

Ярославский государственный медицинский университет



Культивирование клеток животных и человека

Профессор **А.В.ПАВЛОВ**



❖ Культивирование клеток животных и человека: общая характеристика

▪ Технологии поддержания жизнеспособности клеток в искусственно созданных контролируемых условиях вне организма

▪ Цели и задачи

- **фундаментальные** - раскрытие молекулярных механизмов функционирования клеток, тканей органов и организма в целом
- **прикладные** – биотехнологии, тканевая инженерия, репродуктивная и регенеративная медицина
- наибольший интерес для медицины представляет культивирование клеток высокоорганизованных многоклеточных животных и человека

▪ Ограничения

- При выращивании вне организма клетки:
 - теряют большинство существующих в организме внешних связей в составе тканей и органов
 - сохраняют лишь геном, а все остальные свойства меняются (*размеры, скорость роста, экспрессия генов, метаболизм, функциональная активность, чувствительность к лекарствам*)
- Клетки в культуре пока остаются лишь приближенной моделью клеток в составе организма

▪ Модели реализации

- Идеальный вариант - создание условий *in vitro*, которые максимально воспроизводят условия *in vivo*
- **Диссоциированные культуры клеток *in vitro***
- **Органотипические культуры**
- **Органные культуры, культуры explantов *ex vivo***



