

19. **Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT.** Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 2005, 6(11): 1123–1132.
20. **Reiner SL.** Development in motion: helper T cells at work. *Cell*, 2007, 129(1): 33–36.
21. **Stockinger B., Veldhoen M.** Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, 19 (3): 281-286.
22. **Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM.** Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 2006, 24 (6): 677–688.

Представленная ниже статья В.П. Пащенко является историческим экскурсом к исследованиям 80-х – начала 90-х годов 20-го века, посвященным использованию тканевых и клеточных культур человека с целью уточнения диагнозов и прогнозирования исходов некоторых заболеваний. Полагаем, что статья будет интересна для исследователей в области клеточной биологии и медицины, а также студентов и аспирантов биологических факультетов и медицинских вузов.

Члены ред. коллегии сб. «Клеточные культуры».

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТКАНЕВЫХ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

В.П. Пащенко

Северный государственный медицинский университет, Архангельск

paschenkow@mail.ru

В статье представлены результаты исследования морфофункциональных характеристик тканевых культур фрагментов слизистых бронхов, полученных при бронхоскопии больных хроническими заболеваниями бронхов и легких, а также культур тканей фрагментов почек урологических больных. Оценивалась площадь зоны роста тканей, число выросших клеток, митотическая активность, патологические митозы и число аномальных клеток. Полученные данные позволили уточнить диагнозы и прогнозы исхода хронических заболеваний бронхов и легких и оценить репаративный потенциал клеток тканей почек, что имело значение при выборе тактики лечения больных.

Использование клеточных культур позволило установить активирующее влияние сыворотки крови больных алкоголизмом в 1-й месяц абстиненции на рост культивируемых фибробластов эмбриона человека. Полученные результаты согласуются с концептуальными представлениями о патогенезе алкоголизма и алкогольной эмбриопатии.

Ключевые слова: тканевые и клеточные культуры, заболевания легких, бронхов, почек, диагностика, алкоголизм, алкогольные эмбриопатии.

А. Использование тканевых культур для диагностики и прогнозирования хронических заболеваний бронхов и легких.

Работы выполнялись в Межкафедральной лаборатории тканевых и клеточных культур Архангельского медицинского института и Архангельского филиала Института морфологии человека АМН СССР. Основное направление работ было связано с изучением особенностей течения легочной патологии на Европейском Севере и разработкой новых методов диагностики и профилактики заболеваний (1). Внедрение методов культивирования клеток и тканей во врачебную практику не представляется возможным без активного участия врачей и сотрудников клиник. В этом направлении исследований было плодотворным наше сотрудничество с доцентом кафедры торакальной хирургии АГМИ В.П. Быковым, сотрудником Областной клиники Архангельска В.А. Брагиным, а также заведующим кафедрой патологической анатомии АГМИ доцентом В.Я. Леонтьевым (2, 3, 4).

Проведенные ранее исследования показали, что рост культур тканей *in vitro* зависит от физиологического состояния донора ткани и от активности сыворотки крови донора, добавляемой в питательную среду. В настоящей работе были изучены особенности роста микрофрагментов тканей, полученных при бронхоскопии больных с заболеваниями бронхов и легких. Для культивирования использовали среду 199 с 10% сыворотки крови больных - доноров ткани. После измельчения фрагменты ткани с помощью микропипетки размещали на поверхности двух миллиметровых фильтров диаметром 12 мм (СЫНПОР /7/), которые помещали в пробирки на границе жидкой и газовой фаз среды. Культивирование осуществляли в течение десяти дней при температуре 38° С. Для оценки интенсивности роста тканей и клеточной патологии в зоне роста использовали 1/5 часть наиболее интенсивно растущих колоний клеток. В них оценивали площадь зоны роста, число выросших клеток, митотическую активность, патологические формы митозов и число аномальных клеток.

Аномальными считали клетки, имеющие полиплоидные ядра, площадь которых превышала 700 мкм², многоядерные клетки (имеющие 3 и более ядер), клетки с множественной вакуолизацией цитоплазмы и клетки с выраженной фрагментацией ядер.

Зона роста тканей фрагментов слизистой бронхов состояла преимущественно из эпителиоподобных клеток. Средние размеры зон роста наиболее интенсивно растущих культур, характеристики митотической активности, морфологические особенности клеток мы сопоставляли с характером воспалительного процесса в бронхах и легких, оцениваемого по клиническим признаками и результатам патологогистологического исследования. При хроническом бронхите наблюдалось значительное усиление роста тканей слизистой бронхов по сравнению с небольшой группой больных, у которых изменения в бронхах были выражены слабо. По мере нарастания тяжести заболевания отмечалась некоторая тенденция к усилению роста ткани *in vitro*, увеличение числа аномальных клеток и снижение митотической активности. Наблюдалась определенная зависимость показателей роста тканей от степени воспаления. Наиболее интенсивный рост ткани наблюдался при второй степени воспаления у больных хроническим гипертрофическим бронхитом.

