфидерных субстратов и среды определенного химического состава без добавок животного происхождения являются необходимыми условиями технологии получения линий ЭСК, которые будут применяться в дальнейшем при трансплантациях. В ряде исследований показана возможность успешного культивирования ЭСК в суспензионной и 3D системах. Суспензионное культивирование, помимо отсутствия фидера, удобно еще и тем, что можно получить значительные объемы биомассы ЭСК, по сравнению с монослойным культивированием. Таким образом, в настоящее время продолжается активный поиск и разработка оптимальных технологий для получения и поддержания линий ЭСК человека с учетом перспектив их возможного клинического использования.

Стабильность генома ЭСК человека является определяющим фактором их структурно-функциональной целостности, которая проявляется в сохранении оптимального баланса между пролиферацией и дифференцировкой. Но было установлено, что при длительном культивировании накапливаются клетки с количественными и структурными хромосомными нарушениями. Изучение кариотипической структуры разных клеточных линий на пассажах от 25 до 140 выявило частую амплификацию районов или целых хромосом 12, 17, и X. Обнаружено, что увеличение количества генетического материала этих хромосом способствует более активной пролиферации по сравнению с диплоидными культурами. Предполагается, что эти изменения могут иметь адаптивный характер, т.к. в этих хромосомах локализованы гены, обеспечивающие клеткам ускоренный рост. Накоплены данные и по изменчивости других хромосом. Тем не менее, тенденция к накоплению хромосомных аномалий имеет место не во всех проанализированных линиях. Поэтому неясно, является ли основной причиной появления цитогенетической нестабильности предрасположенность определенных генотипов к накоплению мутаций или конкретные условия культивирования. Имеющиеся на данный момент экспериментальные результаты, по-видимому, не могут дать однозначного ответа на этот вопрос. Существенно обратить внимание, что при длительном культивировании появляются генетические нарушения, выявляемые в различных раковых клетках. Эти нарушения включают изменения в числе копий генов и изменения в уровне метилирования промоторов ряда генов. В частности, в некоторых линиях ЭСК были обнаружены амплификации генных локусов, содержащих онкоген C-тус, присутствующий во всех видах раковых опухолей. Кроме того, присутствие изохромосомы 12p, часто наблюдаемое при длительном культивировании, было обнаружено в тератокарциномах человека, а

часто встречаемая амплификация 17q связана с нейробластомами. Таким образом, совершенно очевидно, что при длительном культивировании в разных клеточных линиях могут накапливаться генетические повреждения, влияющие, в частности, на приобретение клетками онкогенных свойств. Наряду со структурными изменениями в геноме обнаружены эпигенетические модификации, возникающие в процессе длительного культивирования и вносящие существенный вклад в создание нестабильности генома и в способность перехода клеток в трансформированное состояние. В связи с этим при использовании линий ЭСК в регенеративных медицинских технологиях длительность культивирования должна быть сокращена до минимума. Как только ЭСК образовали постоянную линию, сразу же необходимо провести цитогенетический анализ и получить необходимое для последующей работы количество биомассы.

В колониях ЭСК присутствуют разные клеточные популяции. Пока не найдено таких технологий культивирования, которые бы обеспечивали абсолютное отсутствие дифференцированных клеток, т.е. популяцию активно пролиферирующих недифференцированных клеток. В колониях всегда присутствует в большей или меньшей степени гетерогенная популяция, сохраняющая широкий спектр генов разных ветвей дифференцировки. При получении же терминально дифференцированной культуры ЭСК нельзя быть уверенным, что в популяции не будут присутствовать и мультипотентные предшественники. Селекция с применением трансфекции и флюоресцент-активированного клеточного сортинга может создать более сходную, но не абсолютно гомогенную популяцию. Кроме этого, использование трансфекций, обеспечивающих экспрессию нового белка, в частности, GFP (зеленого флуоресцирующего белка), может способствовать злокачественной трансформации генетически измененных клеток.

При трансплантации ЭСК возможно появление тератом (доброкачественных опухолей), которые могут перерождаться в злокачественные. В последнее время начались исследования биологии тератом. Показано, что возникновение тератом – процесс неоднозначный, зависящий от многих факторов. Например, показано, что образование тератом и их клеточный состав зависит от места трансплантации. Именно, состав тератом состоит преимущественно из недифференцированных, быстро растущих клеток, если трансплантация сделана в печень иммунодефицитных мышей, тогда как подкожная трансплантация этим же мышам приводит к дифференцировке ЭСК. По-видимому, важно определенное клеточное окружение, наличие большого количества ростовых факторов и т.д. Другим фактором, влияющим на образование тератом, является количество недифференцированных клеток, которое трансплантируется и которое выживает после трансплантации. Показано, что трансплантация чисто недифференцированных клеток почти всегда ведет к образованию тератом, способных переродиться в злокачественные опухоли, тогда как для более продвинутых в направлении дифференцировки ЭСК опухоли могут не образоваться, несмотря на присутствие небольшого количества недифференцированных ЭСК. Тем не менее, есть данные о том, что введение недифференцированных ЭСК в Lateral brain ventricle 14 дневным мышинным эмбрионам приводит к нейральной дифференцировке, но не к тератомам. Это говорит о том, что ЭСК человека чувствительны к средовым факторам, которые могут модулировать их дифференцировку и опухолевые потенции. Данные о стимулировании опухолей недифференцированными ЭСК, приводят к необходимости избавления от нежелательного пула, которое можно осуществить с помощью селекции, в частности, негативной селекции Oct-4 экспрессирующих клеток. Известно, что Oct-4 является характерным маркером недифференцированных ЭСК.

Существенным фактором, тормозящим использование ЭСК в регенеративной медицине, является возможное отторжение имплантата производных ЭСК человека в связи с экспрессией в них генов МНС (главный комплекс гистосовместимости); у человека он называется HLA (human leukocyte associated). Недифференцированные ЭСК слабо экспрессируют гены HLA ABC (класс 1) и не экспрессируют HLA DR (класс 2). Есть ряд данных о том, что в начале дифференцировки как *in vitro*, так и *in vivo*, степень экспрессии HLA ABC немного увеличивается. Тем не менее известно, что ЭСК являются пластичными клетками, быстро адаптирующимися к новому клеточному окружению, и в связи с этим могут быть в определенных условиях иммунопривилегированными, т.е. не вызывающими иммунных реакций. Кроме того, есть ряд способов, помогающих избежать иммунных последствий: использование лекарств-иммунодепрессантов; создание донорских линий с генетически измененными генами МНС; перенос ядра реципиента в энуклеированный ооцит и дальнейшее репрограммирование дифференцированного ядра в направлении недифференцированности с помощью цитоплазмы ооцита (терапевтическое клонирование). В результате может получиться новая эмбриональная клеточная линия с геномом реципиента. Кроме того, можно создать большое количество линий ЭСК, т.е. Банк ЭСК, представляющих основной спектр гистосовместимых комплексов аллелей, служащих источником МНС совместимости. Но сделать это затруднительно, т.к. имеет место сильный полиморфизм генетических локусов МНС, т.е. они представлены необычно большим числом аллелей (около 100) и соответственно большим количеством различных генных вариантов.

Тем не менее, несмотря на сложности, встающие на пути использования ЭСК в регенеративной медицине, в последнее десятилетие проводится много работ по трансплантации этих клеток в модельные объекты животного происхождения. Так, например,

культуру ЭСК, обогащенную прогениторными нервными клетками, трансплантировали в striatum крыс с болезнью Паркинсона, связанную с недостаточностью медиатора допамина. В течение 12 недель эти клетки дифференцировались *in vivo* в допаминовые нейроны, хотя и с низкой частотой. В результате у крыс улучшались поведенческие реакции и биохимические показатели и, что существенно, не образовывались тератомы. В другом исследовании было показано, что *in vitro* дифференцировка в допаминовые нейроны в течение 16, 20 и 23 сут приводила к последующей успешной трансплантации в striatum крыс клеток, где они экспрессировали нейрональные маркеры. Но клетки, дифференцированные в течение 16 сут, образовывали тератомы *in vivo* в отличие от клеток более длительно дифференцирующихся *in vitro*. Таким образом, очевидно, что при трансплантации ЭСК существует опасность получения тератом, которые могут перерождаться в раковые опухоли. Причем, как было отмечено выше, образование тератом может зависеть от многих факторов, поэтому крайне важно изучение биологии тератом. С помощью флуоресцент-активированного клеточного сортинга (FACS) и мечения клеток зеленым флуоресцентным белком (GFP) можно получать обогащенную культуру нейронов, в разной степени дифференцированных *in vitro*, трансплантировать в мозг животных, наблюдать присутствие живых клеток и экспрессию соответствующих маркеров. Также получены инсулин секретирующие клетки из ЭСК человека и удачно трансплантированы мышам. С помощью флуоресцентного анализа показана успешная трансплантация дифференцированных *in vitro* из ЭСК скелетных миобластов, введенных в переднюю большеберцовую мышцу SCID/Beige мышей. Много исследований посвящено получению кардиомиоцитов из ЭСК, т.к. лечение сердечно-сосудистых заболеваний – одна из важнейших проблем современной медицины.

Приведем ряд примеров. Получены данные о возможности недифференцированных ЭСК, при трансплантации инфарктным крысам, дифференцироваться *in vivo* в клетки, экспрессирующие кардио-специфические гены. Существенно, что не обнаружено образования тератом, т.е., по-видимому, действительно место локализации клеток и микроокружение могут не допустить образования тератом даже недифференцированными ЭСК. Получено много данных по трансплантации дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов инфарктным животным, которые также улучшали их состояние. В связи с тем, что обычно образуется небольшой трансплантат, разрабатываются методы по обогащению клеточных популяций кардиомиоцитами разной степени дифференцировки. В частности, разработана система культивирования, в которую добавлены факторы, контролирующие плюрипотентность ЭСК, активин А, BMP4, инсулиноподобный ростовой фактор IGF-1, а также коктейль определенных факторов, который ограничивает гибель кардиомиоцитов после трансплантации. В результате получено значительное улучшение сердечных функций инфарктных животных. Но, тем не менее, происходит постоянный поиск новых подходов к решению задач по оптимизации терапевтического применения ЭСК человека. Так, помимо клеточной терапии, которая состоит в прямой инъекции клеточной суспензии, выращенной *in vitro* до определенного состояния, либо в кровяное русло, либо в ткань-мишень, разрабатываются методы тканевой инженерии, связанные с созданием конструкторов в трехмерном пространстве *in vitro*, имитирующих модель ткани и имплантирующихся в дефектную ткань.

В последних обзорах литературы проведен подробный анализ состояния проблем дифференцировки ЭСК в разные ткани. Описаны многочисленные протоколы получения дифференцировок в разных направлениях. Основной вывод состоит в необходимости

интенсификации фундаментальных исследований по клеточным сигнальным путям, дифференцировкам тканей разных зародышевых листков, роли микроокружения, идентификации генетических профилей экспрессии, выявлению новых молекулярных маркеров, характерных для разных стадий дифференцировки ЭСК. Для того, чтобы результаты успешных фундаментальных исследований воплотились в успешную клеточную терапию, по-видимому, потребуется еще разработка сложных методов оценки генотипической и фенотипической стабильности.

Конкретный механизм действия ЭСК на поврежденные ткани неясен. Пока нет данных о длительном влиянии трансплантированных клеток на состояние реципиента. Кроме того, надо подчеркнуть, что без радикального решения вопросов, затронутых выше, о сложностях работы с ЭСК в области регенеративной медицины, существенного прорыва в клиническом использовании их ожидать не следует.

В последнее время появились исследования, где делается попытка избежать проблемы иммунной несовместимости при аллогенных трансплантациях. Именно, получены т.н. индуцированные плюрипотентные стволовые (iPS) клетки из человеческих клеток разного происхождения при их репрограммировании с помощью трансфекции регуляторных генов (Oct4, Sox2, C-мис и Klf4), специфичных для ЭСК. В результате происходит дедифференцировка клеток и возвращение их к плюрипотентному статусу. Таким образом, из небольшого числа полученных репрограммированных клеток достаточно быстро образуются клеточные линии с определенным генотипом, которые, подобно ЭСК, могут дифференцироваться в производные разных тканей, и, что существенно, могут использоваться для аутогенной трансплантации, т.е. быть пациент-специфичными. Тем не менее, безопасность этих плюрипотентных клеточных линий для клинического применения остается под

вопросом. Ибо при получении этих клеток используются вирусные конструкции, которые могут индуцировать генетическую нестабильность. Кроме того, в состав конструкции включен онкоген С-тус, высокая экспрессия которого обнаружена в разных раковых опухолях человека. В настоящее время ведутся методические разработки, направленные на исключение этих факторов при получении iPS клеток, т.е. не используется вирусная трансфекция и введение онкогена С-тус. Возможно, что это направление одно из удачных в плане приближения возможности клинического применения плюрипотентных стволовых клеток человека, т.к. нивелируется риск последствий аллогенных трансплантаций. Работы по оптимизации методов получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток активно продолжаются. Одним из направлений исследований является сравнительный анализ этих клеток с ЭСК по глобальной генной экспрессии и дифференцировочному потенциалу с целью выявления преимуществ или недостатков этих двух типов клеток при использовании их в регенеративной медицине.

В связи со стремительным развитием фармакологической отрасли, применение высокотехнологичных тест-систем на основе ЭСК для скрининга и доклинических испытаний становится необходимым при разработке безопасных лекарственных препаратов нового поколения, при изучении влияния неблагоприятных факторов на эмбриогенез человека и животных, а также при создании препаратов, повышающих жизнеспособность ранних зародышей млекопитающих, включая человека. Активно развивается направление тестирования лекарственных препаратов на дифференцированных *in vitro* ЭСК в нейроны, кардиомиоциты, инсулин секретирующие клетки и т.д. Такие клетки могут быть физиологической мишенью для исследования лекарственной

активности, токсичности препаратов и т.д. Недавно, например, была создана модель болезни Паркинсона на основе дифференцировки и генетических модификаций ЭСК человека. Модель допаминэргических нейронов, полученных от ЭСК человека, позволяет подбирать фармакологические агенты для лечения. Есть работы, где ЭСК дифференцировали в функционирующие, т.е. спонтанно сокращающиеся кардиомиоциты, которые в качестве модели можно использовать для подбора и оценки фармакологических препаратов, предназначенных для улучшения сердечной деятельности. Привлечение к этим разработкам iPS клеток человека может помочь в подборе лекарственных препаратов конкретному пациенту. Для изучения цитотоксических эффектов в ЭСК разработаны стандартизированные методы получения эмбрионидных телец (ЭТ), образующихся на начальных стадиях дифференцировки (рис.12). Эти клеточные сфероиды максимально соответствуют предимплантационным стадиям развития.

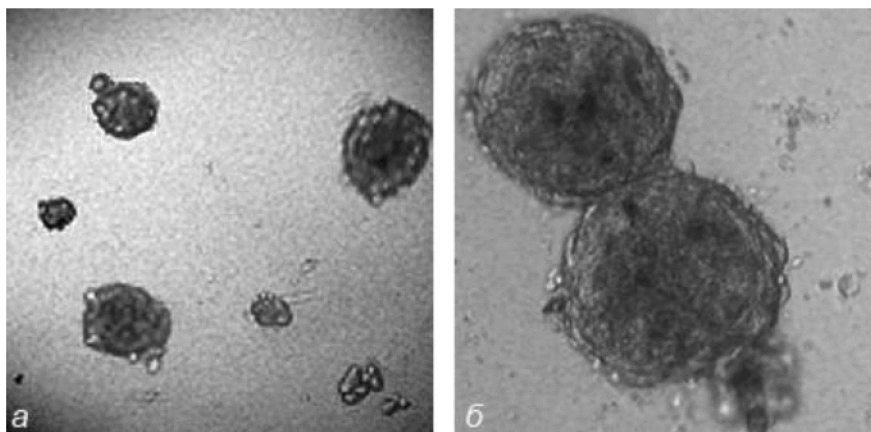


Рис.12 Эмбрионидные тельца (ЭТ), полученные из колонии линии SC1: а – отдельные ЭТ, б – слившиеся ЭТ в процессе роста.

Трехмерная организация в ЭТ наиболее точно воспроизводит межклеточные взаимодействия ранних эмбриональных популяций и позволяет более точно моделировать проникновение различных биологически активных веществ, оценивая жизнеспособность и митотическую активность в клетках ЭТ.

В заключение рассмотрим клетки – производные ЭСК. В последние несколько лет появились работы по получению мезенхимных стволовых клеток (МСК) из ЭСК человека, которые морфологически представляют собой фибробластоподобные некрупные клетки (рис.13). Эти клетки, по-видимому, могут явиться альтернативной моделью при использовании их для клеточной терапии. Давно известно, что мультипотентные

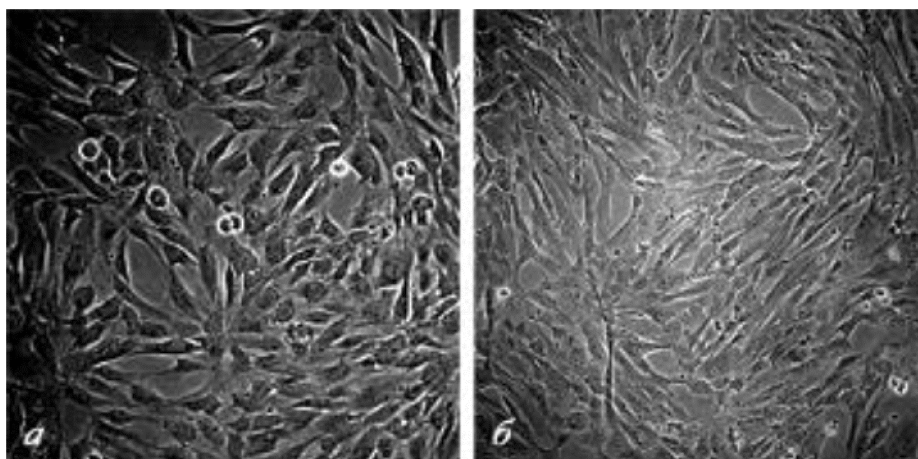


Рис.13 Морфология двух линий мезенхимных стволовых клеток: а – SC5-МСК, б – SC3a-МСК соответственно.