1. Технологии культивирования диссоциированных клеток *in vitro*





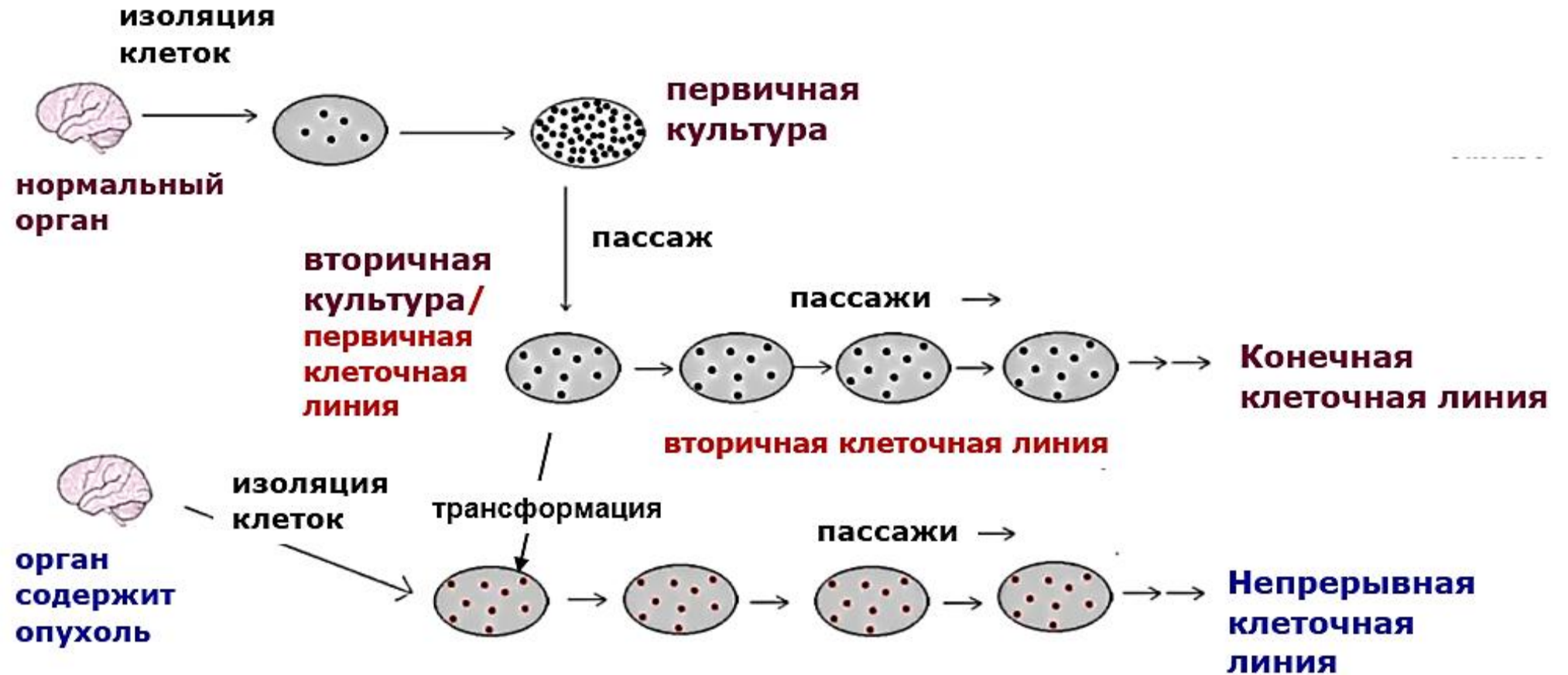
❖ Этапы культивирования клеток



1. Фрагмент ткани измельчают механически и обрабатывают протеолитическими ферментами, расщепляющими внеклеточный матрикс (трипсином, коллагеназой, гиалуронидазой), кальций-связывающими соединениями и ДНКазой
2. После этого клетки отделяют от обломков матрикса (дебриса) центрифугированием и/или фильтрацией и высаживают в культуральные флаконы или чашки Петри.
3. После выделения клетки помещают в питательную среду и растят в чашках Петри или флаконах в атмосфере углекислого газа (5% CO₂) и близкой к 100% влажности
 - питательная среда состоит из физиологических солей, буфера pH, аминокислот, витаминов и глюкозы, а также белковых ростовых и питательных факторов
4. Чтобы продлить жизнь культуры, небольшое количество клеток пересевает для выращивания в другом лабораторном сосуде, в замененной среде, насыщенной питательными веществами (пассирование, субкультивирование)