При сопоставлении интенсивности роста культур слизистой бронхов с патологией паренхимы легких было выявлено усиление роста культур у больных с острым абсцессом и гангреной. Наиболее низкие показатели роста культур отмечались при опухолевых заболеваниях паренхимы легких. Больше всего аномальных клеток в зоне роста культур было у больных с бронхоэктатической болезнью и больных с опухолями легких, а наиболее высокая митотическая активность - у больных с острой пневмонией. При этом была выявлена обратная корреляционная зависимость площади зоны роста культур от числа аномальных клеток и патологических митозов.

Большое значение для оценки степени поражения культивируемой ткани имела оценка структурных особенностей зоны роста. Исследования показали, что по мере развития хронического бронхита (от простого катарального к хроническому атрофическому) происходит нарастание деструктивных явлений в зоне роста. В ней появляются полости, своеобразная тягистость, участки уплотнения и разрежения, потоки фибробластов, очаги пораженных эпителиоподобных клеток и др. Причем, эти структурные особенности клеточной колонии также в значительной мере зависели от характера патологического процесса в бронхах.

На основании результатов морфологических исследований, а также статистического анализа показателей роста культур тканей слизистой бронхов при различных патологиях, нами были выделены следующие 3 группы заболеваний:

1. У больных катаральным бронхитом в тканях слизистой бронхов *in vitro* наблюдается усиление роста клеточной колонии, ее размеры достигают 3,3-5,5 мм². Число аномальных клеток не превышает 4,1 промилле. Зона роста состоит из мелких однородных клеток, имеющих высокую митотическую активность. Наблюдаются определенные структурные нарушения организации клеточной колонии, в частности, образуется валик уплотнения по периферии колонии.

2. При гипертрофической форме бронхита отмечается значительный размер клеточной колонии - до 5,5-8,0 мм², число аномальных клеток достигает 9 промилле и более. Наблюдаются значительные нарушения структурной организации клеточной колонии. При общем преобладании мелких, интенсивно делящихся эпителиоподобных клеток в зоне роста появляется значительное число измененных клеток, образуются тяжистые структуры, участки многослойного роста клеток, по периферии колонии образуется окантовка крупными аномальными клетками.

3. Для атрофического бронхита характерна выраженная декомпенсация репаративных возможностей тканей слизистой бронхов, которая сопровождается снижением роста культур. Площадь клеточной колонии составляет, как правило, менее 3,3 мм². На фоне значительного числа аномальных клеток наблюдаются нарушения упорядоченности структуры зоны роста. В ней появляются свободные полости, большое число полиплоидных и многоядерных клеток, а также фибробластов. Происходит снижение митотической активности клеток (5).

На основании полученных результатов мы пришли к общему заключению, что рост клеток ткани *in vitro* можно рассматривать как неспецифический показатель репродуктивной активности клеток и степени их повреждения при патологии. Таким образом, проведенные исследования показали, что использование тканевых культур для оценки характера патологического процесса, наряду с клиническими и патологогистологическими методами, позволяет уточнить диагностику заболеваний, дать оценку состояния клеток ткани и прогнозировать возможный исход заболеваний (6, 7).

Б. Некоторые особенности роста тканевых культур почек при урологических заболеваниях.

Комплексный подход к количественной оценке показателей роста культур тканей слизистой бронхов и морфологического анализа клеток был использован нами и для оценки репаративной активности культивируемых клеток ткани почек урологических больных. Биопсии у больных брали в момент проведения операций (доцент А.А. Ошурков). Забор фрагментов ткани для изучения осуществляли из условно непораженных отделов почек. Сравнение интенсивности роста микрофрагментов ткани почек и цитологических показателей в зависимости от возраста и пола больных не выявило каких-либо существенных различий. Статистически достоверное увеличение показателей роста культур ткани почек было обнаружено в возрастной группе больных - 35-44 года, по сравнению с группами больных 45-54 лет и 55-65 лет.