мезенхимные стволовые клетки (МСК) разного происхождения, так же как и плюрипотентные ЭСК могут использоваться в регенетивной медицине. Но ЭСК пока имеют только потенциальную возможность для такого использования в связи с рядом трудностей, о которых упомянуто выше, а с большинством взрослых МСК есть проблемы,

связанные с невозможностью получения большого количества клеток в связи с невысоким пролиферативным потенциалом и с использованием инвазивных методов получения этих клеток от доноров. Полученные же из ЭСК человека МСК сходны с взрослыми МСК по основным характеристикам: гомогенной фибробластоподобной морфологии, экспрессии основных поверхностных маркеров, иммуномодулирующим свойствам и мультипотентной дифференцировке, но при этом являются неограниченным источником получения генетически однородных клеточных популяций без использования инвазивных процедур. Кроме того, они обладают большим, чем взрослые МСК, иммуномодулирующим эффектом при трансплантациях в поврежденные области; у них увеличена или модифицирована экспрессия ряда туморсупрессорных генов, они обладают большим пролиферативным потенциалом. Они практически не образуют тератом, в отличие от ЭСК. Показано (с помощью МРТ или специального окрашивания), что МСК мигрируют к поврежденному участку. Изучение взрослых МСК человека выявило биохимическую гетерогенность популяций, экспрессирующих разные биологически активные вещества, которые способны изменять микроокружение поврежденной ткани и таким образом улучшать тканевую репарацию. Согласно другим исследованиям, в МСК имеет место одновременное присутствие в клетках маркеров ранней дифференцировки в производные 3-х зародышевых листков. Возможно, что при миграции в область разных тканевых повреждений, в МСК включаются соответствующие этим условиям системы экспрессии биологически активных веществ, обеспечивающие репарацию. В настоящее время в литературе широко обсуждаются механизмы тканевой репарации с помощью МСК, связанные с продукцией цитокинов и паракринных

факторов, улучшающих микроокружение поврежденных тканей. Существует также и другой механизм, обеспечивающий дифференцировку МСК в функциональные клетки, которые заменяют поврежденные. Однако есть ряд данных, свидетельствующих о том, что при трансплантации МСК наблюдается низкий уровень приживления трансплантированных клеток, но при этом имеет место существенный положительный терапевтический эффект при различных повреждениях легких, почек, костей, хрящей, при диабете, инфаркте и т.д. Поэтому исследователи придают большое значение трофическому механизму МСК, используемых для тканевой репарации.

Таким образом, рассмотренные в этой главе типы клеточных линий, являются крайне сложными, но и весьма перспективными биологическими моделями, которые широко используются как в фундаментальных биомедицинских исследованиях, так и в прикладных – в области регенеративной медицины и фармакологии.

8. Стволовые клетки взрослого организма.

Первые теоретические обоснования наличия в организме особых клеток, участвующих в поддержании функции некоторых тканей, были высказаны в конце XIX века профессором Е. В. Wilson. Экспериментальные и теоретические исследования позволили в начале 20 века профессору А.А. Максимова обосновать наличие единой стволовой кроветворной клетки, дающей начало всем дифференцированным клеткам крови, и создать унитарную теорию кроветворения. Идеи А.А.Максимова опередили свое время почти на 100 лет, и по достоинству его работа была оценена гораздо позже. В течение 20 века произошли революционные события в биологии и медицине: расшифровка структуры и функции ДНК, генома человека, открытие стволовых клеток. Впрочем, исследования стволовых клеток и тем более столь заманчивое их использование в регенеративной медицине еще только начинаются. Однако фундамент для таких исследований заложен, благодаря развитию новых технологий культивирования тканей и клеток, обеспечивших благоприятные условия для изучения гистогенеза различных тканей и трансплантации тканей и органов в организм человека. Большой опыт был накоплен в гематологии в связи с трансплантацией костного мозга. Начался новый виток изучения стволовых клеток. Работы А.А.Максимова были осмыслены по-новому и положили начало исследованиям не только стволовых клеток крови, но и других типов стволовых клеток. Развитием этих работ и принципиально новым шагом было открытие в лаборатории профессора А.Я.Фриденштейна колониеобразующих клеток (единиц) костного мозга, обладающих свойствами стволовых клеток, а именно способностью к длительному самоподдержанию и производству дифференцированных клеток. В конце XX века были выделены и исследованы эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши, а затем и человека. Эти работы произвели переворот в изучении стволовых клеток, создав технологии

выделения, культивирования, направленных дифференцировок и исследования возможного применения СК в медицине. В 1999 году журнал Science признал открытие стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и программы «Геном человека». Таким образом, в начале XXI века сложились условия для развития исследований стволовых клеток разного типа и, в частности, для изучения и использования СК взрослого организма.

Согласно современным представлениям стволовые клетки в организме присутствуют в так называемых нишах различных тканей. Здесь они способны к медленной пролиферации с целью поддержания собственного пула. Количество и свойства СК зависят от вида животного, его возраста, индивидуальных особенностей, а также от типа ткани. На основании исследования СК *in vitro* было дано следующее определение: стволовые клетки способны к асимметричному митозу, при котором одна клетка остается по-прежнему стволовой, а другая становится коммитированной (или транзиторной) и после ряда симметричных митозов под действием специфических факторов микроокружения дифференцируется в различных гистогенетических направлениях. То, что стволовые клетки способны к асимметричному митозу строго не доказано. Возможен и другой путь: деление СК с помощью симметричного митоза, после которого потомки стволовых клеток подвергаются дифференцировке под действием окружающей среды вследствие выхода из ниши стволовых клеток.

Таким образом, самое существенное свойство стволовых клеток заключается в том, что они могут самоподдерживаться в течение длительного времени и при этом превращаться в дифференцированные клетки, которые выполняют в организме различные функции.

В настоящее время существует классификация стволовых клеток по их способности к дифференцировке. Плюрипотентные клетки способны формировать все типы клеток эмбриона. К ним относятся ЭСК, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином.

Уни- и мультипотентные клетки варьируют по способности к дифференцировке в один или несколько типов тканей. Это СК, которые локализуются в сформировавшихся тканях взрослого организма (adult stem cells). Можно привести несколько примеров стволовых клеток взрослого организма (СКВ).

Гемопозитические стволовые клетки (ГСК) - мультипотентные стволовые клетки, дающие начало всем клеткам крови: эритроцитам, В-лимфоцитам, Т- лимфоцитам, нейтрофилам, базофилам, эозинофилам, моноцитам, макрофагам и тромбоцитам. Кроме костного мозга ГКС обнаружены в системном кровотоке и скелетных мышцах.

Стромальные стволовые клетки костного мозга - мультипотентные стволовые клетки взрослого организма, образующие строму костного мозга, способные к дифференцировке, по крайней мере, в трех ортодоксальных направлениях: остеогенном, хондрогенном, адипогенном.

Тканеспецифичные стволовые клетки - располагаются в различных видах тканей и отвечают за обновление их клеточной популяции, первыми активируются при повреждении. Например, стволовые клетки *жировой ткани* – мезенхимальные клетки, имеющие высокий пролиферативный потенциал и способные к дифференцировке в ортодоксальных направлениях. Примером стволовых клеток рыхлой соединительной ткани является пул фибробластов дермы кожи, обладающих чертами мезенхимальных клеток.

Как уже было сказано, разработка технологий выделения, культивирования и индукции направленной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток стимулировала дальнейшее изучение стволовых клеток взрослого организма. Это было особенно актуально в связи с перспективностью их использования в регенеративной медицине. Однако есть принципиальные различия между указанными основными типами стволовых клеток. Они сводятся к следующему:

- ЭСК – плюрипотентны, СКВ – мультипотентны или даже унипотентны;
- ЭСК обладают более высоким пролиферативным потенциалом;
- технология выделения и культивирования ЭСК унифицирована, для выделения и культивирования СКВ существует много различных технологий.

Стволовые клетки взрослого организма *in vitro* различаются не только по источникам и методам получения, но и по условиям их культивирования, пролиферативным характеристикам, иммунофенотипу (наличию определенных поверхностных CD-антигенов), мультипотентности (способности к индуцированным дифференцировкам в разных направлениях).

Среди различных типов СКВ наиболее изучены стволовые клетки костного мозга. Нарастает также количество исследований стволовых клеток жировой ткани, дермы и эпидермиса кожи, печени, сосудов, мышечной ткани, плаценты.

Стволовые клетки костного мозга включают 2 основных типа: гемопоэтические и стромальные (мезенхимальные) стволовые клетки. Гемопоэтические стволовые клетки костного мозга изучены сравнительно хорошо и нашли применение в гематологии при злокачественных и других нарушениях кроветворения. Остановимся на стромальных стволовых клетках костного мозга (СККМ), которые изучены хуже, хотя давно являются объектом фундаментальных и прикладных исследований.

Как было отмечено, в лаборатории профессора А.Я. Фриденштейна выделяли и характеризовали клетки, образующие колонии фибробластов – КОКф, имеющие свойства стромальных клеток костного мозга. Было показано, что такие колонии формируются в культурах клеток костного мозга людей, кроликов, морских свинок, крыс, мышей. Для фибробластов костного мозга различных млекопитающих были подобраны разные среды: для клеток человека, морской свинки, крысы – среда 199 или двойная среда Игла, для мышей – среда Фишера и т. д. Было показано, что колонии фибробластов являются клонами выделенных клеток. Содержание колониеобразующих фибробластов (КОКф) в костном мозге млекопитающих по данным разных авторов составляет 0,5-5 на 10^6 ядродержащих клеток. Клетки в колониях могут продуцировать щелочную фосфатазу, могут быть колонии, содержащие жировые клетки. В некоторых случаях возможно формирование колоний макрофагоподобных клеток. Их морфология значительно отличается от морфологии фибробластов. Работы этого направления привели к формированию понятия о стромальных клетках костного мозга (СККМ).

Несмотря на большое количество проведенных за последнее время работ ни названия стволовых стромальных клеток, ни методы их выделения, ни условия культивирования и направленных дифференцировок не стандартизированы.

Начнем с терминологии. Адгезивные фибробластоподобные стромальные клетки костного мозга называют по-разному:

- **мезенхимальные** стволовые клетки костного мозга – МСК (mesenchymal stem cells – MSCs – from bone marrow);
- **стромальные** клетки костного мозга - СККМ (Bone marrow stromal cells -BMSCs);
- **мультипотентные мезенхимальные** стволовые клетки костного мозга (Bone marrow mesenchymal stem cells - BM-MSCs);

- **отселектированные адгезивные клетки** костного мозга, способные дифференцироваться в **мезодермальные клетки** – (marrow mesodermal progenitor cells - MPCs).

Мультипотентные фибробластоподобные стволовые клетки из жировой ткани также имеют фенотип и свойства мезенхимальных клеток. Их называют:

- **мезенхимальные стволовые клетки (МСК) жировой ткани** (Adipose tissue mesenchymal stem cells - ASCs, Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells - AT-MSCs).

Дермальные фибробласты кожи человека имеют фенотип и свойства мезенхимальных клеток. Однако они сохраняют свое название: дермальные фибробласты кожи (Dermal fibroblasts; Skin-derived fibroblasts -SDFs).

Наиболее широко для адгезивных фибробластоподобных стволовых клеток взрослого организма используется термин МСК, подчеркивающий мезенхимоподобные (мезенхимальные) свойства клеток: способность не только к самоподдержанию, но и к индуцированной дифференцировке в различные соединительные ткани. В русскоязычной литературе МСК часто переводят как мезенхимные стволовые клетки, что подчеркивает их происхождение из мезенхимы эмбриона. Кроме того, для клеток стромы используют и термин СК (стромальные клетки, например, СККМ – стромальные клетки костного мозга), обращая внимание на локализацию и функцию клеток в костном мозге (строма), однако эта аббревиатура совпадает с СК – стволовые клетки. Есть и другие варианты названий, например, мезенхимные (мезенхимальные) мультипотентные стволовые клетки (ММСК). Такая множественность терминов указывает на гетерогенность популяций клеток и отсутствие стандартных подходов к их выделению и анализу.

8.1. Принципы методов выделения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, жировой ткани, кожи.

В зависимости от вида млекопитающего и структуры кости, жировой ткани, дермы кожи или другой ткани, содержащей стволовые клетки, используют несколько основных, принципиальных подходов к их выделению. Причем, все методы содержат ряд этапов:

8.1.1. Подготовка млекопитающего и забор костного мозга, жировой ткани или кожи (согласно действующим международным протоколам).

Мелких грызунов усыпляют с помощью эфира или кетаминового наркоза, умерщвляют их путем растяжения позвоночника, подвергают асептической обработке в 70⁰ или в 30⁰ спирте (10 мин.). Затем стерильно удаляют у них большеберцовые кости, с которых срезают мышцы и мягкую соединительную ткань, отсекают эпифизы, и осторожно выдувают костный мозг струей физиологического раствора без Ca^{2+} и Mg^{2+} с антибиотиками (смесь пенициллина, стрептомицина, цитохалазина В в стандартных концентрациях) с помощью шприца с иглой 22-23g. Кроликов усыпляют и достают костный мозг либо посредством пункции из подвздошной кости (5-6 мл), либо оперативным путем удаляют 1-2 небольших фрагмента (1-1,5 см²) костей таза. У человека обычно получают костный мозг (5-15 мл) пункцией подвздошной кости под местным наркозом, или из грудины (под общим наркозом перед оперативным вмешательством), забирая пункцию в шприц с 10-20мкг гепарина в расчете на 1 мл костного мозга.

Подкожную или внутрибрюшинную жировую ткань мелких грызунов иссекают стерильно с помощью скальпеля, у человека при пластических операциях получают стерильные липоаспираты, которые собирают в пробирки с физиологическим раствором и смесью антибиотиков.

Биоптат кожи человека получают с помощью специальной косметической операции, ткань подвергают краткосрочной стерилизации в разбавленном этаноле. После усыпления и стерилизации новорожденных грызунов (5 минут, 30⁰ этанол), у них иссекают куски кожи и помещают в среду с антибиотиками.

8.1.2 Дезагрегация костного мозга, жировой ткани, дермы кожи.

В некоторых случаях (например, для дезагрегации костного мозга из бедренных костей мелких грызунов) применяют только механическую обработку костного мозга через иглу 22-23g с последующей отмывкой при двухкратном последовательном центрифугировании (200 x g, 10 мин.) в 5 мл физиологического раствора без кальция и высевае клеток в ростовой среде. Иногда мы используем этот метод для получения колоний фибробластоподобных клеток костного мозга крысы. Для большего выхода стромальных клеток костного мозга из костей таза кролика нами применяется сочетание механической обработки с ферментативной (смесь 0,25% трипсина- 0,02% ЭДТА на физиологическом буфере). Иногда используют обработку раствором 0,25% трипсина. При этом клетки непосредственно после дезагрегации промывают центрифугированием (200 x g, 10 мин.) в среде с сывороткой и высевают в ростовой среде в концентрации $0,5 \times 10^6$ ядросодержащих клеток/см².

Жировую ткань человека из липоаспиратов дезагрегируют механически на шейкере и ресуспендируют в фосфатном буфере. Иногда для дезагрегации плотной жировой ткани используют раствор коллагеназы 1. Выделенные клетки суспендируют в питательной среде, осаждают центрифугированием (10 мин., 200 x g) и высевают в ростовой среде в концентрации $0,5-1 \times 10^6$ клеток/см².

Фрагменты кожи разрезают на мелкие кусочки, разделяют с помощью диспазы на дерму и эпидермис, собирают кусочки дермы и диссоциируют на клетки с помощью раствора коллагеназы 1 (ночь

при 4⁰ С). Суспензию клеток промывают в среде с сывороткой, осаждают центрифугированием (10 мин, 200 x g) и высевают в ростовой среде в концентрации 0,5-1x10⁶ клеток/см². Иногда фибробласты кожи выделяют путем их миграции из кусочков дермы в ростовой среде.

8.1.3 Отделение ядродержащих клеток костного мозга от эритроцитов

Для очистки ядродержащих клеток костного мозга от эритроцитов широко используют градиенты плотности (1.073 – 1.077 г/мл). В Отделе клеточных культур Института цитологии РАН для разделения клеток костного мозга мыши, крысы, кролика, человека применяют градиенты плотности Percoll и Histopaque (Sigma). Суспензию клеток костного мозга в фосфатном буфере без Ca²⁺ и Mg²⁺ (3 мл) наносят на 5-7 мл градиента плотности и центрифугируют при комнатной температуре 20 мин., 800 g. После центрифугирования ядродержащие клетки находятся в интерфазе. Их осторожно собирают стерильной пипеткой, разводят 1:10 (по объему) фосфатным буфером и осаждают центрифугированием (15 мин., 800 g). Далее клетки подсчитывают в гемоцитометре и высевают в ростовой среде в чашки Петри или флаконы (Nunc, Corning) 0,5x10⁶ клеток/см².

8.1.4 Очистка адгезивных мезенхимальных клеток костного мозга, жировой ткани, от примесных клеток других типов.

Очистка МСК костного мозга, жировой ткани осуществляется, в основном за счет избирательной адгезии и последующей пролиферации этого типа клеток в условиях культивирования (в ростовой среде определенного состава). В первичной культуре при смене среды (через 3 дня) МСК пролиферируют, формируя колонии, в то время как дифференцированные слабо адгезивные клетки при этом постепенно удаляются из культуры.

Только для особой фракции мезодермальных клеток-предшественников (MPCs) разработаны особые условия очистки. Эта технология включает отделение гемопоэтических клеток CD45+ на микромагнитных бусах, покрытых антителами к CD45 и дальнейшую селекцию колоний CD45-клеток на фибронектине в специальной среде с низким (2%) содержанием сыворотки.

8.2. Условия культивирования МСК

МСК КМ:

Среды: α MEM, DMEM-LG, смесь DMEM-LG с MCDB201, все среды с добавочным L- глутамином (2 mM).

Сыворотка эмбрионов коров: 10-20%; 2% - при культивировании на фибронектине с добавками EGF, PDGF, ITS.

МСК жировой ткани:

Среды: DMEM-LG, DMEM- HG + NEAA (неосновные аминокислоты), DMEM/F12, все среды с добавочным L- глутамином (2 mM)

Сыворотка эмбрионов коров: 10%.