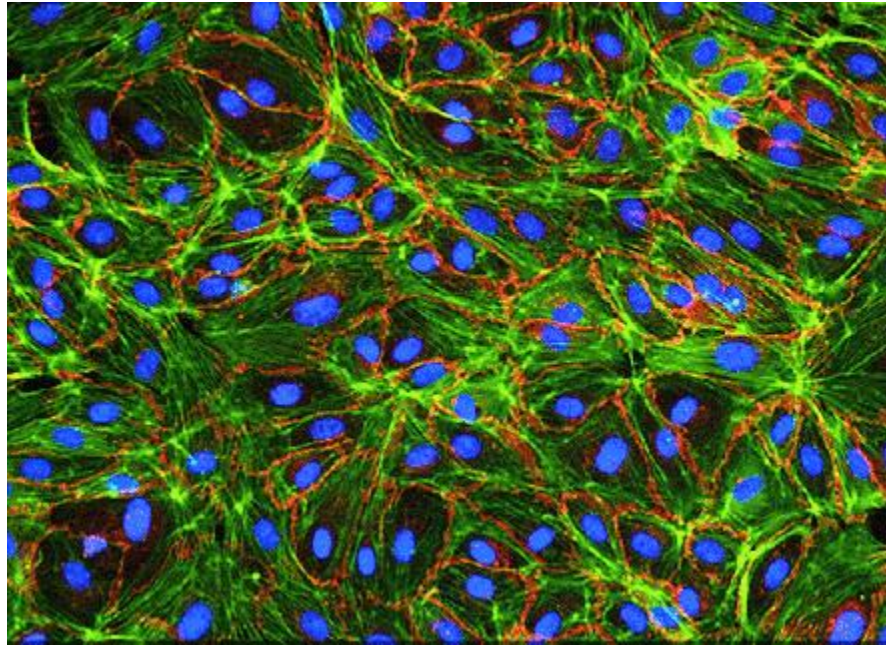
❖ Этапы культивирования клеток



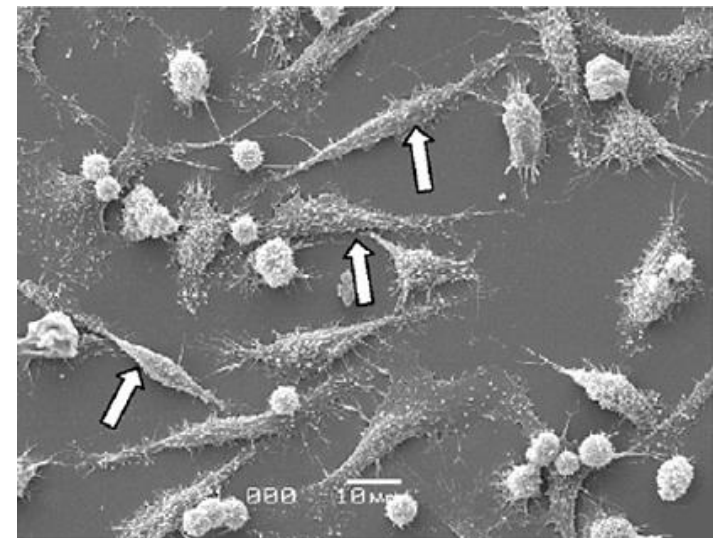


❖ Типы клеточных культур: первичные культуры

- **Первичные культуры** - свежие, получаемые из какого-либо органа и существующие до первого пересева:
 - наиболее распространенные культуры дифференцированных (неопухолевых) клеток
 - лучше соответствуют клеткам *in vivo* (нейроны проводят электрические импульсы, гепатоциты секретируют альбумин, макрофаги фагоцитируют бактерии)
 - источники: лабораторные животные, у человека - побочные продукты акушерства и хирургии (культуры эндотелиальных клеток из пуповинной вены, мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани)
 - несут генотип донора, а поэтому могут использоваться для изучения причин патологий конкретного пациента на молекулярном уровне
 - число делений клеток критически зависит от условий культивирования, но редко составляет более 5–10 раз (за исключением стволовых и некоторых специализированных клеток - например, активированных Т- и В-лимфоцитов).



- Эндотелиальные клетки пуповинной вены (HUVEC)

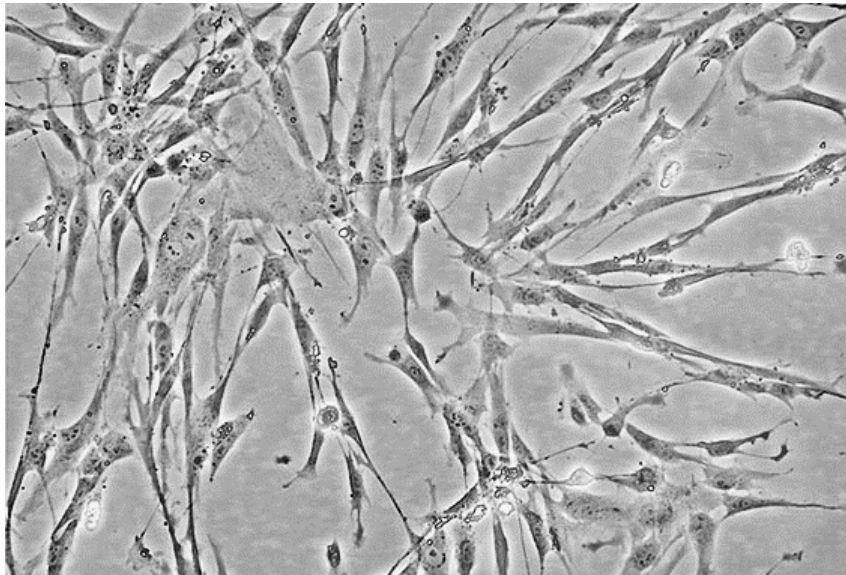


- Макрофаги



❖ Типы клеточных культур: диплоидные культуры

- **Вторичные (диплоидные) культуры** – получены в результате пересева первичных:
 - сохраняют исходный диплоидный набор хромосом 20-50 поколений, затем трансформируются в анеуплоидные, гибнут или становятся постоянными
 - последовательное субкультивирование первичных клеток приводит к созданию новых клеточных линий - с течением времени преобладают клетки с наибольшей способностью к росту
- Клеточные линии, полученные из первичных клеточных культур, являются **конечными клеточными линиями**