При сопоставлении особенностей роста культур ткани почек с клиническим диагнозом больного было установлено достоверное ускорение роста культур ткани от больных с воспалительными процессами в почках при пиелонефрите по сравнению с группой больных с опухолевыми заболеваниями. У больных с диагнозом гидронефроз по сравнению с больными мочекаменной болезнью отмечалось лишь увеличение разброса показателей роста культур. Однако анализ полученного материала затруднялся тем, что у больных с заболеваниями почек, как правило, имело место одновременное сочетание ряда патологических процессов: опухоли с пиелонефритом, мочекаменной болезни с пиелонефритом и гидронефрозом. Интенсивность роста культур возрастала в группе больных, имеющих осложнение – гидронефроз. Наиболее интенсивный рост культур отмечался в группе больных с диагнозом пиелит.

Более четкие результаты были получены при сопоставлении показателей роста культивированных тканей с патологогистологическим диагнозом больных. Было установлено, что относительно слабый рост культур тканей наблюдался при опухолевых заболеваниях, в то время как при хроническом воспалении с признаками атрофии и, особенно, с признаками склероза имело место статистически достоверное увеличение показателей роста культур на 38,0% и 51,1% соответственно.

Культура ткани почки плода человека, состоящая в основном из эпителиоподобных клеток, по сравнению с тканью почки взрослого человека, отличалась интенсивным ростом и

однородной структурой зоны роста, в ней редко встречались клетки с полиплоидными ядрами и уплотнениями в виде многослойного роста. В культурах ткани почек урологических больных появлялись большие клетки с полиплоидными ядрами, размеры которых могли в 5-7 раз превышать размеры ядер обычных клеток. В зоне роста культур часто встречались клетки с вакуолизированной цитоплазмой, могли образовываться свободные полости и длинные цитоплазматические "мостики" между отдельными клетками. На основании статистического анализа полученных данных мы, по аналогии с предыдущими исследованиями (пункт А), выделили значения параметров роста культур и цитологических показателей клеток зоны роста, характерных для различных заболеваний почек. При этом учитывались размеры зоны роста культур и доля аномальных клеток. Интенсивность роста культур и степень клеточной патологии, выявляемая в зоне роста, зависела как от выраженности воспалительной реакции, так и степени клеточной декомпенсации. С возрастом и при патологии происходило нарушение упорядоченности и однородности структуры клеточной колонии, изменение митотической активности, увеличение количества патологических клеток. Полученные результаты позволяют более точно оценить репаративный потенциал клеток ткани почек при патологии, что может учитываться врачом при диагностике и лечении больных (8, 9).

В. Оценка влияния сыворотки крови больных алкоголизмом на рост первичных культур фибробластов эмбриона человека.

Сыворотка крови человека содержит целый ряд веществ, как активирующих, так и угнетающих рост клеток. Кроме кейлонов и антикейлонов, влияние на рост тканей могут оказывать некоторые гормоны, биологически активные вещества, продукты метаболизма (9, 10). Однако в настоящее время не представляется возможным четко идентифицировать биохимическими методами суммарную активность всех этих веществ (11, 12).

В связи с этим, мы предприняли попытку оценить возможности использования метода клеточных культур для оценки биологических свойств сыворотки крови больных алкоголизмом. В работе принимали участие сотрудники кафедры наркологии АГМИ П.И. Сидоров, Н.С. Ишеков и Н.Л.Чуркин. Кровь была взята у 56 больных алкоголизмом (II стадия). Средний возраст больных - $39,4 \pm 1,2$ года. Все больные находились на лечении в наркологическом стационаре. В качестве контроля использовали сыворотку 33 здоровых, не злоупотребляющих алкоголем лиц (средний возраст - $20 \pm 0,4$ года). Испытуемую сыворотку вносили в питательную среду диплоидных культур фибробластов эмбриона человека.

Фибробласты выделяли общепринятым методом (13). Для этой цели использовали поверхностные ткани 7—8-недельных эмбрионов человека. Ткань обрабатывали трипсином. Культивирование проводили в 250 мл флаконах, используя 50 мл среды № 199 с добавлением 10% бычьей сыворотки и антибиотиков. Для изучения брались клетки на 3-м пассаже. После обработки монослоя клеток раствором версена и пипетирования в среде № 199 без сыворотки взвесь клеток разводили этой же средой, доводя их содержание до 100 000 клеток в 1 мл среды. В пенициллиновые флаконы разливали по 1,7 мл этой взвеси, после чего туда же вносили 0,3 мл испытуемой сыворотки больных алкоголизмом, что соответствовало ее 15% содержанию в среде. Для оценки свойств сыворотки больного использовалась одна проба. Флаконы с сывороткой больных алкоголизмом и контрольных лиц были зашифрованы, а очередность их обработки определялась таблицей случайных чисел, что обеспечивало не преднамеренный отбор проб. Культивирование клеток осуществляли на дне пенициллиновых флаконов в течение 4-х дней при температуре 37°C.