Пролиферация МСК в культуре

Количество пассажей либо удвоений МСК КМ:

MSCs человека - 8-10 пас. - при плотности посева $2 \cdot 10^3$ кл/см² в среде с 10-20%СЭК;

MPCs человека - до 100 удвоений- при той же плотности клеток в среде с 2% СЭК и добавками ;

MPCs крысы - до 100 удвоений- при той же плотности клеток в среде с 2% СЭК и добавками.

8.2.1. Формирование колоний МСК КМ:

В первичной культуре – стабильно все типы МСК;

2-30 пас. - MSCs – не стабильно, MPCs - стабильно.

Количество пассажей МСК жировой ткани

АТ-MSCs человека - >10 - при плотности посева $2-10 \times 10^3$ кл/см², в среде с 10%СЭК;

8.2.2. Иммунофенотип МСК

Иммунофенотип клеток человека (исследуют, как правило, с помощью проточной цитофлуориметрии). В разных лабораториях используют различные наборы антител. Поэтому в настоящее время нельзя сказать, что иммунофенотип МСК окончательно установлен.

(Stro-1, CD105)+, (CD34, CD45, CD14) – для BM-MSCs костного мозга ;

(CD45, 34, 11b, 79a, 19, HLA- classII) -, (CD105, CD90) + - для BM-MSCs костного мозга;

(CD10, 31, 34, 36, 38, 50, 62E, 106, 117, H1P12, fibroblast surface antigen-1B10,

HLA-DR, classI-HLA, CD45) - , (β2-microglobulin, CD44, CDw90, KDR, Flt1) low,

(CD13, CD49b) + - для MPCs костного мозга ;

(CD45, 34, 31) - , (CD10,13, 44, 90, 105)+ - для АТ-MSCs жировой ткани, SDFs и BM- MSCs костного мозга.

Как видно из представленных далеко не полных прописей технология выделения, культивирования, исследования иммунофенотипа МСК (хотя бы количества необходимого для фенотипирования поверхностных антигенов) далеко не унифицирована. Эта технология продолжает развиваться и постепенно накапливается необходимый для унификации объем данных. Следует отметить только, что рекомендуемая формула иммунофенотипа для МСК человека: (CD45, 34, 11b, 79a, 19, HLA-classII) -, (CD105, CD90)+ - согласно рекомендации International Society for Cell Therapy (2008).

8.2.3. Мультипотентность МСК

Для любых СК выделение и культивирование необходимы для их накопления, исследование иммунофенотипа – для идентификации, изучение мультипотентности *in vitro* и *in vivo* – для основной характеристики СК, помимо пролиферации определяющей их тип, а также перспективу использования в регенеративной медицине. Исследование мультипотентности МСК начинают с трех ортодоксальных дифференцировок.

Мультипотентная дифференцировка *in vitro* BM-MSCs.

а) Условия прохождения **адипогенной** дифференцировки: монослой клеток и индукционная среда, смена среды через каждые 3-4 дня. Маркеры дифференцировки: наличие в цитоплазме капель нейтральных липидов, экспрессию специфических генов и белков - исследуют через 2-3 недели.

Состав индукционной среды варьирует. Широко используют среду с 10% лошадиной сыворотки, а также среду с 10% лошадиной сыворотки + дексаметазон (10нМ) + аскорбиновая кислота (50мкг/мл)+ ITS (1x) + LA-BSA (1x).

б) Условия прохождения **хондрогенной** дифференцировки: осадок из 250 -500 тысяч клеток в индукционной среде (0,25-0,5 мл) в стерильной конической пробирке, смена среды через каждые 3-4 дня. Маркеры дифференцировки: формирование хрящеподобной микромассы, внеклеточный матрикс которой содержит протеогликаны и коллаген 2 типа - исследуют через 3 недели.

Состав индукционной среды варьирует.

Один из вариантов такой среды: DMEM - HG + дексаметазон (100нМ) + аскорбат натрия (50 мкг/мл) +ITS (1x) + LA-BSA (1x) + TGFβ3 (10 нг/мл) + пируват Na (110 мг/мл) ?.

в) Условия прохождения **остеогенной** дифференцировки: монослой клеток и индукционная среда, смена среды через каждые 3-4 дня. Маркеры дифференцировки: наличие во внеклеточном

матриксe фосфатов кальция, выявляемых с помощью реакции Ван Косса, а также экспрессию специфических генов и белков (щелочной фосфатазы, остеопонтина и остеокальцина)- исследуют через 2-3 недели. Состав индукционной среды варьирует. Наиболее часто используют

среду α MEM или DMEM-LG с 10% СЭК + β -глицерофосфат натрия (10мМ) + дексаметазон (100нМ) + аскорбиновая кислота (50мкг/мл).

г) Условия прохождения **кардиомиоцитарной** дифференцировки: монослой клеток и индукционная среда, смена половины среды через каждые 3- 4 дня. Маркеры дифференцировки: экспрессия маркерных генов и белков (специфических изоформ тропонина-I, миозина II, α -актинина) исследуют через 2-3 недели.

Состав индукционной среды варьирует. Используют следующую среду: α MEM + СЭК (20%) + 5'-азацитидин (3 мкМ). При нанесении клеток на фибронектин или ламинин используют: смесь DMEM-LG с MCDB201 (либо α MEM) + СЭК (2%) + 5'-азацитидин (3 мкМ) + дексаметазон (10нМ) + аскорбиновая кислота (50мкг/мл) + ITS(1x) + LA-BSA(1x) + PDGF-BB (10нг/мл) + EGF (10 нг/мл).

Были также отработаны условия и показана направленная дифференцировка МСК в эндотелиоциты, нейроны, скелетно-мышечные клетки.

Однако следует отметить, что как для МСК КМ, так и жировой ткани терминальные дифференцировки были получены только в трех ортодоксальных направлениях. Индуцированные *in vitro* МСК приобретают не все характеристики дифференцированных миогенных клеток или нейронов, являясь скорее их предшественниками. Поэтому необходимы дополнительные исследования неортодоксальных дифференцировок МСК.

К настоящему времени накоплено большое количество работ по гетеротрансплантации МСК и трансплантации аутологичных МСК на

модельные раны экспериментальных животных. В них было показано, что МСК КМ *in vivo* формируют костную или хрящевую ткани при гетеротрансплантации на керамике или в диффузионных камерах бестимусным мышам или крысам.

Аутологичные МСК способствуют регенерации костной, хрящевой, мышечной тканей, восстановлению сосудов. Значение разработок условий трансплантации МСК в поврежденные ткани и исследования влияния трансплантатов на регенерацию тканей при различных нарушениях очень велико. Эти исследования способствуют созданию технологии для применения СК этого типа в регенеративной медицине различных органов и тканей у человека.

В Отделе клеточных культур Института цитологии РАН в течение нескольких лет ведутся работы по выделению, культивированию, изучению мультипотентности СККМ (МСК костного мозга и других тканей) различных животных. Для выделения клеток было выбрано сочетание механической дезагрегации КМ с последующим отделением ядродержащих клеток от эритроцитов в градиенте плотности (1.073 – 1.077 г/мл). Объектами исследования был костный мозг бедренных костей мыши и крысы, костей таза кролика, а также костей грудины взрослого человека и костей таза плода через 21 неделю гистации при прерванной по медицинским противопоказаниям беременности. Средами для культивирования являются α MEM и DMEM/F12 с добавлением 10% СЭК и антибиотиков, для пассирования клеток используется смесь трипсина (0,25%) и ЭДТА (0,02%). Направленную дифференцировку клеток исследовали в описанных выше условиях. Были выделены и охарактеризованы СККМ мыши, крысы, кролика и человека. Кроме того, в течение многих лет в Институте цитологии выделяют и культивируют фибробласты кожи человека и животных. Эти активно пролиферирующие в культуре клетки используют в разных исследованиях. Сравнительно недавно исследовали

мультипотентность некоторых популяций фибробластов кожи человека и кролика. В таблице представлены основные характеристики пролиферации (количество пассажей в культуре) и мультипотентности культивируемых МСК (индуцированные дифференцировки), их иммунофенотип.

Таблица 4

Характеристики направленно дифференцированных стволовых клеток

Вид животного, источник клеток	Количество пассажей в культуре	Дифференцировки	Иммунофенотип (2-4 пассаж)
Мышь (взрослые здоровые особи), КМ	2	Остеогенная+, н/о	н/о
Крыса (взрослые здоровые особи), КМ	6	Остеогенная+, хондрогенная+, адипогенная+, кардиомиогенная±	СД45± СД90+ остальные маркеры н/о
Кролик (взрослые здоровые особи), КМ	>10	Остеогенная+, хондрогенная+, адипогенная+	н/о
Кролик (новорожденные здоровые особи), КМ	>12	Остеогенная+, хондрогенная±, адипогенная+	н/о
Человек (фетальный материал)	>15	Остеогенная+, хондрогенная±, адипогенная+	(СД34,СД45, СД117)- остальные маркеры н/о

Человек (взрослые доноры с сердечно- сосудистыми заболеваниями), КМ	8	Остеогенная+, н/о	(СД34,СД45, СД117)- СД90+
Человек (взрослые здоровые доноры), КМ	10	Остеогенная+, адипогенная+, н/о	(СД34,СД45, СД117)- СД90+, уточ - ?
Человек (взрослые здоровые доноры), кожа	>10	Остеогенная+, адипогенная+, н/о	н/о
Кролик (новорожденные здоровые особи), кожа	>12	Остеогенная±, хондрогенная±, адипогенная+	н/о

Примечания: а) дифференцировки: + есть терминальная дифференцировка; ± есть в небольшом количестве ранние маркеры дифференцировки (слабая гистохимическая окраска); б) иммунофенотип: - отсутствие антигена, ± присутствие 2-3% клеток с данным антигеном; в) н/о – не обследовали.

Как видно из представленных в таблице данных, исследования МСК различного происхождения в Отделе клеточных культур далеко не завершены. Они требуют продолжения, особенно фенотипирования клеток и стандартизации условий их пролиферации и дифференцировки. Однако, на основании полученных данных

данных мы составили предварительную характеристику культивируемых МСК разных видов.

СККМ животных и человека в первичных культурах росли в виде колоний. Однако колонии клеток кролика быстро сливались, в то время как колонии СККМ человека и крысы до первого пассажа сохраняли свою дискретность. Форма клеток, как в колониях, так и в монослое была фибробластоподобная. Плотность клеток в колониях была разная: были «рыхлые» колонии и «плотные» колонии с большим числом клеток, что соответствует полученным ранее данным А.Я.Фриденштейна с соавторами. Диаметр клеток в суспензии первичной культуры колеблется от 10 мкм до 40 мкм, увеличиваясь по мере старения культуры. Клетки кролика и фетальные клетки человека способны к более длительной пролиферации. При низкой плотности всех СККМ (1000 кл/см^2) на 2-3 пассаже культивирования (исключая клетки мышцы) их популяция наиболее однородна по диаметру (20 - 40 мкм) и по форме. В основном, это клетки мелкие и вытянутые, а также распластанные и гексогональные, что описано и в литературе.

Полученные данные позволили нам в качестве основного лабораторного животного избрать кролика (для разработки экспериментальных моделей нарушения остеогенеза и хондрогенеза, ишемии сердечной мышцы, отработки на этих моделях способов трансплантации аутологичных и аллогенных СККМ и исследования их роли в регенеративных процессах *in vivo*). Другим лабораторным животным является крыса, на клетках которой оптимизируются методы выделения, культивирования и дифференцировки СККМ. Дальнейшая оптимизация методов осуществляется для СККМ человека (здоровых доноров).

Таким образом, во многих лабораториях к настоящему времени накоплены экспериментальные данные по выделению, культивированию и характеристике МСК человека и животных из

различных тканей и органов. Однако, не смотря на многочисленные исследования, новые технологии применения МСК в регенеративной медицине еще находятся на стадии разработок. Исключение составляет: применение трансплантаций костного мозга и различных его фракций в гематологии (при онкологических заболеваниях и облучении) и применение дермальных эквивалентов и полных эквивалентов кожи в ожоговой терапии. Кроме того, успешно используют дермальные эквиваленты в косметологии, флебологии (лечение трофических язв), стоматологии. Все перечисленные разработки, за исключением трансплантаций костного мозга в гематологии проводят в Отделе клеточных культур Института цитологии РАН. Мы считаем, что указанных областей использования МСК пока достаточно, так как необходимы данные не только по успеху, но и по отдаленным последствиям трансплантаций МСК как в регенеративной медицине, так и в экспериментальной медицине в опытах на животных.

Оснований для такого осторожного отношения к применению клеточной терапии в регенеративной медицине достаточно много. О них было сказано в предыдущих главах. Здесь остановимся только на данных о функциональной и генетической нестабильности СК в культуре. Как на основании собственных, так и литературных данных необходимо отметить, что в некоторых случаях при длительном культивировании СК их дифференцировочный потенциал снижается, появляется небольшой процент анеуплоидных клеток. Если же при этом они не снижают, а ускоряют свою пролиферацию, то это признак начала их трансформации.

Теперь остановимся на перспективах применения в медицине индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), технологии перепрограммирования которых из обычных СК взрослого организма были разработаны в 2007-2008 годах. Не смотря на всю заманчивость их использования и полученные обнадеживающие результаты по лечению с их помощью животных с моделированными генетическими нарушениями, было показано

также, что количество мутаций в них на порядок возрастает по сравнению с СК и ЭСК. Однако, в любых СК при длительном культивировании нарастает генетическая нестабильность. Поэтому технологии применения различных типов СК необходимо развивать с учетом контроля их стабильности и функциональной активности.

Заключение

Стволовые клетки взрослого организма в культуре способны к пролиферации в течение различного времени, зависящего от вида животного, его возраста и технологии выделения и культивирования клеток. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга в культуре мультипотентны и способны к дифференцировке, по крайней мере, в 3-х ортодоксальных направлениях: остеогенном, хондрогенном, адипогенном. Наиболее изучены МСК КМ человека, их иммунофенотип: (CD45, 34, 11b, 79a, 19, HLA- classII)-; (CD105, CD90)+. Диаметр МСК колеблется от 10 до 40 мкм, при старении культуры появляются клетки с диаметром до 80 мкм. Мелкие клетки имеют высокое отношение ядро/цитоплазма, крупные – более низкое. МСК в активно пролиферирующей культуре имеют фибробластоподобную форму, в стареющей культуре появляются клетки разнообразные по форме. Показано, что МСК костного мозга способны участвовать в остеогистогенезе, хондрогенезе и кардиомиогенезе *in vivo*. Поэтому в настоящее время активно разрабатывают технологии трансплантации аутологичных МСК в кости, суставы, сердечную мышцу и другие органы и ткани для ускорения или оптимизации их регенерации (при травмах и различного рода патологиях). Одним из обязательных условий использования СК в медицине является контроль их генетической и функциональной стабильности, для которого должны быть разработаны соответствующие протоколы.

9. Клеточные технологии в терапии кожного покрова.

Кожа является одной из наиболее часто повреждаемых тканей организма в результате повседневной деятельности человека, а также вследствие ряда заболеваний. К их числу относятся – ожоги, травмы, трофические язвы, воспаления, огнестрельные и хирургические раны и ряд других. При небольших по площади нарушениях целостность кожи восстанавливается спонтанно, но при обширных дефектах часто требуется хирургическое вмешательство. При этом используются стандартные методы пересадки лоскута цельной кожи, взятой у самого пациента или от здорового донора. Вместе с тем медицинская практика свидетельствует о том, что при ряде глубоких повреждений и сопутствующих заболеваний пересадка лоскутов собственной кожи либо невозможна, либо не дает желаемого эффекта.

Успехи, достигнутые к настоящему времени в области клеточной биологии, и в частности, в совершенствование методов культивирования позволило на основе нормальных клеток кожи человека создавать клеточные продукты, способствующие восстановлению структурной целостности кожного покрова в тех случаях, когда традиционные методы лечения не эффективны.

Прежде чем переходить к подробному описанию создания клеточных продуктов, используемых при лечении кожных дефектов, необходимо рассмотреть строение кожи человека для более полного понимания сути разрабатываемых клеточных технологий

9.1. Строение кожи человека

Кожная ткань состоит из двух основных частей – эпидермиса и дермы, разделенных друг от друга базальной мембраной, а также кожных придатков в виде волосяных фолликулов, сальных и потовых желез.

9.1.1. Эпидермис представлен многослойным плоским постоянно обновляющимся и ороговевающим эпителием. Клетки эпидермиса –

кератиноциты образуют 5 слоев: базальный, шиповатый, зернистый, блестящий и роговой

Самый нижний базальный слой эпидермиса состоит из одного слоя недифференцированных пролиферирующих базальных кератиноцитов, которые непосредственно контактируют с базальной мембраной и, по-видимому, имеют наибольшее сродство к ее составляющим белкам. Однако до настоящего времени остается неясным, с какими именно белками базальной мембраны непосредственно взаимодействуют стволовые клетки эпидермиса, а также за счет каких из них эти клетки удерживаются в самом нижнем слое эпидермиса, находясь в недифференцированном состоянии. Базальные кератиноциты имеют цилиндрическую или овальную форму. Они соединяются друг с другом и с вышележащими клетками шиповатого слоя при помощи десмосом. Эти клетки постоянно делятся. Образующиеся при делении клетки (транзиторные) впоследствии специализируются (дифференцируются), постепенно перемещаются в поверхностные слои эпидермиса и таким образом обеспечивается постоянное обновление эпидермиса

Три слоя, расположенные выше базального, в направлении от базальной мембраны к поверхности кожи различаются гистологически и представляют собой различную степень дифференцировки кератиноцитов, переходящих в роговые чешуйки (клетки самого верхнего, рогового, слоя эпидермиса). Клетки шиповатого слоя (из 5-10 рядов), располагающегося над базальными клетками, имеют полигональную форму, соединены между собой многочисленными мостиками – десмосомами. В десмосомах заканчиваются пучки промежуточных кератиновых филаментов. Следующий за ним зернистый слой состоит из 3-4 рядов плоских клеток, в цитоплазме которых накапливается роговое вещество. Далее идет блестящий, слой, который также состоит из 3-4 рядов плоских клеток, В этих клетках ядра подвергаются деструкции и гибнут.

Самый поверхностный, роговой слой состоит из многих рядов ороговевших клеток - роговых чешуек. Продолжительность всего процесса дифференцировки (от клеточного деления стволовой клетки до слущивания роговых чешуек с поверхности кожи) составляет 20-40 дней, в зависимости от места локализации кожи на поверхности тела. При этом постоянно происходит не только слущивание роговых чешуек, но и вступление в дифференцировку новых клеток. В норме оба процесса сбалансированы.

9.1.2. Базальная мембрана представляет собой вариант специализированного внеклеточного матрикса (ВКМ). В базальной мембране кожи человека выделяют 3 зоны: прозрачную пластину (Lamina lucida), плотную пластину (Lamina densa) и фибриллярную зону (Sublamina densa). Прозрачная (светлая) пластина в основном состоит из ламинина и фибронектина, которые образуют якорные филаменты, связывающиеся с мембраной базальных клеток, наряду с полудесмосомами. Темная (плотная) пластина состоит из протеогликана гепарансульфата (образует фильтрационный барьер) и коллагеновых волокон (из коллагена IV типа). В фибриллярной зоне находятся фибриллы, образованные коллагеном VII типа.

Базальная мембрана играет большую роль в контроле жизнедеятельности клеток. Как и в других тканях, базальная мембрана кожи участвует в создании и сохранении архитектуры ткани, обеспечении прикрепления соседних клеток, контроле миграции и инвазии.

9.1.3. Дерма, в свою очередь структурно делится на 2 слоя – сосочковый (папиллярный) и сетчатый (ретикулярный), которые не имеют четкой границы. Сосочковый слой располагается непосредственно под базальной мембраной и состоит из рыхлой соединительной ткани. Свое название этот слой получил от многочисленных выростов, вдающихся в эпидермис. Внеклеточный матрикс этого слоя состоит из коллагеновых и эластических волокон.

Сетчатый слой, обеспечивающий механическую прочность, образован плотной соединительной тканью с мощными пучками коллагеновых волокон и сетью эластических волокон. Пучки коллагеновых волокон проходят в двух направлениях: одни лежат параллельно поверхности кожи, другие – под углом. Вместе они образуют сеть, строение которой определяется функциональной нагрузкой на ткань (кожу). Клетки дермы представлены, в основном, фибробластами. Кроме того, сетчатый слой включает в себя волосяные фолликулы, сальные и потовые железы, гладкомышечные клетки.

Волосяной фолликул — это корень волоса, который расположен в коже и растет. Он снабжен нервными волокнами, кровеносными сосудами и гладкомышечными клетками. Волосяные фолликулы формируются на третьем месяце эмбриогенеза за счет вставания тяжей клеток эпидермиса в подлежащую дерму. Эпидермальные выросты в дальнейшем становятся волосяными фолликулами. Самая глубокая часть эпителиального тяжа превращается в зародышевую матрицу волосяного фолликула, которая располагается над соединительнотканым волосяным сосочком, где благодаря наличию капилляров имеется источник образования тканевой жидкости для матрицы. В эпидермальном тяже, соединяющем зародышевую матрицу с поверхностью, появляется просвет — формируется наружное корневое влагалище волосяного фолликула, около поверхности кожи в нем различают те же слои, что и в эпидермисе, а снаружи оно покрыто в этой зоне мягким кератином. В глубине фолликула наружное корневое влагалище становится более тонким, в нем не выявляются некоторые из поверхностных слоев клеток эпидермиса. На дне волосяного фолликула наружное корневое влагалище окружает волосяную матрицу и переходит в нее, в этом участке оно состоит только из клеток базального слоя эпидермиса.

Наличие в луковице волосяных фолликулов стволовых кератиноцитов дает возможность осуществления в процессе раневого заживления так называемой островковой эпителизации

9.2. Восстановление поврежденного кожного покрова с помощью культивируемых кератиноцитов и фибробластов

9.2.1. Выделение и культивирование кератиноцитов.

В 1975 г. Рейнвальдом и Грином был предложен метод успешного выращивания многослойного пласта кератиноцитов из суспензии отдельных клеток. Кератиноциты для этой цели выделяют из биоптатов кожи: лица, век, ушей, груди (взятых от здоровых доноров, в результате косметической операции или из кожи самих пациентов), крайней плоти новорожденных, кожи эмбрионов, из ткани органов слуха или ротовой полости, и из любой другой доступной локализации в структуре организма.

Прежде всего, был предложен способ отделения эпидермиса от дермы с использованием фермента диспазы, которая расщепляет ткань как раз по линии базальной мембраны, обнажая тем самым базальный слой клеток. Для этого стерильно взятый биоптат кожи нарезается на мелкие фрагменты, которые помещают в раствор диспазы (нейтральная протеаза из *Bacillus polymyxa*) или смесь растворов диспазы и коллагеназы в которой их оставляют на ночь в холодильнике. После этого фрагменты вынимают из ферментативного раствора, аккуратно встряхивают и перекладывают в 0.25%-ный раствор трипсина. Затем ставят на 5-10 мин в CO₂-инкубатор при 37 °C для получения суспензии клеток базального слоя. Такая популяция базальных клеток является гетерогенной и состоит как из стволовых, так и транзиторных клеток.

Для успешного культивирования и формирования многослойного пласта кератиноцитов (аналога эпидермиса *in vitro*) используются в

качестве основы, следующие питательные среды: либо смесь сред DMEM:F12 (1:1), либо среды KGM или FAD, специально разработанные для этих клеток. Кроме того, для активного роста и дифференцировки кератиноцитов необходимо дополнительное присутствие в среде митогенных добавок. Таковыми являются – гидрокортизон, эпидермальный фактор роста, холерный токсин, инсулин, трансферрин, аденин и лиотиронин. Помимо этих факторов, для полноценной дифференцировки кератиноцитов в среде необходимо наличие ионов Ca^{+2} в концентрации 1 мМ, так как он является индуктором их терминальной дифференцировки. Замена ростовой среды на среду с более низким содержанием Ca^{+2} позволяет в экспериментах при необходимости отделять супрабазальные (верхние) слои клеток многослойного пласта от базального слоя клеток. И, наконец, в качестве обязательного компонента ростовой питательной среды используется эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота в количестве 10% от общего объема среды.

Еще одним ключевым фактором, способствующим успешному культивированию кератиноцитов, является субстрат, к которому они прикрепляются, распластываются и мигрируют. Он представляет собой внеклеточный матрикс, наработанный фибробластами (подобно тому, как в ткани эпидермис лежит на дерме). В качестве таких фидерных или поддерживающих клеток вначале использовали фибробласты линии 3Т3 (линия мышинных фибробластов), сублетально облученных радиацией. Облучение не позволяло фибробластам активно делиться и таким образом предотвращало селективное преимущество их роста перед кератиноцитами. Затем было обнаружено, что радиацию можно заменить обработкой фибробластов раствором митомицина C, также останавливающего пролиферацию но сохраняющим их жизнеспособность. При этом кератиноциты, пролиферируя и мигрируя по поверхности

культурального сосуда, оттесняли фибробласты к его периферии. Через 10-14 дней можно было получить сформировавшийся многослойный пласт кератиноцитов, который представлял собой аналог пространственной организации эпидермиса.

Такой пласт можно было открепить от поверхности культурального сосуда с помощью того же фермента диспазы и трансплантировать на рану. Нанесенный пласт позволял ликвидировать дефицит кожи при закрытии неглубокой раны.

Позднее в качестве фидерных клеток использовали также и дермальные фибробласты человека. Исследованиями, проведенными в Отделе клеточных культур Института цитологии РАН, было показано, что можно обходиться и без фидерных клеток, используя в качестве субстрата коллаген I типа - основной компонент внеклеточного матрикса дермы, продуцируемый фибробластами (рис.14.).



Рис.14 Базальные кератиноциты, посаженные на коллаген на разных сроках культивирования.

Было показано также, что кератиноциты могут расти в среде с низким содержанием Ca^{+2} и без сыворотки, но при этом клетки растут в монослое, не образуя десмосомальных взаимодействий и не дифференцируясь

9.2.2. Формирование многослойного пласта кератиноцитов.

Кератиноциты проходят через определенное количество удвоений до старения культуры в зависимости от возраста донора. Клетки крайней плоти новорожденных способны примерно к 50-60 удвоениям популяции, но это число снижается с возрастом донора. Кератиноциты, растущие *in vitro*, делятся быстро со средним клеточным циклом 22-24 часа. При этом у нормальных эпидермальных клеток в составе ткани длительность клеточного цикла может колебаться в среднем от 50 до 300 часов. При усиленном обновлении кожного покрова, который происходит при псориазе, он сокращается и может составлять около 50 часов. Таким образом, в популяции культивируемых кератиноцитов, реализуется гиперпролиферация в отличие от их поведения в составе нормальной кожной ткани

Методом электронной микроскопии было установлено, что кератиноциты, растущие конфлуэнтно *in vitro*, содержат до 12 рядов клеток, но утрачивают при этом способность к четкому разделению на определенные слои, как это происходит в нормальном эпидермисе. В базальном и шиповатом слоях, клетки распластаны и морфологически выглядят плоскими. Изредка встречаются кератогиалиновые гранулы и небольшое количество гранул на мембране. Между клетками присутствуют десмосомы, и процесс образования микроворсинок также имеет место на всех клеточных поверхностях кроме поверхности базального слоя, которым он прикрепляется к поверхности культурального сосуда. В верхних слоях встречаются безъядерные клетки с утолщенной клеточной оболочкой, но нормальный роговой слой отсутствует. Клетки

Лангерганса отсутствуют, но меланоциты выживают и пролиферируют в культуре совместно с кератиноцитами. Кератиноциты играют активную роль в индуцировании роста меланоцитов. Виментин (мезенхимальный маркер) был обнаружен в базальных клетках культивируемого эпидермиса. Chapman с соавторами выявили электронноплотные зоны на базальной мембране, похожие на «незрелые» полудесмосомы, которые исчезают после открепления клеток от поверхности культурального сосуда.

9.2.3. Клиническое применение многослойных пластов кератиноцитов

Трансплантацию аутологичных кератиноцитов первоначально использовали для лечения ряда пациентов с критическими ожогами. Однако область применения постепенно стала расширяться, и положительное действие трансплантатов было продемонстрировано при заживлении трофических язв различного происхождения (хроническая венозная недостаточность, «диабетическая стопа», повреждений в результате лучевого облучения), и при восстановлении кожного покрова, поврежденного в результате ран различной этиологии (огнестрельные раны, травмы, при удалении невусов, татуировок и др.).

При ожогах обычно применяют в качестве трансплантатов расщепленные кожные лоскуты. Однако этот подход лимитируется наличием подходящих донорских участков кожи. Главное преимущество трансплантации культивируемых кератиноцитов заключается в том, что в течение 3-4 недель из небольшого по размеру кусочка кожи можно нарастить достаточно большое количество клеток для пересадки без повторного взятия материала у донора. Этот метод лечения ожогов в настоящее время широко применяется в центрах США, Европы, Японии и других стран

Кроме того, можно создать запас кератиноцитов в виде криобанка с сохранением, выделенных клеток при температуре жидкого азота. В

случае необходимости они могут быть разморожены, переведены в культуру и, по мере размножения и роста, формировать многослойный пласт, который затем может быть трансплантирован на раны. Пересаживать кератиноциты имеет смысл только тогда, когда уже отсутствует инфицирование раны и имеется свежая грануляционная ткань. Щедрое использование антисептиков и агрессивных жидкостей (перекись водорода, йод, бриллиантовый зеленый и т.п.) недопустимы в момент трансплантации и в период заживления раны. Изначально трансплантаты культивируемых клеток более хрупкие, чем трансплантаты расщепленных кожных лоскутов, но примерно к 15-му дню они прочно прикрепляются к раневому ложу.

Как показали дальнейшие исследования, в процессе заживления ран и восстановления эпителия кожного покрова успешное заживление с помощью многослойных пластов кератиноцитов происходит в случае неглубоких повреждений. Для более серьезных и обширных ран затрагивающих глубокие слои кожи и прилежащих тканей необходимо использовать дермальные фибробласты – основной клеточный тип дермы.

9.3. Выделение и культивирование дермальных фибробластов.

Существуют 2 способа выделения фибробластов из биоптатов кожи – ферментативный и путем их миграции из фрагментов кожи.

При ферментативном способе дерма, отделенная от эпидермиса, подвергается обработке раствором коллагеназы, которая приводит к диссоциации ткани и высвобождению клеток. Полученная суспензия центрифугируется, супернатант (раствор коллагеназы) удаляется, к осадку клеток добавляется питательная среда DME с 10% эмбриональной сывороткой коров. По мере размножения клеток они пересеваются и в дальнейшем (на 2-м пассаже) могут быть заморожены, и храниться в атмосфере жидкого азота до

востребования. В случае миграции фрагмент цельной кожи или отделенная от эпидермиса дерма разрезается на маленькие кусочки (размером примерно 1 см x 1 см), которые помещаются в чашку Петри под покрывное или предметное стекло (во избежание всплывания их в процессе культивирования), затем заливаются питательной средой, указанной выше. По мере культивирования таких фрагментов из них мигрируют фибробласты, образуя колонии на поверхности чашки Петри. Такие колонии выделяются, клетки пассируются, затем могут быть использованы в эксперименте или для приготовления клеточного продукта «Эквивалент дермальный». Фибробласты, полученные методом миграции, предпочтительнее для дальнейшего применения в медицинских целях, так как их поверхность не подвергается воздействию фермента.

9.3.1. Приготовление вариантов дермального эквивалента.

Дермальные фибробласты, заключенные в гель коллагена I типа, представляют собой аналог дермы. Источником коллагена I типа обычно служат шкуры или хвосты коров, телят, овец или сухожилия хвостов крысы. Способ выделения коллагена должен быть кислотным, при котором у молекулы коллагена сохраняются телопептидные последовательности, только в этом состоянии коллаген способен желировать. Коллаген, используемый в работе, должен быть стерильным. Соответственно, используется либо лиофилизированный коммерческий стерильный препарат, либо определяется способ стерилизации, не приводящий к утрате его способности к желированию. Одним из положительных свойств коллагена является чрезвычайно низкая способность вызывать иммунную реакцию организма пациента при его введении в рану.

Для приготовления клеточного продукта фибробласты в концентрации не менее 2-2.5 млн клеток вводятся в уксуснокислый раствор коллагена, куда добавляется 10-кратная среда 199 (для создания физиологической ионной силы), pH среды доводится до

нейтрального значения. Все процедуры выполняются на льду во избежание преждевременного желирования коллагена. Приготовленная смесь некоторое время культивируется в CO₂-инкубаторе до завершения желирования коллагена. Такой комплекс – фибробласты в коллагеновом геле – уже представляет собой клеточный продукт, который может быть транспортирован в клинику, перенесен из чашки Петри на неадгезивную повязку и вместе с ней трансплантирован на рану таким образом, чтобы повязка прикрывала эквивалент сверху. Затем поверх неадгезивной должна быть наложена обычная марлевая повязка. Дермальный эквивалент в таком виде удобен в работе: его можно помещать на рану в любом направлении, поскольку фибробласты не имеют четкой пространственной ориентации по сравнению с эпителиальными клетками. При необходимости эквивалент может быть разрезан на отдельные фрагменты для удобства закрытия раны.

Кроме того разработана другая модификация этого же клеточного продукта. Он готовится в полужидком виде, не допускается полное желирование коллагена путем содержания его на льду. Поэтому он готовится непосредственно перед отправкой в клинику и доставляется туда также в термосе со льдом. Эквивалент такой модификации имеет свои преимущества – его можно наносить на рану через шприц без иглы, при этом он равномерно распределяется по раневому ложу, заполняя всю поверхность. В некоторых случаях, когда в ране имеются углубления наподобие свищей, полужидкий эквивалент представляет собой большое удобство (рис.15).

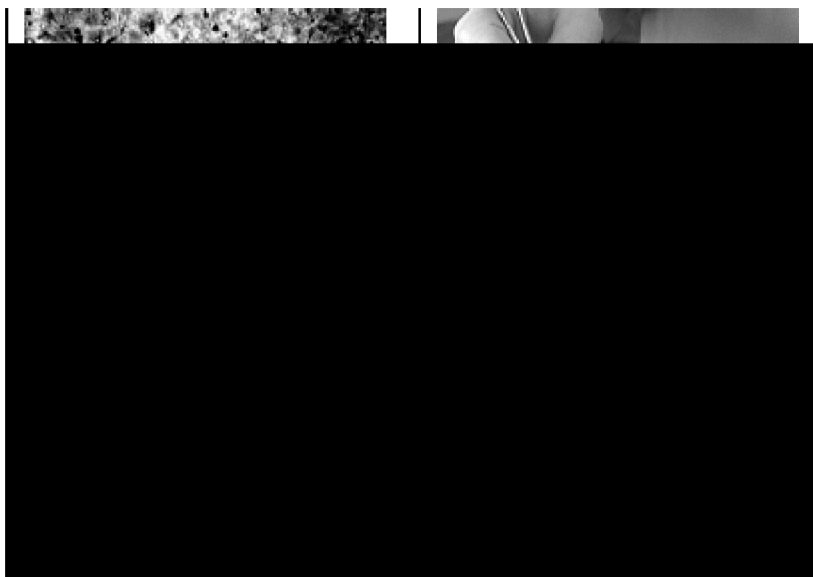


Рис.15 Применение дермального эквивалента в клинике.

а) фибробласты в коллагеновом геле, б) готовый дермальный эквивалент, в) дермальный эквивалент на неадгезивной повязке, г. нанесение полужидкого эквивалента на рану.

Дермальный эквивалент может быть приготовлен не только на основе коллагена. Поскольку при спонтанном заживлении раны в этом процессе принимает участие фибрин плазмы крови, образующийся в результате повреждения кровеносных сосудов, то вполне логично было использовать такой материал для формирования геля и внесения в него дермальных фибробластов. Кроме того, было обнаружено, что коллаген может оказывать влияние на состав белков внеклеточного матрикса продуцируемых фибробластами. Источником фибрина может служить как плазма крови самого пациента (т.е., аутологичный материал), так и фибриноген - коммерческий препарат, полученный из плазмы крови человека. Клинические исследования показали эффективность применения такого типа дермального эквивалента.