Определение количества клеток, как до культивирования, так и после него, проводили с помощью автоматического счетчика микрочастиц типа Пикоскель/PSфирмы «Медикор» (ВНР). За период культивирования с сывороткой больных общее число клеток во флаконах увеличилось. Среднее число клеток в экспериментальных пробах с сывороткой крови больных алкоголизмом составило $494,1 \pm 14,0$ тыс., в контрольных пробах— $433 \pm 14,3$ тыс. ($P < 0,01$).

Была изучена корреляционная зависимость между некоторыми показателями крови больных (числом эритроцитов, лейкоцитов, СОЭ, содержанием билирубина) и влиянием сыворотки крови на репродуктивную активность фибробластов человека (РАФ). Обнаружена положительная корреляция между РАФ и количеством эритроцитов ($r=0,2$; $P < 0,01$), обратная корреляционная зависимость между РАФ и показателями СОЭ ($r = -0,38$; $P < 0,01$), а также между РАФ и днем абстиненции ($r=-0,42$; $P < 0,005$). Достоверной корреляционной зависимости между РАФ и количеством лейкоцитов ($r = -0,15$; $P > 0,05$), и между РАФ и содержанием в крови билирубина ($r = -0,16$; $P > 0,05$) выявлено не было.

Результаты наблюдений показали, что у больных алкоголизмом по мере лечения наблюдалось снижение биологической активности сыворотки. При сопоставлении полученных данных с контрольной группой было обнаружено, что статистически достоверное повышение активности сохраняется до 29 дня абстиненции ($P < 0,01$).

При дальнейшем исследовании патогенеза алкоголизма с помощью метода клеточных культур (77 больных) была обнаружена достаточно высокая обратная корреляционная зависимость между свойствами сыворотки больных и продолжительностью регулярного пьянства ($r = -0,5$). При этом терапия больных алкоголизмом тетурамом не влияла на биологические свойства сыворотки этих больных, в то время как использование нейролептиков приводило к достоверному снижению биологической активности сыворотки крови этих больных.

Полученные результаты позволили предположить, что высокая биологическая активность сыворотки крови больных алкоголизмом в первые дни абстиненции могла быть обусловлена множеством деструктивных катаболических процессов, происходящих в организме этих больных, вследствие чего сыворотка крови насыщалась продуктами диссимиляции. Не исключается и усиленная выработка веществ, активирующих рост клеток и тканей. Эти данные согласуются с концептуальными представлениями о патогенезе алкоголизма, в которых было показано, что при развернутой стадии алкоголизма у больных развивается выраженная компенсаторная гипертрофия в гепатолиенальной и гепаторенальной системах (14, 15, 16, 17).

Обнаруженная нами повышенная биологическая активность сыворотки крови больных алкоголизмом, видимо, обуславливается гуморальным компонентом общего защитно-компенсаторного синдрома при этом заболевании. Высокую чувствительность фибробластов эмбрионов человека к изменению биологической активности сыворотки крови больных алкоголизмом в период абстиненции, возможно, следует учитывать в патогенезе алкогольной эмбриопатии.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что методика клеточных культур в комплексе с другими маркерами заболевания имеет определенную диагностическую ценность. Наш опыт показывает возможности использования методов тканевых и клеточных культур в клинической практике в качестве интегративного диагностического теста, позволяющего оценить репродуктивные свойства клеток ткани и биологическую активность сыворотки крови при некоторых заболеваниях.

Список литературы

1. **Марачев А.Г., Носов А.Г., Решетников С.С., Пашенко В.П. и др.** Клиника-морфологические изменения органов дыхания при заболеваниях легких в условиях Архангельской области. Депон. ВНИТИ, центр. 17. Инв. N 0233.0055275 . Москва. 1983, 98 с.

2. Пащенко В.П., Брагин В.А. Особенности роста легочной ткани человека в бесплазменной тканевой культуре. Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1979: 25-27.

3. Пащенко В.П. Некоторые количественные особенности роста фрагментов ткани легких и почек в первичной культуре. Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии, М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1980: 92-93.

4. Пащенко В.П., Быков В.П., Леонтьев В.Я. Использование первичных культур для диагностики хронических неспецифических воспалительных заболеваний бронхов. Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1986: 58-59.