9.3.2. Влияние дермального эквивалента на заживление ран

Опыт Отдела клеточных культур Института цитологии РАН показал эффективность восстановления кожного покрова при использовании дермального эквивалента на основе коллагена с аллогенными фибробластами. Внесение в раневое ложе этого клеточного продукта способствует образованию субстрата, который необходим для миграции и адгезии на нем собственных кератиноцитов из ткани окружающей рану (краевая эпителизация), а также для миграции стволовых кератиноцитов, сохранившихся в волосяных фолликулах (островковая эпителизация). Таким образом, окончательное заживление раны происходит фактически за счет собственных (аутологичных) кератиноцитов (рис.15). В случаях, когда дермальный эквивалент использовали совместно с трансплантацией расщепленного кожного лоскута, было зафиксировано полное восстановление эпителия. Это было продемонстрировано в целом ряде случаев при ожогах, трофических язвах, травмах и т.п. Положительный клинический эффект был получен также при использовании дермального эквивалента, приготовленного на основе фибриногена, в заживлении свищей, образующихся в результате нарушений эпителиальной ткани толстого кишечника при болезни Крона. В результате хирургического метода лечения таких свищей, как обычно, через некоторое время наступал рецидив. Применение дермального эквивалента на основе фибриногена способствовало быстрому заживлению и в течение года таких последствий не наступало.

Имплантация в рану дермального эквивалента сопровождается, прежде всего, клиническим эффектом обезболивания. Из исследований различных авторов известно, что применение как свежеприготовленных, так и криозамороженных трансплантатов обеспечивает в одинаковой степени эпителизацию и, соответственно, заживление раны. Кроме всего прочего происходит синтез белков

внеклеточного матрикса, что приводит к миграции кератиноцитов из ткани, окружающей рану. В процесс заживления также могут быть вовлечены различные факторы роста, продуцируемые как кератиноцитами, так и фибробластами. К ним относятся: интерлейкины – 1, 3, 6, 8; трансформирующий фактор роста – TGF_{λ} и TGF_{β} ; фактор, стимулирующий образование гранулоцитарных-макрофагальных колоний – GM-CSF; основной фактор роста фибробластов – β -FGF; фактор некроза опухолей – TNF- λ . Они регулируют рост, дифференцировку и функции эпидермальных, дермальных и даже иммунокомпетентных клеток.

β -FGF, TGF_{λ} , IL-6, IL-1 – являются митогенами для кератиноцитов *in vitro*. Продуцирование IL-6 и TGF_{λ} увеличивается при гиперпролиферации клеток кожи в случае псориаза. TGF_{λ} усиливает миграцию кератиноцитов, в то время как, TGF_{β} усиливает дифференцировку кератиноцитов и продуцирование фибронектина.

IL-3 и 6 и GM-CSF стимулируют гемопоэз, воспалительную реакцию активацию и хемотаксис иммунных клеток. Увеличенные сывороточные уровни IL-6 были обнаружены в ожоговых ранах и при псориазе. IL-6 стимулирует продуцирование белков плазмы острой фазы.

Ангиогенез, который происходит при восстановлении ткани, индуцируется действием β -FGF, и TGF_{λ} , стимулирующих миграцию эндотелиальных клеток их пролиферацию и образование капилляров. Заживление дермальных ран ускоряется с помощью TGF_{β} и PDGF, которые являются хемоаттрактантами для фибробластов и стимулируют их деление и продукцию коллагена.

9.4. Эквивалент полной кожи

Несмотря на очевидные успехи с трансплантацией многослойных пластов кератиноцитов, по мере накопления опыта их клинического использования стало очевидным, что одних пластов кератиноцитов недостаточно для их хорошего прикрепления к раневому ложу и полноценной васкуляризации, а, соответственно,

хорошей эпителизации раны. Адгезия многослойных пластов кератиноцитов должна происходить лучше, если на раневом ложе будут присутствовать элементы дермы. Дермальные трансплантаты, обладающие низкой иммунной реакцией, будут поддерживать рост пластов кератиноцитов

Эти соображения привели к разработке комплексных клеточных продуктов, используя дермальный эквивалент как субстрат, поддерживающий рост посаженных на него кератиноцитов. При таком варианте культивирования морфология кератиноцитов должна была в большей степени соответствовать морфологии их в цельной коже и созревание (стратификация) ткани должно происходить на разделе фаз жидкой и воздушной. В месте взаимодействия базальных кератиноцитов и коллагена ряд авторов наблюдали образование полудесмосом и даже обнаруживали элементы дермоэпидермальных взаимодействий, а также коллаген IV типа и ламинин, (присутствующие в базальной мембране). Следовательно, такой комплексный продукт, объединяющий дермальный эквивалент и кератиноциты, образовавшие многослойный пласт, будет представлять собой некий аналог полной кожи, и уже до трансплантации на рану пласт будет обладать некоторыми свойствами кожной ткани, и лучше будет взаимодействовать с фиброваскулярными выростами раневого ложа после трансплантации.

Стандартный трансплантат расщепленного кожного лоскута, применяемого в обычной практике комбустиологии, содержит дермальные элементы, способствующие васкуляризации. Коллагеновый субстрат, который обеспечивает хороший рост кератиноцитов *in vitro*, нестабилен и быстро деградирует на раневом ложе, поэтому присутствие дермального эквивалента должно создавать наиболее адекватные условия для функционирования кератиноцитов и более полноценной эпителизации.

На лабораторных животных было показано что кератиноциты, культивируемые на дермальном эквиваленте, приготовленном с использованием коллагеноа I типа, успешно были трансплантированы на полнослойные раны. Кератиноциты хорошо растут на эпидермизованной дерме, т.е., на дерме, отделенной от эпидермиса и из которой удалены фибробласты. При трансплантации такой культуры на полнослойные раны у свиней обнаруживалась интенсивная реакция на чужеродное тело. Боска с соавторами трансплантировали бестимусным мышам многослойные пласты кератиноцитов, выросших на дермальных эквивалентах, приготовленных из фибробластов и коллагенов 1-го и 3-го типа, выделенных из тканей человека. Они наблюдали регенерацию эпидермиса на соединительной ткани, которая была похожа на неповрежденную дерму. Такой же эффект получили Бойс и Хэнсборух трансплантируя многослойный пласт кератиноцитов, выросший на дермальном эквиваленте, где в качестве субстрата был использован бычий коллаген I типа с добавлением хондроитин-сульфата (из семейства гликозаминогликанов). Другие авторы трансплантировали на раны морских свинок клеточный продукт, состоящий из коллагена с гликозаминогликанами, с заключенными в него аутологичными фибробластами и поверх такого субстрата росли аутологичные кератиноциты. Конфлуэнтный эпидермис был виден *in vivo* уже через 14 дней, а новая дерма сформировалась под ним через несколько недель. Безволосые трансплантаты были идентичны окружающей коже по цвету и структуре.

Создание и использование подобного полного аналога кожи в Отделе клеточных культур путем посадки базальных кератиноцитов на дермальный эквивалент подтвердило описываемые в литературе положительные свойства этого клеточного продукта. Проведенные клинические исследования продемонстрировали его преимущества при лечении ран.

9.5. Возможное применение других культивируемых клеток кожи.

9.5.1. Меланоциты. Нарушения пигментации, в результате таких заболеваний как травмы, витилиго, пибальдизм, альбинизм могут лечиться путем трансплантации культивируемых меланоцитов. Разработаны методы их культивирования. Так, например, пациенту с пибальдизмом трансплантировали культивируемые меланоциты в непигментированную зону, в которой отсутствуют меланоциты. Через 4 недели была отмечена тоненькая полоска репигментации, а через 6 месяцев было сообщено о блестящем результате восстановления пигментации, но без распределения ее за пределы зоны трансплантации. Ультраструктурные исследования показали, трансплантированные меланоциты находились в нормальном состоянии в базальном слое кератиноцитов и продуцировали меланин.

9.5.2. Возможные риски клинического использования культивируемых клеток.

Не следует забывать, однако, о некоторых возможных рисках в результате трансплантации клеточных продуктов, приготовленных с применением культивируемых клеток. Наиболее вероятным может оказаться возможность вирусного заражения реципиента от донора. Спонтанная трансформация кератиноцитов – чрезвычайно редкое явление; да и культивируются они недолго - не более 2-х недель, это чрезвычайно малый срок. Чаше может происходить трансформация меланоцитов.

9.6. Нормативно-техническая база для производства клеточных продуктов.

Таким образом, результаты фундаментальных исследований в области биологии клетки могут приводить, в конечном счете, к разработке клеточных технологий и созданию клеточных продуктов, используемых в клинической практике. Они будут служить основой

для дальнейшего развития биомедицинских клеточных технологий. Как всякие технологические продукты они должны производиться по определенным стандартным правилам, чтобы иметь юридические основания быть применяемыми в реальной практике. На каждый клеточный продукт как на изделие медицинского назначения должна быть составлена нормативно-техническая документация в виде «Технических условий», описывающих состав, структуру продукта, условия приготовления, хранения, транспортировки, методы контроля качества. Кроме того, должны быть составлены технические условия и на все сопутствующие материалы, необходимые для производства клеточного продукта. Эти технические условия должны быть зарегистрированы в соответствующих государственных учреждениях. Затем клеточный продукт должен пройти все необходимые виды испытаний. **Технические** - проверка герметичности сосуда, в котором находится продукт; состояние продукта в указанном диапазоне температур при транспортировке; механические воздействия в процессе транспортировки – тряска, вибрация и т.п., **Токсикологические** - проверка на аллергенность, цитотоксичность, пирогенность клеточного продукта в соответствии с указанными в технических условиях данными и в соответствии с международными стандартами. **Клинические** - клинический результат по заживлению в соответствии с указанными в технических условиях для клеточного продукта параметрами. После испытаний продукт должен пройти экспертизу соответствующих специалистов и быть зарегистрированным в Росздравнадзоре в качестве изделия медицинского назначения для серийного производства и клинического применения.

Непосредственное изготовление клеточных продуктов должно осуществляться строго в соответствии с производственным регламентом, составленным для каждого продукта, с учетом всех особенностей данного продукта и содержащим описание условий и

последовательности всех технологических операций при изготовлении продукта. Регламент – основной документ для производства продукта. Приготовление продуктов должно производиться в производственных помещениях, оборудованных по международным стандартам GMP (General Medical Production). Назначение стандартов GMP – избежать вирусной контаминации клеточных продуктов. Для этого предназначено использование определенного необходимого оборудования и необходимых служб при работе с клеточными культурами, обеспечивающих стерильность и отсутствие контаминации, сохранения, оценки и контроля качества продукта и сопутствующих материалов. Вся система должна быть нацелена на обучение персонала воспроизводимости операций, безопасности, качеству продукции и поддержанию требований для каждой производственной зоны. Такое производственное помещение должно быть сертифицировано соответствующей организацией и лицензировано для производства клеточных продуктов, используемых в клинической практике. В соответствии с этим медицинские учреждения могут получить лицензию на применение указанных продуктов для лечения пациентов.

10. Устранение дефектов костной и хрящевой тканей с помощью клеточных технологий.

10.1. Особенности организации костной и хрящевой тканей

Современные методы фенотипирования и анализа функциональной активности *in vitro* стволовых клеток (СК) позволили их найти во многих тканях взрослого организма. Однако это не означает, что пропал интерес к комитированным (транзиторным) и дифференцированным клеткам, принадлежащим к одному дифферону, выделяемым из различных соединительных и эпителиальных тканей и представляющим большой интерес как для изучения различных аспектов гистогенеза тканей, так и для

использования этих клеток в регенеративной медицине. На базе современных исследований в молекулярной биологии и гистологии изменились некоторые представления, связанные с дифференцировкой клеток, например, совокупность клеточных форм, составляющих линию дифференцировки, характеризуют как дифферон, или гистогенетический ряд. Дифферон образуют несколько групп клеток: 1) стволовые клетки, 2) клетки-предшественницы, 3) зрелые дифференцированные клетки, 4) стареющие и отмирающие клетки. Стволовые клетки — исходные клетки гистогенетического ряда — это самоподдерживающаяся популяция клеток, способных дифференцироваться в различных направлениях. Обладая высоким пролиферативным потенциалом, сами они *in vivo* делятся очень редко. Стволовые клетки и клетки-предшественницы трудно разделить. Их поэтому можно в совокупности отнести к транзиторным стволовым клеткам. При анализе гистогенеза тканей *in vivo* более удобно использовать описание клеточного дифферона, в то время как *in vitro* клетки после направленной дифференцировки не во всех отношениях соответствуют тому или иному типу клеток исследуемого дифферона.

Остановимся на двух наиболее хорошо изученных типах транзиторных стволовых клеток твердых соединительных скелетных тканей: остеогенных и хондрогенных клетках, входящих в состав костного и хрящевого дифферонов. Их выделяют из костной и хрящевой тканей, исполняющих опорную и механическую функции, обусловленные наличием плотного внеклеточного вещества. Помимо опорной функции, скелетные ткани принимают участие в водно-солевом обмене, - в основном, солей кальция и фосфатов. Как и все прочие ткани внутренней среды организма, скелетные ткани развиваются из мезенхимы, - точнее из той мезенхимы, что выселяется из склеротомов мезодермы.

10.2. Особенности организации внеклеточного матрикса костной и хрящевой тканей.

Если обратиться непосредственно к анализу хрящевой и костной тканей, то вследствие общего происхождения и участия в организации скелета они имеют много общих черт морфологии и гистогенеза. Первой важной особенностью этих тканей является наличие высоко организованного плотного **внеклеточного матрикса**, обеспечивающего прочность, эластичность и другие важные функции ткани. Костная ткань является биологическим композитом, основу которого составляет волокнистая соединительная ткань, находящаяся в тесной связи с минерализованным основным веществом и населяющими весь композит клетками. Главными компонентами костной ткани являются: волокнистые коллагеновые структуры (коллаген I и V типов), минерализованное основное вещество, костные клетки, система интерстициальных каналов.

Волокнистые коллагеновые структуры включают молекулы коллагена, микрофибриллы, фибриллы, волокна и волокнистые комплексы. Основой этих структур является коллаген, который составляет около 95% органического матрикса кости. Кроме коллагена в основном веществе костной ткани были обнаружены неколлагеновые белки (остеокальцин, сиалопротеин, остеонектин, различные фосфопротеины, протеолипиды), принимающие участие в процессах минерализации, а также гликозаминогликаны. Основное вещество кости содержит кристаллы гидроксиапатита, упорядоченно расположенные по отношению к фибриллам органической матрицы кости, а также аморфный фосфат кальция.

Аналогично кости, в хрящевой ткани главными компонентами являются клетки и внеклеточный матрикс. Межклеточного вещества в хрящевой ткани больше, чем клеток. Оно отличается гидрофильностью и упругостью. Именно с упругостью межклеточного вещества связана опорная функция хрящевых тканей.

Хрящевая ткань значительно гидратирована, - в свежей ткани содержится до 80% воды. Более половины объема «сухого» вещества хрящевой ткани составляет коллаген II типа. В хрящах в отличие от костей отсутствуют сосуды, поэтому питательные вещества диффундируют из окружающих тканей. Межклеточное вещество хрящевой ткани (внеклеточный матрикс) состоит из волокон и основного, или аморфного, вещества. Большинство волокон представлено коллагеновыми волокнами, а в эластических хрящах – еще и эластическими волокнами. Основное вещество содержит воду, органические вещества и минеральные вещества. Органический компонент представлен протеогликанами и гликопротеинами. Протеогликановые агрегаты обладают высокой гидрофильностью, т.е. связывают большое количество воды и обеспечивают тем самым высокую упругость хряща, сохраняя проницаемость для низкомолекулярных метаболитов.

Таким образом, для межклеточного вещества костной и хрящевой тканей характерно наличие высоко организованных фибриллярных компонентов на основе коллагенов I или II типа или эластина, а также межфибриллярного минерализованного вещества (костная ткань) либо аморфного вещества (хрящевая ткань).

Именно, исходя из особенностей строения межклеточного вещества, костную и хрящевую ткани делят на несколько видов: костную – на ретикулофиброзную (грубоволокнистую) и пластинчатую, а хрящевую – на гиалиновую, эластическую и волокнистую, или фиброзную.

В грубоволокнистой костной ткани коллагеновые волокна образуют толстые пучки, идущие в разных направлениях, а в пластинчатой ткани костное вещество (клетки, волокна, матрикс) образуют системы пластинок. Ретикулофиброзная костная ткань встречается главным образом у зародышей. У взрослых ее можно

обнаружить на месте заросших черепных швов, в местах прикрепления сухожилий к костям. Пластинчатая костная ткань — наиболее распространенная разновидность костной ткани во взрослом организме. Она состоит из костных пластинок. Толщина и длина последних колеблется от нескольких десятков до сотен микрометров. Они не монолитны, а содержат фибриллы, ориентированные в различных плоскостях.

Гиалиновая хрящевая ткань, называемая еще стекловидной — в связи с ее прозрачностью и голубовато-белым цветом - во взрослом организме встречается на суставных поверхностях костей, в местах соединения ребер с грудиной, в гортани и воздухоносных путях. Большая часть встречающейся в организме у человека гиалиновой хрящевой ткани покрыта надхрящницей и представляет собой вместе с пластинкой хрящевой ткани анатомические образования — хрящи. В надхрящнице выделяют два слоя: наружный, состоящий из волокнистой соединительной ткани с кровеносными сосудами; и внутренний, преимущественно клеточный. Распределение белков и протеогликанов межклеточного вещества неравномерное. Структурной особенностью гиалинового хряща суставной поверхности является отсутствие надхрящницы на поверхности, обращенной в полость сустава.

Второй вид хрящевой ткани - эластическая хрящевая ткань - встречается в тех органах, где хрящевая основа подвергается изгибам (в ушной раковине, рожковидных и клиновидных хрящах гортани и др.). В свежем, нефиксированном состоянии эластическая хрящевая ткань бывает желтоватого цвета и не такая прозрачная, как гиалиновая. По общему плану строения эластический хрящ сходен с гиалиновым.

Третий вид хрящевой ткани - волокнистая, или фиброзная, хрящевая ткань находится в межпозвоночных дисках, полуподвижных сочленениях, в местах перехода плотной волокнистой соединительной ткани сухожилий и связок в гиалиновый хрящ, где ограниченные движения сопровождаются сильными натяжениями. Межклеточное вещество содержит параллельно направленные коллагеновые пучки, постепенно разрыхляющиеся и переходящие в гиалиновый хрящ.

10.3. Особенности развития и регенерации костной и хрящевой тканей

Развитие костной ткани у эмбриона осуществляется двумя способами:

- 1). Непосредственно из мезенхимы, - прямой остеогенез. Такой способ остеогенеза характерен для развития грубоволокнистой костной ткани при образовании плоских костей, например покровных костей черепа. Этот процесс наблюдается в основном в течение первого месяца внутриутробного развития и характеризуется образованием сначала первичной «перепончатой», остеонидной костной ткани с последующим отложением солей кальция, фосфора и др. в межклеточном веществе.
- 2). Из мезенхимы на месте ранее развившейся хрящевой модели кости, - это непрямой остеогенез. На 2-м месяце эмбрионального развития в местах будущих трубчатых костей закладывается из мезенхимы хрящевой зачаток, который очень быстро принимает форму будущей кости (хрящевая модель). Зачаток состоит из эмбрионального гиалинового хряща, покрытого надхрящницей. Некоторое время он растет как за счет клеток, образующихся со стороны надхрящницы, так и за счет размножения клеток во внутренних участках. Развитие кости на месте хряща, т.е. непрямой остеогенез, начинается в области диафиза (т.н. перихондральное

окаменение). Образованию перихондральной костной манжетки предшествует разрастание кровеносных сосудов. Происходит дифференцировка остеобластов, образующих в виде манжетки сначала ретикулофиброзную костную ткань (первичный центр окостенения), заменяющейся пластинчатой костной тканью.

Источником развития хрящевых тканей является мезенхима. В первой стадии клетки мезенхимы теряют свои отростки, плотно прилегают друг к другу, формируют хондрогенные островки. Находящиеся в их составе стволовые клетки дифференцируются в хондробласты. В следующей стадии образуется первичная хрящевая ткань. Клетки центрального участка хондрогенного островка округляются, увеличиваются в размере, в них начинается синтез и секреция фибриллярных белков (коллагена II типа). На стадии дифференцировки хрящевой ткани хондроциты приобретают способность синтезировать гликозаминогликаны и протеогликаны. По периферии хрящевой закладки, на границе с мезенхимой, формируется **надхрящница** — оболочка, покрывающая развивающийся хрящ снаружи. Во внутренней зоне надхрящницы клетки интенсивно делятся, дифференцируются в хондробласты. В процессе секреции и наслаивания на уже имеющийся хрящ сами клетки «замуровываются» в продукты своей деятельности. Так происходит рост хряща способом наложения, или его аппозиционный (периферический) рост. Хрящевые клетки, лежащие в центре молодого развивающегося хряща, сохраняют способность в течение некоторого времени делиться митотически, оставаясь в одной лакуне (изогенные группы клеток), и вырабатывать коллаген II типа. За счет увеличения количества этих клеток происходит увеличение массы хряща изнутри, что называется интерстициальным ростом. Интерстициальный рост наблюдается в эмбриогенезе, а также при регенерации хрящевой ткани.

Постэмбриональное развитие костной ткани происходит при ее физиологической и репаративной регенерации. Присутствие хрящевой пластинки в зоне роста кости является существенным фактором для ее развития и роста. Хрящ делает возможным рост в длину большинства костей и играет важную роль при определении их размера и формы. С момента рождения кость постоянно растет, и некоторые хрящи зоны роста кости продолжают существовать в постнатальном развитии вплоть до того момента, когда рост кости в длину прекращается (у человека 18-25 лет).

Физиологическая регенерация костных тканей происходит медленно за счет остеогенных клеток надкостницы, эндоста и остеогенных клеток в каналах остеонов. Посттравматическая регенерация костной ткани протекает лучше в тех случаях, когда концы сломанной кости не смещены относительно друг друга, и сохранена надкостница. Процессу остеогенеза предшествует формирование соединительнотканной мозоли, в толще которой могут образовываться хрящевые островки. Это имеет большое физиологическое значение, т.к. обеспечивает быстрое обездвижение костных отломков, необходимое для дальнейшего их сращения. Хрящевая ткань образуется гораздо быстрее, чем костная, и обладает достаточной плотностью, чтобы первично фиксировать отломки. Фиксация отломков обеспечивает состояние покоя, необходимое для основного процесса репаративной регенерации кости — образования интермедиарной костной мозоли непосредственно по линии перелома.

Физиологическая регенерация хрящевой ткани осуществляется за счет мало специализированных клеток надхрящницы и хряща путем размножения и дифференцировки хондрогенных клеток и хондробластов. Однако этот процесс идет очень медленно. Посттравматическая регенерация хрящевой ткани внесуставной

локализации осуществляется за счет надхрящницы. Восстановление может происходить за счет клеток окружающей соединительной ткани, не потерявших способности к метаплазии (т.е. превращения фибробластов в хондробласты). В суставном хряще в зависимости от глубины травмы регенерация происходит как за счет размножения клеток в изогенных группах (при неглубоком повреждении), так и за счет второго источника регенерации — камбиальных клеток субхондральной костной ткани (при глубоком повреждении хряща). В любом случае непосредственно в области травмы хрящевой ткани отмечаются дистрофические процессы, а далее располагаются пролиферирующие хондроциты. В течение первых 1—2 месяцев с момента травмы сначала образуется грануляционная ткань, состоящая из молодых фибробластов, постепенно замещающихся хрящеподобной (хондроидной) тканью, активно синтезирующей протеогликаны и коллаген II типа. Через 3—6 месяцев регенерат обретает сходство с гиалиново-фиброзным молодым хрящом.

Соединительные ткани с возрастом претерпевают изменения в строении, количестве и химическом составе. С возрастом увеличивается общая масса соединительнотканых образований. Во многих разновидностях соединительнотканых структур изменяется соотношение типов коллагена, гликозаминогликанов; в частности, в них становится больше сульфатированных соединений. Так, по мере старения организма в хрящевой ткани уменьшаются концентрация протеогликанов и связанная с ними гидрофильность ткани. Ослабляются процессы размножения хондробластов. На структуру и функцию костной и хрящевой тканей оказывают влияние витамины С, А, D, гормоны щитовидной, околощитовидной и других эндокринных желез.

Таким образом, развитие и регенерация костной и хрящевой тканей тесно связаны. Быстрый рост и созревание хрящевой ткани в

эмбриогенезе и в постнатальном периоде оказывает решающее влияние на остеогистогенез. С другой стороны, при повреждении суставов во взрослом организме источником регенерации хрящевой ткани могут служить остеогенные клетки эндоста.

10.4. Клеточный состав костной и хрящевой тканей

Одной из важнейших особенностью костной и хрящевой тканей является то, что их клетки синтезируют и формируют описанный ранее внеклеточный матрикс, который, в свою очередь, влияет на функциональную активность клеток и морфофункциональные свойства ткани. В процессе развития костной и хрящевой ткани из мезенхимы образуются остеогенный и хрящевой диффероны: стволовые транзиторные клетки и клетки-предшественницы (остеогенные или хондрогенные клетки), остеобласты или хондробласты и остеоциты или хондроциты.

Остеогенные клетки находятся преимущественно в составе внутреннего слоя надкостницы (периоста) и эндоста, который выстилает поверхность всех полостей компактной и губчатой кости. Остеогенные клетки в центральных каналах служат источником костных клеток, создающих новые гаверсовы системы. Остеогенные клетки могут присутствовать в составе костного мозга. Ранее выделяли два типа остеогенных клеток: покоящиеся и активированные. Покоящиеся недифференцированные клетки имеют вытянутую веретенообразную форму (сходны со стволовыми клетками). Активированные остеогенные клетки округлой формы, в их ядре и цитоплазме повышено содержание РНК, что указывает на активацию роста и дальнейшей дифференцировки.

Остеобласты — клетки, синтезирующие большую часть органического костного матрикса (коллаген, гликозаминогликаны и

др.) в период костеобразования. В кости они встречаются только в надкостнице. Они способны к пролиферации. В образующейся кости остеобласты покрывают почти непрерывным слоем всю поверхность развивающейся костной балки. Форма остеобластов бывает различной: кубической, пирамидальной или угловатой. Размер их около 15—20 мкм. Ядро округлой или овальной формы, часто располагается эксцентрично, содержит одно или несколько ядрышек. В цитоплазме остеобластов хорошо развиты гранулярная эндоплазматическая сеть, митохондрии и аппарат Гольджи. В ней выявляются в значительных количествах РНК и высокая активность щелочной фосфатазы.

Остеоциты — зрелые дифференцированные костные клетки, утратившие способность к делению, обеспечивающие целостность костного матрикса и участвующие в регуляции его гомеостаза. Они имеют отростчатую форму, компактное, относительно крупное ядро и слабобазофильную цитоплазму. Органеллы развиты слабо. Остеоциты расположены в костных лакунах, образованных коллагеновыми фибриллами и минерализованным основным веществом. Между клетками и стенками лакун имеется остеоидный слой неминерализованного матрикса, состоящий из коллагеновых фибрилл и основного вещества. В цитоплазме остеоцитов значительно меньше органелл, чем у остеобластов.

В составе костной ткани присутствуют также особые клетки, осуществляющие резорбцию костной ткани - **остеокласты** - это клетки гемопозитической природы со свойствами макрофагов, способные разрушать обызвествленный хрящ и кость. Диаметр их достигает 90 мкм и более, и они содержат от 3 до нескольких десятков ядер. Цитоплазма слабобазофильна, иногда оксифильна. Остеокласты располагаются обычно на поверхности костных перекладин. Та сторона остеокласта, которая прилежит к

разрушаемой поверхности, богата цитоплазматическими выростами; она является областью синтеза и секреции гидролитических ферментов. По периферии остеокласта находится зона плотного прилегания клетки к костной поверхности, которая герметизирует область действия ферментов. Эта зона цитоплазмы светлая, содержит мало органелл, за исключением микрофиламентов, состоящих из актина. Периферический слой цитоплазмы над гофрированным краем содержит многочисленные мелкие пузырьки и более крупные — вакуоли. Полагают, что остеокласты выделяют CO_2 в окружающую среду, а фермент карбоангидраза способствует образованию кислоты H_2CO_3 и растворению кальциевых соединений. Остеокласты богаты митохондриями и лизосомами, ферменты которых (коллагеназа и другие протеазы) расщепляют коллаген и протеогликаны матрикса костной ткани. Считается, что один остеокласт может разрушить столько кости, сколько создают 100 остеобластов за это же время. Функции остеобластов и остеокластов взаимосвязаны и регулируются гормонами, простагландинами, функциональной нагрузкой, витаминами и др.

Хондробласты — это молодые уплощенные клетки, способные к пролиферации и синтезу межклеточного вещества хряща (протеогликанов и коллагена II типа). Цитоплазма хондробластов имеет хорошо развитую гранулярную и агранулярную эндоплазматическую сеть, аппарат Гольджи. При окрашивании цитоплазма хондробластов оказывается базофильной в связи с богатым содержанием РНК. При участии хондробластов происходит периферический (аппозиционный) рост хряща. Эти клетки в процессе развития хряща превращаются в хондроциты.

Хондроциты — основной вид клеток хрящевой ткани. Они бывают овальными, округлыми или полигональной формы — в зависимости от степени дифференцировки. Расположены хондроциты в особых

полостях (лакунах) в межклеточном веществе поодиночке или группами. Группы клеток (2-6 штук), лежащие в общей полости, называются изогенными. Они образуются путем деления одной клетки. В изогенных группах различают три типа хондроцитов.

Хондроциты I типа характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Они часто делятся, т.е. являются источником репродукции изогенных групп клеток (по 2-6 штук), расположенных в специальных лакунах межклеточного матрикса хряща. Хондроциты I типа преобладают в молодом, развивающемся хряще. Они синтезируют межклеточное вещество хряща (протеогликаны и коллаген II типа)

Хондроциты II типа отличаются сниженным ядерно-цитоплазматическим отношением. Они обеспечивают образование и секрецию протеогликанов и коллагена II типа в межклеточное вещество.

Хондроциты III типа отличаются самым низким ядерно-цитоплазматическим отношением, сильным развитием и упорядоченным расположением гранулярной эндоплазматической сети. Эти клетки сохраняют способность к образованию и секреции белка (коллагена II типа), но в них снижается синтез гликозаминогликанов и протеогликанов.

В резорбции дистрофически измененных клеток хряща и межклеточного вещества участвуют **хондрокласты**. Часть лакун после гибели хондроцитов заполняется аморфным веществом и коллагеновыми фибриллами. Местами в межклеточном веществе обнаруживаются отложения солей кальция («омеление хряща»), вследствие чего хрящ становится мутным, непрозрачным, приобретает твердость и ломкость. В результате появляющееся нарушение трофики центральных участков хряща может привести к

врастанию в них кровеносных сосудов с последующим костеобразованием. Хондрокласты препятствуют этому процессу.

Таким образом, в костном и хрящевом дифферонах количество подгрупп клеток и основные их функции, состоящие в формировании межклеточного матрикса, близки. Различия состоят в особенностях гистогенетической активности и как следствие этого в маркерах дифференцировки – белках (коллагены I и II типа), гликопротеинах (морфологические белки кости), протеогликанах (хондроитинсульфаты хряща), минеральных (гидроксиапатит и фосфат кальция кости) и других компонентах. На пролиферацию и дифференцировку хрящевых и костных клеток влияют различные биологически активные вещества, в том числе витамины и гормоны.

10.5. Выделение, культивирование и исследование дифференцировки и пролиферации костных и хрящевых клеток

Приблизительно с 70-х годов 20 века, благодаря развитию технологий культивирования клеток (разработке питательных и ростовых сред, пластиковой посуды, криоконсервации клеток, специальных термостатов), стали развиваться методы выделения и культивирования на плоскости клеток из различных тканей многоклеточных организмов. В том числе были разработаны условия для культивирования клеток костной и хрящевой тканей. Из изложенных ранее сведений о способности этих тканей к физиологической и посттравматической регенерации следует, что часть их клеток (стволовых и комитированных клеток-предшественниц) обладает пролиферативным потенциалом. Это было подтверждено при культивировании выделенных клеток.

Для выделения клеток костной ткани стерильно изолированные кости очищают от мышечной и соединительной тканей, костного мозга и механически либо с помощью ферментативной обработки

(например, в растворе коллагеназы 1 типа) получают фракцию остеогенных и дифференцированных клеток эндоста, фермент инактивируют с помощью ростовой питательной среды с сывороткой. Суспензию клеток фильтруют через капроновый фильтр, осаждают клетки центрифугированием при 200 g, подсчитывают и высевают в ростовой среде с сывороткой в концентрации 1×10^5 клеток/см². Наиболее часто для культивирования клеток используют ростовую среду, состоящую из смеси DMEM либо DMEM/F12 с 10% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) и антибиотиками. В некоторых случаях в среду добавляют аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл). На базе полученной первичной культуры клеток исследовали их дифференцировку в остеогенном направлении. Для этого меняли ростовую среду на дифференцировочную, содержащую те или иные индукторы остеогенной дифференцировки: дексаметазон, аскорбиновую кислоту, витамин Д₃, морфогенетические белки кости (1-4) или различные их комбинации. Для первичной культуры остеогенных клеток крысы были исследованы порядок и сроки появления тех или иных маркеров остеогенной дифференцировки (щелочной фосфатазы, остеопонина, остеокальцина и минерализованного матрикса), а также их относительные количества по сравнению с контрольными недифференцированными клетками. Кроме того, были исследованы особенности прохождения остеогенеза на моделях остеобластов в культуре: постоянных трансформированных линиях человека (HOS – остеосаркома человека) и крысы (ROS – остеосаркома крысы).

Были разработаны методы трансформации первичных остеогенных клеток крысы или мыши с помощью онко-вирусов, например, с помощью вируса Эпштейна-Бара. Полученные таким образом иммортализованные клеточные линии в течение длительного времени сохраняли способность к индуцированной остеогенной дифференцировке. Однако такие иммортализованные клетки не могут быть использованы в регенеративной медицине в связи с

возможностью дальнейшей трансформации и нестабильностью способности к дифференцировке.

Для выделения клеток хрящевой ткани стерильно изолированные хрящи очищают от прилегающих к ним тканей (костной, сосудистой, рыхлой соединительной), измельчают их механически и подвергают ферментативной обработке (например, в растворе коллагеназы 1). Далее фермент инактивируют, клетки осаждают, подсчитывают и высевают в концентрации, как и в случае костных клеток. Для культивирования клеток используют ростовую среду, состоящую из смеси DMEM, MEM, DMEM/F12 или α MEM с 10% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) и антибиотиками. На базе полученной первичной культуры клеток исследовали их дифференцировку в хондрогенном направлении. Для этого меняли ростовую среду на дифференцировочную, содержащую те или иные индукторы хондрогенной дифференцировки: дексаметазон, аскорбиновую кислоту, инсулин, трансформирующие факторы роста – TGF β (1, 3) или различные их комбинации. Для первичной культуры хондрогенных клеток крысы были исследованы порядок и сроки появления тех или иных маркеров хондрогенной дифференцировки (коллагена II типа, протеогликанов), а также их относительные количества по сравнению с контрольными недифференцированными клетками. На плоскости дифференцировка проходила медленно и в ограниченных участках культуры клеток. Далее был разработан метод хондрогенной дифференцировки в трехмерных агрегатах клеток. Для этого изолированные культивированные клетки хряща снимали с подложки, осаждали центрифугированием в конической гидрофобной пробирке и добавляли к ним дифференцировочную бессывороточную среду. Проводили гистохимические и иммуногистохимические исследования срезов сформировавшихся агрегатов клеток. Во внеклеточном матриксе обнаруживали коллаген II типа и

сульфатированные протеоглики хряща. Культивируемые клетки хряща в отличие от костных клеток были способны к длительной пролиферации в культуре в течение нескольких месяцев, однако через некоторое время теряли способность к индуцированной хондрогенной дифференцировке. Модель хондрогенной дифференцировки продолжают совершенствовать, например, формируя многослойные культуры клеток при их центрифугировании на мембранных фильтрах.

В последние годы было установлено, что культивируемые клетки хряща обладают свойствами МСК (мезенхимальных стволовых клеток): они имеют соответствующий иммунофенотип (CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻), способны к длительной пролиферации и к мультипотентной дифференцировке в 3-х ортодоксальных направлениях: хондрогенном, адипогенном, остеогенном. При сравнении хондрогенных пластов, формируемых на мембранных фильтрах различными МСК: из костного мозга, хряща, синовиальной жидкости, жировой ткани, - было показано, что хрящевые клетки в равных условиях формируют пласт большего объема, то есть продуцируют большее количество межклеточного матрикса.