5. Пащенко В.П., Быков В.П., Леонтьев В.Я. Способ прогнозирования течения хронических неспецифических воспалительных заболеваний бронхов. Авторское свидетельство SU.1409944 A1, 15.07. 1988. Бюлл. № 26. 16 с.

6. Пащенко В.П. Влияние физиологических, экстремальных и патологических состояний организма на рост тканей при культивировании. Автореф. дисс. докт. мед. наук. Архангельская гос. мед. академия. Архангельск, 1994, 47 с.

7. Пащенко В.П. Некоторые ультраструктурные особенности клеток в первичных культурах легких и бронхов. Сб.: Актуальные проблемы адаптации и здоровья населения Севера. Архангельск, АГМА. 1992: 17-19.

8. Пащенко В.П., Ошурков А.А., Данилко Э.И. Некоторые особенности роста микрофрагментов ткани почек в культуре при патологии. Сб.: Актуальные проблемы адаптации и здоровья населения Севера. Архангельск, АГМА. 1992: 151-153.

9. Пащенко В.П. Опыт культивирования тканей при физиологических и патологических состояниях организма. Депонирована ВИНТИ, № 1904- ВЭЗ, 07. 07. 1993, Москва, 1993, 76 с.

10. Пащенко В.П. Количественная оценка свойств сыворотки крови и некоторых биологически активных веществ с помощью тканевых культур. Сб: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1978: 26-27.

11. Пащенко В.П. Биологическая активность сыворотки крови у доноров и беременных женщин Европейского Севера. Сб.: Эколого-гигиенические и клинические вопросы жизнедеятельности человека в условиях Севера. Материалы Всесоюзной конференции. Новосибирск. 1980: 24-25 .

12. Пащенко В.П. Влияние сыворотки крови жителей Заполярья на репродуктивную активность фибробластов эмбрионов человека в культуре Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1982: 54 .

13. Пащенко В.П., Сидоров П.И., Ишеков Н.С. Влияние сыворотки больных алкоголизмом на репродуктивную активность эмбриональных клеток человека. Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1981: 97-80.

14. Пащенко В.П., Муратова И.Д., Сидоров П.И., Ишеков Н.С. и др. Ранние формы алкоголизма. Возможности методики клеточных культур в диагностике алкоголизма. Депон. ВИНТИ центр. 17. Инв. N 0283. 0049652 . Москва. 1982 , 34 с.

15. Пащенко В.П., Сидоров П. И., Чуркин Н.Л., Борисов И.Н. Влияние сыворотки больных алкоголизмом на рост первичных культур плодов человека Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК АМН СССР. 1983: 65-66.

16. Пащенко В.П., Сидоров П.И., Ишеков Н.С. Влияние сыворотки крови больных алкоголизмом на репродуктивную активность фибробластов эмбрионов человека. Невропатология и психиатрия. 1984, 84(2): 240-243.

17. Пащенко В.П., Сидоров П.И., Борисов И.Н., Чуркин Н.Л. Влияние сыворотки крови больных алкоголизмом на рост первичных культур почечных клеток плодов человека. Невропатология и психиатрия, 1987, 87(2): 237-239 .

**ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ В
ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СТВОЛОВЫХ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО
МОЗГА**

В.М. Семенова, Д.М. Егорова, Л.П. Стайно

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова НАМН Украины», Киев,

seveme22@rambler.ru

В настоящем обзоре освещены современные представления о биологических свойствах стволовых опухолевых клеток в злокачественных глиомах головного мозга, их роли в гистогенезе этих опухолей и взаимоотношениях с нейральными стволовыми клетками нейрогенераторных зон головного мозга. Показаны возможности использования метода культивирования в изучении нейросферообразования – фундаментального свойства стволовых опухолевых клеток. Приведены методические подходы к получению нейросфер в условиях культивирования, а также способы идентификации стволовых опухолевых клеток в составе нейросфер. Представлены результаты количественной оценки активности нейросферообразования в культуре клеток злокачественных глиом, отражающие степень анаплазии исходных опухолей, позволяющие прогнозировать исходы заболеваний у нейроонкологических больных. Описаны перспективы практического использования культивируемых нейросфер с целью поиска антибластических препаратов с избирательным воздействием на стволовые опухолевые клетки глиом.

Ключевые слова: стволовые опухолевые клетки, нейральные стволовые клетки, нейросферы, глиомы головного мозга, метод культивирования тканей.

К настоящему времени накоплено большое количество данных, предполагающих, что злокачественные глиальные опухоли головного мозга формируются из популяции недифференцированных нейроклеток-прогениторов (1). В литературе эта популяция