На основании полученных данных можно предположить успешное использование культивируемых хрящевых клеток в регенеративной медицине. Наибольшую сложность здесь представляет получение достаточных биоптатов для выделения хондрогенных клеток.

10.6. Перспективы использования аутологичных и аллогенных культивируемых клеток кости и хряща в регенеративной медицине

В данном случае речь пойдет о применении культивируемых клеток кости и хряща в травматологии, ортопедии и пластической хирургии, для чего необходимо создание тканеинженерных трансплантатов. Для этого нужно решить 4 основные задачи:

- 1- выбрать, какие клетки, аутологичные или аллогенные целесообразно использовать для каждой конкретной трансплантации;
- 2 - стандартизировать получение от пациентов строго определенный биопсийный материал, в состав которого входят, клетки, способные пролиферировать и дифференцироваться *in vivo* и *in vitro* в соответствующих гистогенетических направлениях;
- 3 - оптимизировать условия выделения и культивирования клеток с целью обеспечения максимума жизнеспособности и пролиферации;
- 4 - разработать методику введения выращенных клеток, обогащенных малодифференцированными предшественниками, в дефект ткани и отработать методику оценки процесса регенерации ткани.

Попробуем охарактеризовать каждую из поставленных задач. В регенеративной медицине идут постоянные дебаты о том, какие клетки использовать при трансплантациях, аутологичные или аллогенные. Ответ в настоящее время таков: аутологичные клетки целесообразно использовать при плановых трансплантациях в ортопедии и пластической хирургии при отсутствии противопоказаний к их использованию (онкологических и генетических заболеваний, тяжелых хронических инфекций). Аллогенные клетки от тщательно подобранных иммуносовместимых доноров успешно используют при трансплантациях костного мозга в гематологии. Кроме того, в ожоговой терапии, флебологии и

стоматологии используют дермальные эквиваленты с аллогенными фибробластами. Поэтому, в травматологии и пластической хирургии в связи со значительными нарушениями костной и хрящевой тканей также целесообразно использовать аллогенные гистосовместимые клетки. Такими клетками являются МСК костного мозга или жировой ткани. Что же касается культивируемых костных и хрящевых клеток, то у них могут экспрессироваться антигены гистосовместимости и поэтому в таком случае необходим аккуратный подбор донора.

В настоящее время существует много сходных между собой протоколов выделения культивируемых клеток кости и хряща, о чем уже было сказано ранее. Поэтому, вторая и третья задачи фактически решены. Следует только тщательно применять уже разработанные методы, учитывая при этом, что все используемые среды, реактивы и посуда должны быть высокого качества. При стандартизации всех методов следует помнить об индивидуальных особенностях доноров клеток. Количество и свойства транзиторных стволовых остеогенных или хондрогенных клеток зависит от возраста донора и состояния его здоровья.

Наконец, последняя четвертая задача включает в себя непосредственно создание и тестирование на экспериментальных модельных дефектах костной и хрящевой тканей тканеинженерных эквивалентов, представляющих собой гистосовместимые носители, заселенные только что выделенными или культивируемыми клетками.

В качестве носителей, заселенных клетками, для трансплантаций в костную ткань используют кальцийфосфатные материалы, гидроксиапатиты, гели коллагена 1 типа, деминерализованный костный матрикс (ДКМ), биоситаллы. Все эти соединения входят в состав межклеточного матрикса костной ткани, либо обладают свойствами, близкими к таким природным соединениям (это относится к биоситаллу). Заселенные клетками

имплантаты должны быть прочными, биodeградируемыми, остеосовместимыми и остеoиндуктивными. Одним из таких материалов является деминерализованный костный матрикс, заселенный аутологичными МСК костного мозга в комплексе с остеогенными клетками эндоста. В разработке и тестировании (в модельных ранах черепа или трубчатой кости) такого имплантата участвовали сотрудники Отдела клеточных культур Института цитологии РАН, Военно-медицинской академии, Института травматологии и ортопедии им. Вредена (Санкт-Петербург). Данная технология и полученные на ее основе препараты продемонстрировали положительный эффект на экспериментальных животных, но должны еще пройти клинические испытания на человеке.

Не смотря на многочисленные зарубежные разработки в таких ведущих в области регенеративной медицины странах, как США, Япония, Германия, к настоящему времени в доступной литературе приводится только препарат Osteocel plus, содержащий аллогенный костный матрикс с МСК костного мозга. Препарат этот находится в стадии доклинических испытаний. Кроме того, разрабатывают препарат BioSeed - Oral Bone, являющийся тканеинженерным аутологичным трансплантатом костной ткани.

В качестве носителей, заселенных клетками, для трансплантаций в хрящевую ткань используют гели коллагена 1 типа и биodeградируемые полимерные матрицы, например из полилактида. Эти материалы при соответствующей плотности и пористости обладают достаточной прочностью и эластичностью и по этим свойствам близки к межклеточному матриксу хрящевой ткани. Сотрудниками Отдела клеточных культур Института цитологии РАН совместно с Научно-исследовательским детским ортопедическим институтом им. Г.И. Турнера Росмедтехнологий были разработаны имплантаты на основе аллогенных МСК костного мозга или

хондрогенных клеток хряща, заселенных в плотный гель коллагена 1 типа. Такие имплантаты вводили в экспериментально разрушенную зону роста кости кролика. Согласно предварительным данным имплантаты с МСК костного мозга оказывают положительное действие на жизнеспособность подопытных животных, однако, при этом в опыте не наблюдали полного восстановления хондрогенеза зоны роста и нормализации остеогенеза кости.

Применение аллогенных и аутологичных МСК на деминерализованном костно-хрящевом матриксе приводит к ускорению ремоделирования костных и хрящевых структур суставов, но в небольшом объеме. Необходимы дальнейшие исследования по созданию имплантатов, способствующих регенерации хрящевой ткани, особенно, в зоне роста кости. Такие исследования давно проводят за рубежом, но успехи пока невелики. Например, разработана и применяется в регенеративной медицине технология с применением препаратов из аутологичных культивируемых хондроцитов (Carticel), выделенных из суставного хряща, для регенерации нарушенной гиалиновой хрящевой ткани. В стадии экспериментальной апробации находится ряд препаратов на основе аутологичных хондроцитов в биodeградирующем матриксе из волокнистого материала (BioSeed – C).

Таким образом, к настоящему времени нет значительных успехов по созданию тканеинженерных эквивалентов, способствующих регенерации костной и хрящевой тканей. Однако в этом направлении ведется много экспериментальных работ, результаты которых могут быть использованы в регенеративной медицине. На основании собственных и литературных данных, мы приходим к выводу о возможности использования для регенерации костной и хрящевой ткани имплантатов на основе биodeградируемых матриц (из коллагена 1 типа, ДКМ), заселенных аутологичными или аллогенными МСК костного мозга, либо аутологичными остеобластами или хондроцитами. По литературным данным для

трансплантаций в хрящевую ткань можно использовать суспензии аутологичных культивируемых хондроцитов. При заселении тканеинженерных эквивалентов аллогенными клетками следует обращать внимание на отсутствие на поверхности клеток антигенов гистосовместимости. Свойства биodeградируемых матриц, являющихся основой тканеинженерных эквивалентов, должны быть близки к свойствам соответствующих внеклеточных матриксов.

11. Инфраструктура, и оборудование необходимые для разработки клеточных технологий и создания клеточных продуктов.

Разработка клеточных технологий и создание клеточных продуктов предназначенных к использованию в регенеративной медицине для восстановления структурной целостности и функциональной активности поврежденных органов и тканей - сложный процесс, требующий надежного технического обеспечения. Такое обеспечение может быть достигнуто только при организации развитой системы основных и вспомогательных операций в процессе проводимых исследований, разработок и приготовления готовых клеточных продуктов. Другими словами должна быть создана инфраструктура, необходимая для выполнения поставленной задачи.

В настоящее время, несмотря на большую актуальность и востребованность клеточных технологий способствующих успешному лечению тяжелых заболеваний человека, в нашей стране практически отсутствуют специализированные производственные учреждения, изготавливающие разнообразные клеточные продукты и обеспечивающие медицинские клиники соответствующего профиля.

Несмотря на большой интерес к этой области клеточной биотехнологии со стороны биологических и медицинских научно-исследовательских институтов, очень небольшое число из них доводит разработки до международного производственного уровня.

Одной из основных причин сложившейся ситуации является отсутствие у разработчиков необходимой и профессионально организованной инфраструктуры. Из предыдущих разделов настоящего учебного пособия следует, что для успешного развития исследований и разработок, проводимых с использованием культивируемых клеток, помимо специальных помещений, в которых с ними работают, необходимы также питательные среды, стерильная культуральная посуда, возможность замораживания и хранения используемых клеток, осуществление контроля за отсутствием контаминаций, как в клеточных культурах, так и в создаваемых клеточных продуктах. Все перечисленное должно обеспечиваться специальными подразделениями с применением соответствующих приборов и устройств.

В данном разделе мы рассмотрим, чем должен быть обеспечен этот сложный технологический процесс, каким оборудованием и для какой цели должны быть оснащены специализированные подразделения.

11.1. Приготовление питательных сред.

Прежде всего, как культивируемые клетки, так и приготавливаемые клеточные продукты должны быть обеспечены питательными средами. В настоящее время большинство широко известных питательных сред, таких как MEM, DMEM, RPMI, 199 и другие, производится и распространяется специализированными фирмами в готовом для употребления виде. Их недостатком является ограниченное время применения, не более 1 года с момента изготовления. В связи с этим были разработаны сухие питательные среды, которые могут храниться до приготовления около 3-4 лет. Перевод их в жидкое состояние осуществляется непосредственно перед их использованием. Кроме того, в ряде случаев существующие на рынке питательные среды не всегда подходят для исследуемых

клеток или приготавливаемых клеточных продуктов и требуют внесения модификаций в их состав. В частности, для достижения желаемых результатов бывает необходимым создание бессывороточных питательных сред. Все это означает, что организации, разрабатывающие клеточные технологии, должны иметь соответствующее оборудование и реактивы позволяющие создавать и модифицировать питательные среды.

Во-первых, для этой цели необходимо иметь установку для получения сверхчистой воды. Обычно в лабораториях пользуются дистиллированной водой, но для работы с клетками ее чистоты недостаточно. Как показали анализы в ее составе остаются вещества, оказывающие токсическое действие на клетки, в частности тяжелые металлы. Для получения сверхчистой воды, водопроводную воду подвергают дистилляции и собирают в специальные емкости, из которых она поступает в специальную установку для окончательной очистки. Наиболее известные и распространенные установки такого рода производятся фирмой Millipore и называются Super Q. Они состоят из четырех патронов, через которые специальным насосом вода подается на очистку сначала обратным осмосом, затем проходит через активированный уголь, потом через ионообменные смолы и, наконец, проходит через мембранные фильтры с размером пор 0.22 мкм. На выходе такая вода имеет высокое удельное объемное сопротивление равное 18 MgOm/см при температуре 20 °C.

На такой сверхчистой воде разводятся сухие питательные среды или приготавливаются новые среды, в которых затем с помощью осмометра устанавливается требуемое осмотическое давление, а кислотность подводится на РН-метре до физиологических значений.

После приготовления питательной среды ее необходимо стерилизовать и это достигается с помощью специальной фильтровальной установки. Она состоит из герметично закрытой емкости, в которую помещена готовая среда, соединенная с помощью

шланга с фильтродержателем с внесенными в него мембранными фильтрами и префильтрами для последовательной очистки от частиц, агрегатов веществ, образовавшихся в процессе приготовления и бактерий. Пропускание среды через фильтры осуществляется под давлением газообразного азота. Вытекающая после фильтрации среда поступает в специальные стерильные стеклянные бутылки, которые герметично закупоривают и помещают в холодную комнату, где они хранятся при температуре + 4-6 °С до момента использования. Процедуру фильтрования и разлива среды проводят в стерильном боксе во избежание нежелательных контаминаций. Из каждой приготовленной партии питательных сред берутся пробы для контроля их действия на культивируемые клетки и для проверки отсутствия контаминаций.

11.2. Мытье и стерилизация культуральной посуды.

Вся работа с культивируемыми клетками и приготовлением клеточных продуктов осуществляется с непрерывным использованием разнообразной стеклянной и пластиковой посуды, от качества которой и в первую очередь от ее стерильности также как и от стерильности применяемых растворов зависит успех всей сложной деятельности по разработке клеточных технологий. Поддержание посуды в стерильном состоянии является одной из центральных задач экспериментальной работы, так как большое число ошибок и неудач может быть связано с недостаточным вниманием к этому важному вопросу.

Для осуществления этих ежедневных процедур обработки посуды создается специализированное подразделение, оснащенное целым рядом приборов и аппаратов, обеспечивающих все последовательные этапы этого процесса.

В последнее время стеклянная посуда начала замещаться одноразовой пластиковой посудой, но при этом в ряде случаев ее

использовать нельзя. Например, питательные среды, сыворотку крови и ряд биологически активных соединений нельзя хранить в пластике, так как часть содержащихся в растворах веществ избирательно и непредсказуемо адсорбируется на стенках сосудов, и при этом меняются свойства хранимых жидкостей. Поэтому большая часть используемой посуды останется стеклянной. Кроме того, однократное употребление пластика оказывается невозможным в связи с возрастающей стоимостью необходимой посуды. По этой причине мытью и стерилизации подвергают не только стеклянную, но и пластиковую посуду. Последняя, однако, выдерживает такую обработку только несколько раз от 6 до 10 повторностей.

Прежде всего, посуда, бывшая в употреблении подвергается замачивание в специальных сосудах прямоугольной или цилиндрической формы для предварительной стерилизации и удаления оставшихся на ее поверхности клеток, белков и других веществ. Замачивание производится в водных растворах таких активных реагентов как 5% раствор гипохлорита натрия или 3% раствор перекиси водорода. Гипохлорит в последнее время выпускается в виде таблеток ДП-2Т производства ООО «Алтайхимпром» Перед замачиванием посуду нужно прополоскать водой, чтобы убрать легко смываемые загрязнения. Время выдержки в растворе не менее 24 часов.

После предварительной стерилизации посуду промывают проточной водой, помещают в специальные корзины и вставляют в автоматические моечные машины. Мыть культуральную посуду можно только с помощью специального детергента 0,001 % раствора 7X фирмы ICN при pH не более 8.0, чтобы не происходило выщелачивания стекла. Вначале происходит предварительное ополаскивание холодной водой, затем мытье горячей водой с детергентом, повторное ополаскивание холодной водой и, наконец, финишное полоскание дистиллированной или ультрачистой водой,

которая поступает из отдельно стоящей специальной емкости заполняемой установкой Super Q., Пластиковую посуду моют вручную, потому что ее нельзя в силу малого веса помещать в моечную машину.

После окончания мойки посуда высушивается в специальных сушильных шкафах с принудительной продувкой горячим воздухом. Температура сушки задается в диапазоне от 100 до 120 °С и проводится в течение 1 часа. Пластик сушится при температуре 50-60 °С в течение 30-60 минут. Высушенная посуда упаковывается таким образом, чтобы внутрь нее не могли попасть микроорганизмы и другие загрязнения. Это достигается путем закрытия всех отверстий пищевой фольгой. Пипетки затыкают ватой, обжигают, заворачивают в фольгу и помещают в пеналы, сделанные из нержавеющей стали. Пластиковую посуду заворачивают в специальную, бесцветную пищевую пленку.

Упакованную стеклянную посуду стерилизуют в специальных, воздушных стерилизационных шкафах при температуре + 180 °С в течение 2 часов. Пластиковую посуду нельзя подвергают действию таких высоких температур, потому что в этих условиях она расплавится. Поэтому ее стерилизуют гамма-облучением или озоном в специально разработанной установке СО-01, Стерильную посуду до ее использования хранят в чистом помещении в закрытых шкафах.

Помимо воздушной стерилизации посуда, растворы некоторые среды и оборудование стерилизуют автоклавированием. Автоклавы – это паровые стерилизаторы двух типов вертикальные ВК-75 и горизонтальные ГК-100-3М. Применяются разные режимы стерилизации. Например, растворы, содержащие сахара стерилизуются при давлении пара 0.5 А и температуре 100 °С. Стерилизацию растворов, стеклянной и пластиковой посуды осуществляют при давлении 1.0 А и температуре 121 °С. Инактивацию зараженных сред, растворов и посуды проводят при давлении 1.5 А и температуре 132 °С. Все зараженные материалы после их автоклавирования уничтожаются.

11.3. Кримоонсервация и хранение культивруемых клеток.

Все клетки, используемые при создании клеточных технологий, не могут поддерживаться в культуре долгое время. Как было описано в предыдущих главах, при длительном культивировании они или погибают или изменяют свои свойства и становятся трансформированными, способными к образованию опухолей при трансплантации в организм животных или человека. Для того, чтобы сохранять выделенные клетки в неизменном состоянии их замораживают и хранят при температуре жидкого азота – 196 °С. Для осуществления этого чрезвычайно важного процесса создают специальное подразделение – криокомплекс – оснащенный всем необходимым оборудованием.

Как следует из результатов многолетних поисков оптимальных условий кримоонсервации, наиболее серьезное влияние на жизнеспособность клеток оказывает скорость снижения температуры, от которой зависит образование кристаллов льда, как внутри клетки, так и в ее окружении. Поэтому самым важным прибором, осуществляющим этот процесс, является программный замораживатель. Он состоит из замораживающей камеры, сделанной из нержавеющей стали, и закрытой прозрачной стеклянной крышкой. Камера соединена с интегрированным процессором, совмещенным с персональным компьютером, что позволяет с одной стороны устанавливать и запускать программу подачи в камеру паров жидкого азота, а с другой – следить за процессом понижения температуры в камере. Пары жидкого азота поступают в камеру из сосуда Дьюара, присоединенного к ней через специальное устройство. Суспензию клеток помещают в специальные пластиковые криоампулы, добавляют к ним криофилактик - диметилсульфоксид (ДМСО), предотвращающий образование льда, и помещают в камеру для замораживания. Скорость охлаждения для разного типа клеток отличается, но для большинства культивируемых клеток человека и

животных, которые используются для создания клеточных технологий, она составляет 1 °С в минуту.

После доведения температуры суспензии охлаждаемых клеток до – 196 °С (температуры кипения жидкого азота при нормальном атмосферном давлении) криоампулы переносят в большие криохранилища с широкой горловиной, заполненные жидким азотом в объеме до 1 000 л. В эти хранилища вставлены стойки с выдвижными ячейками, в которые вставляются замороженные ампулы. Помимо больших криохранилищ необходимо иметь несколько сосудов Дьюара меньшего размера, сделанных из алюминиевого сплава и предназначенных для хранения и транспортировки жидкого азота, из которых, в частности дополняется испаряющийся азот из больших хранилищ. Емкость этих сосудов равна от 6 до 50 литров сжиженного газа.

Для того чтобы замороженные клетки оставались при одной и той же температуре в криохранилищах необходимо регулярно добавлять жидкий азот взамен испаряющемуся. Так как обеспечение приобретаемым на специальных заводах азотом, не всегда надежно по срокам и по объемам, необходимо иметь собственные установки для его производства. Холодильно-газовая установка для получения жидкого азота из атмосферного воздуха ЗИФ-1002 производит около 10 литров жидкого азота в час. Для бесперебойного обеспечения сжиженным газом в Отделе клеточных культур Института цитологии используется три таких установки. Для ее охлаждения в процессе работы требуется большое количество проточной воды порядка 1 000 литров в час, что создает иногда сложности ее технического обеспечения. Кроме того, помещение, в котором ведутся работы по криоконсервации, должно иметь хорошую вентиляцию для удаления избыточно накапливающегося в воздухе азота.

Размораживание хранящихся в банке клеток должно производиться тоже быстро, так как от этого зависит их

жизнеспособность. Вынутые из жидкого азота ампулы сразу же помещают в водяные термостаты с температурой 37 °С и держат в них до полного растворения питательной среды. Затем размороженные клетки подвергаются центрифугированию и переводу в свежую питательную среду для удаления криофиликта, который может оказывать токсическое действие.

Как видно из описания приборов и устройств, используемых в данном подразделении, криоконсервация достаточно сложный процесс, требующий участия профессионально подготовленного персонала. В связи с этим в большинстве лабораторий мира работающих с культивируемыми клетками подобные подразделения отсутствуют. В них, вместо программных замораживателей пользуются низкотемпературными холодильниками, которые поддерживают температуру – 70 или – 80 °С. В этом случае криоампулы с клетками и криофиликом помещают в пенопластовые коробки и в них помещают в низкотемпературный холодильник на одни сутки. Считается, что при таких условиях также происходит постепенное замораживание клеток со скоростью 1 °С в минуту. Это, однако, менее надежно, потому что скорость замораживания будет зависеть от режима работы холодильника, качества и размера пенопластовой коробки и от того, как часто открывают данный холодильник во время замораживания. Замороженные таким образом клетки можно хранить при этой температуре, но не долго – не более двух недель. Обычно криоампулы после замораживания переносят в сосуды Дьюара с жидким азотом для длительного хранения.

11.4. Планировка и оборудование культуральных помещений.

Вся основная работа с культивируемыми клетками, разработка клеточных технологий и создание клеточных продуктов производится в культуральных помещениях, поэтому к их планировке и

оборудованию предъявляются повышенные требования. Прежде всего, в культуральных помещениях стены и пол должны быть покрыты керамической плиткой, чтобы их можно было постоянно поддерживать в чистом состоянии. Кроме того помещения должны быть оснащены специальной приточно-вытяжной вентиляцией. Поступающий в культуральную воздух должен быть стерильным, что достигается путем пропускания его через специальные фильтры, и иметь постоянную температуру удобную для работы в боксовых помещениях. Культуральная состоит из трех смежных помещений. В первом персонал переодевается в одежду, в которой производятся стерильная работа. На голову одевается чистая одноразовая шапочка, закрывающая волосы, чтобы с них в посуду и растворы не попали какие-нибудь загрязнения. На руки надевают специальные боксовые перчатки. В следующем помещении проводится вся работа с клеточными культурами. В последнем же хранятся готовые продукты и необходимые для проведения экспериментов питательные среды, сыворотка и реагенты, используемые при работе с клетками и сопутствующими материалами. Перечисленные условия предъявляются к чистым помещениям, в которых создаются клеточные продукты для клинического использования согласно международным правилам.

В помещении, в котором работают с культивируемыми клетками, как правило, по одной стороне, располагаются боксы, с установленными в них специальными стерильными рабочими местами, которые называют ламинарными боксами. Эти устройства представляют собой столы, со стеклянными стенками по бокам, а также закрытые сверху и с противоположной стороны. Ламинарными они называются, потому что в них во время работы постоянно подается ламинарный поток воздуха, обеспечивающий стерильные условия для всех операций, проводимых с клетками.

Ламинарные боксы существуют трех типов различающихся по способу подачи стерильного воздуха. Во всех вариантах, воздух, подаваемый на стол, забирается из рабочего помещения и пропускается через фильтры грубой и тонкой очистки, после которой согласно расчетам на рабочий стол может попасть не более четырех частиц размера 0.3-0.5 мкм в 1 дм³. В зависимости от решаемых задач стерильный воздух может подаваться горизонтально (в направлении работающего человека), вертикально (сверху вниз) или наклонно (сверху вниз по направлению к задней стенке). Ламинар с горизонтальным потоком воздуха защищает рабочую поверхность от попадания возможных загрязнений от работающего сотрудника, но не защищает его самого от возможных контаминаций обрабатываемого материала. Ламинар с вертикальным потоком воздуха снижает возможность попадания контаминаций с обеих сторон, но не исключает полностью их распространения. Ламинар третьего типа с наклонным потоком воздуха имеет еще систему рециркуляции. Это означает, что воздух, проходящий через рабочую зону, всасывается опять в систему очистки и таким образом снижает возможность попадания контаминаций на исследователя. При работе с потенциально патологическим материалом, каковым может оказаться, например, биопатат ткани, взятый от пациента, последний тип ламинаров является предпочтительным.

Выделенные из тканей или размороженные клетки помещают в питательную среду и помещают в специальные термостаты – CO₂ инкубаторы. Они отличаются от обычных термостатов наличием системы создания и поддержания определенного состава газовой среды и относительной влажности. В автоматических CO₂ инкубаторах, заданный состав газовой среды поддерживается дозированным поступлением нужного газа в поток очищенного от пыли внешнего воздуха, подаваемого во внутренний объем прибора. Воздух нагнетается специальными встроенными воздушными насосами, а CO₂ подается из специальных баллонов. При этом

создается и поддерживается небольшое избыточное давление, препятствующее заражению содержащегося в инкубаторе материала из внешней атмосферы. Наружная дверь инкубатора имеет принудительный обогрев, что исключает отпотевание внутренней стеклянной двери инкубатора и позволяет наблюдать за содержимым без ее открывания. Уровень CO_2 в инкубаторе можно регулировать, но обычно он поддерживается в пределах 5%. Это производится в связи с тем, что состав воздуха в тканях организма отличается от того, который мы вдыхаем в сторону увеличения содержания углекислого газа.

Наблюдение за поведением клеток в культуре, их формой, размножением, межклеточными взаимодействиями и многими другими характеристиками осуществляется с помощью инвертированных микроскопов. Так как клетки растут в разных культуральных сосудах – чашках Петри, флаконах и многолуночных платах со значительным слоем питательной среды над ними – Наблюдать за ними под обычным микроскопом невозможно. Фокусное расстояние используемых для этой цели объективов слишком мало. Поэтому были разработаны инвертированные микроскопы, у которых объективы находятся снизу под столиком микроскопа, а освещение объекта производится сверху. Кроме того, они позволяют использовать фазово-контрастные устройства, специальные фотокамеры и подсоединение компьютера для наблюдения за клетками на мониторе и записи изображения. Они могут также снабжаться специальными камерами для термостатирования сосуда с клетками и создания необходимого состава газовой атмосферы в нем.

Для процессов выделения клеток из тканей и размножения их в культуре, культуральная оснащена низкоскоростными центрифугами и обычными термостатами. При работе с клетками используются специальные дозаторы, позволяющие стерильно обирать и вносить питательные среды в сосуды с культивируемыми клетками.

Все использованные растворы и посуда собираются в специальные емкости и отправляются на стерилизацию, мытье или утилизацию. Из всего вышеизложенного следует, что серьезная и профессиональная работа по разработке клеточных технологий требует большого современного технического оснащения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- 1.Александрова Н.М., Бегова М.П., Говорун В.М. Цитотоксическая активность мелитина, экспрессируемого рекомбинантными векторами в клетках *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma hominis* // Генетика, 2001, 37: 46–53.
1. Альбертс Б. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994, Т.2. - 540 с.
2. Американская коллекция типовых культур – АТСС (www.atcc.org).
3. Аутологичные стволовые клетки. Экспериментальные исследования и перспективы клинического применения /Под редакцией В.А.Ткачука. М.: Из-во «Литерра», 2009. – 448 с.
4. Биология клетки в культуре. Сб. Л.: Наука, 1984 - 259 с.
5. Борхсениус С.Н. и др. Микоплазмы. Спб: «Наука», 2002. –260с.
6. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. Учебное пособие. М.: ФБК-ПРЕСС , 1999. - 159 с.
7. Глебов О.К. Генетическая трансформация соматических клеток. Л.: Издательство «Наука» , 1989. - 351 с.
8. Говорун В.М. и др. О формировании резистентности к фторхинолонам у *Mycoplasma hominis* и *Acholeplasma laidlawii*. Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология, 1998, 3: 16–19.
9. Голубев Д.Б., Соминина А.А., Медведева М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. М.: Изд. Медицина, 1978, - 223 с.
- 10.Гордеева О.Ф. Создание высоко-технологичных тест-систем на основе эмбриональных стволовых клеток для изучения фармакологических и токсикологических эффектов новых лекарственных препаратов. Клеточные культуры (информ. бюллетень) 2007. вып. 22: 16–21.
11. Гордеева О.Ф., Миталипов Ш.М. Плюрипотентные стволовые клетки: поддержание генетической и эпигенетической стабильности и перспективы клеточных технологий. Онтогенез. 2008. 39 (6): 405 –419.
- 12.Захаров А.Ф., Бенюш В.А. Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Атлас «Хромосомы человека». М.: Из-во Медицина, 1982. - 263 с.

- 13.Каталог Российской коллекции клеточных культур, 1999 / Отв. ред. Пинаев Г.П., Полянская Г.Г. www.cytspb.rssi.ru;
- 14.Кольцова А. М., Гордеева О. Ф., Крылова Т. А., Лифанцева Н. В., Мусорина А. С., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. Сравнительные характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a. Онтогенез. 2011. 42 (4): 00.
- 15.Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В. Гордеева О.Ф., Мусорина А.С., Горячая Т.С., ШлыковаС.А., Каменецкая Ю.К., ПинаевГ.П., Полянская Г.Г. Характеристики и специфические особенности новых линий эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 2009. 51(7): 565–576.
16. Лозина-Лозинский Л.К.. "Очерки по криобиологии". М.: "Наука", 1972г.
17. Мамаева С.Е. Методы анализа культивируемых клеток. Хромосомный анализ культивируемых клеток. В сб. «Методы культивирования клеток». Л. 1988: 78 – 98.
18. Мамаева С.Е. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология, 1996, 38: 787 – 814.
19. Мамаева С.Е. Атлас «Хромосомы постоянных клеточных линий человека и животных». М.: Из-во Научный мир, 2002. - 231 с.
20. Маргулис Б.А. Методы анализа культивируемых клеток. Определение видовой специфичности культивируемых клеток с помощью изоферментного анализа. Сб. «Методы культивирования клеток». Л. 1988: 98 – 103.
21. «Методы культивирования клеток» /Отв. ред. Г.П.Пинаев – Л: Из-во «Наука», 1988.
22. Микулин Е.И. "Криогенная техника". М.: Из-во "Машиностроение", 1969 г.
23. Миллер Г.Г. и др. Контаминанты клеточных культур. Сб. Методы культивирования клеток, Л.: Из-во «Наука», 1987: 104–126.
24. Мишулин И.Ф., Шевченко М.И. Этюды о БИО-технологии, Киев: Из-во «Наукова Думка», 1989. - 150 с.

25. Никольский Н.Н., Габай И.А., Сомова Н.В. Эмбриональные стволовые клетки человека (проблемы и перспективы). Цитология. 2007. 49 (7): 529–537.
26. Пинаев Г.П. и др. "Методы культивирования клеток". СПб: Из-во СПбГПУ, 2008. - 278 с.
27. Пинаев Г.П., Полянская Г.Г. Создание и развитие Российской коллекции клеточных культур человека, животных и растений. Сб. «Клеточные культуры» (информ. бюлл.) 2010. 26: 3 – 61.
28. Полянская Г.Г. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях. Успехи современной биологии, 2000, 120 (6): 529–539.
29. Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Сакута Г.А. Влияние микоплазменной контаминации клеточной линии легкого эмбриона человека MRC-5 на кариотипическую изменчивость. Цитология, 2000, 42 (2): 190–195.
30. Полянская Г.Г. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях. Успехи совр. биол. 2000, 120: 529 – 539.
31. Полянская Г.Г., Вахтин Ю.Б. The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system. Цитология, 2003, 45: 115 – 131.
32. Полянская Г.Г. Кариотипическая изменчивость в клеточных линиях и структура кариотипа. Клеточные культуры (информ. бюллетень) 2009. вып. 24: 15 – 24.
33. Пушкарь Н.С и др. "Введение в криобиологию". Киев: Из-во "Наукова Думка", 1975.
34. Рингертц Н., Севидж Р. Гибридные клетки, М.: Из-во «Мир», 1979 . - 415 с.
35. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. М.: Из-во «Мир», 1987.- 411 с.
36. Фрешни Р. Культура животных клеток М.: Из-во «Мир», 1989. - 332 с.
37. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М.: Из-во «Медицина», 1980.

38. Шмидт П.Ю. "Анабиоз". М.: Из-во Академии Наук СССР, 1948 г.
39. Alberts K.M., Taitchman L.B. Kinetics of withdrawal from cell cycle in cultured human epidermal keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 1984, v/82: 161-164)/).
40. Arnold J. Ueber teilungsvorgange an der wandezellen; ihre progressiven und regressiven methamorfosen. Arch. Mikrosk. Anat. 1887, 30, 205-310.
41. Asahina E. Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature. Nature. #184/ 1959. .
42. Bauer F.W., Degood R.M., impulse cytophotometry in psoriasis. Br. J. Dermatol., 1975, v.93:775-777.
43. Boyce S.T., Ham R.G., Calcium regulated differentiation of normal epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. J.Invest.Dermatol., 1983, v.81:33-40.
44. Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues. 1998, John Wiley & Sons, Chichester – New York – Brisbane – Toronto – Singapore – 307 p.
45. Chapman S.Y., Leigh I.M., Tidman M.Y. et al. Abnormal expression of hemidesmosome-like structures by junctional epidermolysis bullosakeratinocytes in vitro. Br.J.Dermatol., 1990, v.123:137-144
46. Chen T.R. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by Hoechst 33258 stain. Exp. Cell research, 1977, 104: 255.
47. Cowan C.A., Klimanskaya I, McMahon Jill, Atienza J., Witmyer J, Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., Melton D.A. 2004. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. New Engl.J. Med. 350: 1353–1356.
48. Culture of human stem cells, AJohn Wiley & Sons, Inc.,Publication. 2007,350 p.
49. De Luca M., Franzy A.T., D’Anna F.,et al. Coculture of human keratinocytes and melanocytes. Differentiated melanocytes are physiologically organised the basal layer of the cultured epithelium. Eur.J.Cell Biol., 1988, v.46: 176-191)/
50. de Peppo G.M., Svensson S., Lennerås M., Synnergren J., Stenberg J., Strehl R., Hyllner J., Thomsen P., Karlsson C. 2010. Human
-

embryonic mesodermal progenitors highly resemble human mesenchymal stem cells and display high potential for tissue engineering applications. Tissue Eng Part A.16:2161–2182.

51. Faure M., Mauduit G., Schmitt D. et al. Growth and differentiation of human epidermal cultures used as auto-and allografts in humans. Br.J.Dermatol. 1987, v/116: 161-170)/

52. Freshney R. I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York, 1987, 207–214

53. Glichrest B.A. In vitro assesement of keratinocyte aiging. J. Invest. Dermatol. 1983, v. 81: 184-189).

54. Green H. Cycle AMP in relation to proliferation of the epidermal cell. A new view. Cell, 1978, v.15:801-815;

55. Green H., Kehinde J., Thomas J., Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. PNAS, 1979, 76, 5665-68).

56. Gruenloh W., Kambal A., Sondergaard C., McGee J., Nacey C., Kalomoiris S., Pepper K., Olson S., Fierro F., Nolte J.A. 2011. Characterization and In Vivo Testing of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. Tissue Eng. Part A. 17: 1517–1525.

57. Harrison R.G. Observations of the living developing nerve fiber. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1906-1907, 4, 140-143.

58. Human Cell Culture, Kluwer Academic Publishers, 2001, 5: 242 p.

59. Klimanskaya I., Chung Y., Meisner L., Johnson J., West M.D., Lanza R. 2005. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. Lancet. 365: 1636–1641

60. Langer R. and Vacanti J.P., Tissue engineering. Science, 1993, 260, 920-932.

61. Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. J. of Gerontology, 34: 328 – 334.

62. Mowles J.M. The use of ciprofloxacin for the elimination of mycoplasma from naturally infected lines. Cytotechnology, 1988, 1: 355–358.

63. Methods in Enzymology, v.LVIII – Academic Press, New York,S.Francisco,London, 1979
64. Nerem R.M. and Sambanis A., Tissue engineering: from biology to biological substitutes. Tissue Eng. 1995, 1, 3-13.
65. "Nutritional requirements of cultured cells" (ed. H.Katsuta) – Tokio Univ. Press, 1978.
66. Phinney D.G., Prockop D.J. 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. Stem Cells. 2007 25:2896–2902.
67. Pruckler JM, Pruckler JM, Ades EW Detection by polymerase chain reaction of all common Mycoplasma in a cell culture facility// Pathobiology. 1995, 63(1):9–11
68. Rheinwald J.G. and Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. Cell, 1975, v.6, p.331-342.
69. Ström S., Holm F., Bergström R., Strömberg A.M., Hovatta O. 2010. Derivation of 30 human embryonic stem cell lines-improving the quality. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 46: 337–344.
70. Vazin T, Freed W.J. 2010. Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review. Restorative Neurology and Neuroscience. 28: 589–603.