• Эмбриональные фибробласты легкого WI-38

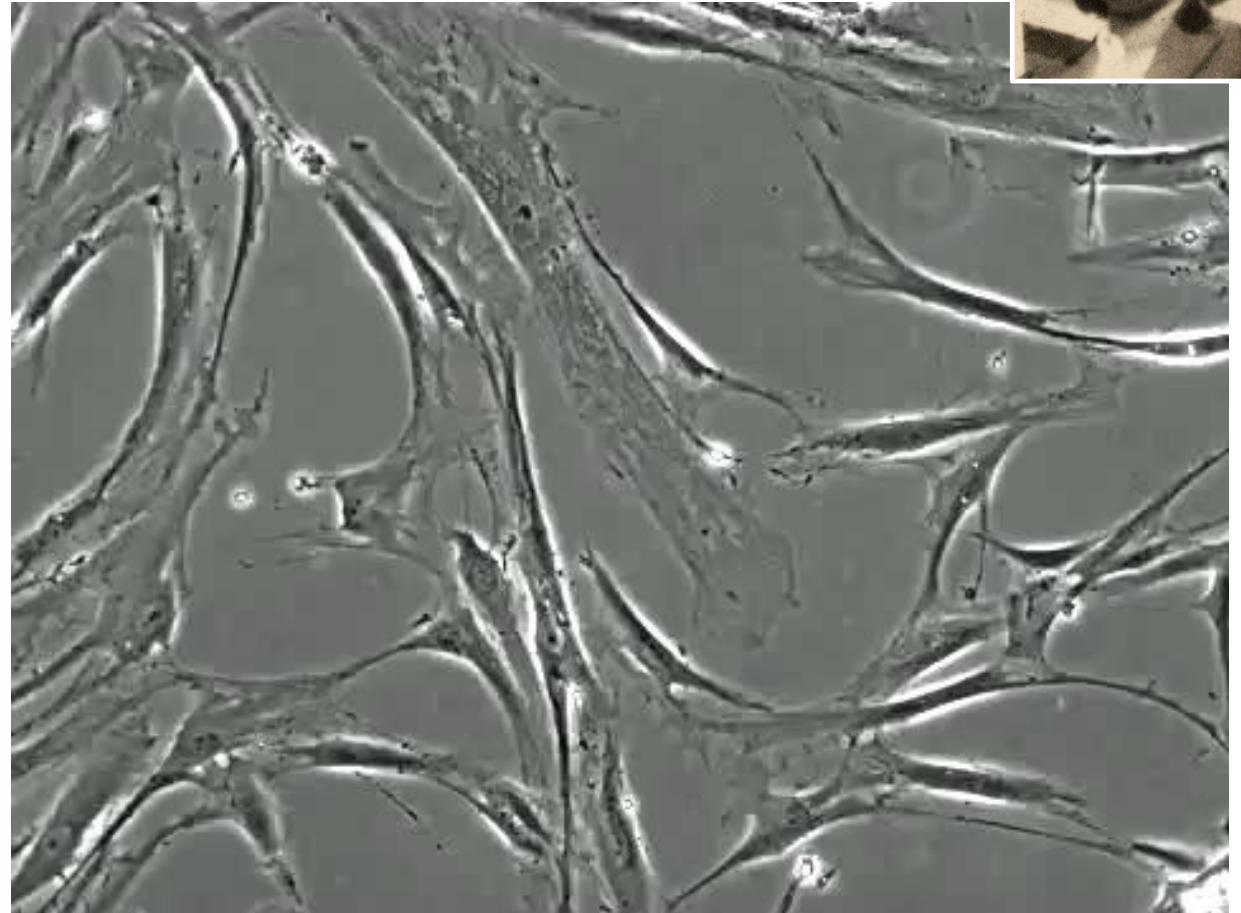
- В 1965 г. Леонард Хейфлик получил линию фибробластов легкого человека WI-38 и обнаружил наличие предела числа делений клеток в культуре (*«предел Хейфлика»*)
 - для человеческих клеток - 50–70 делений и обусловлен укорочением теломер — фундаментальным механизмом старения клеток
 - линия изучена, наработана и заморожена в достаточном количестве, чтобы обеспечить исследования по всему миру и по сегодняшний день
 - благодаря человеческому происхождению, отсутствию вирусных инфекций и раковой трансформации эта линия нашла широкое применение в производстве вакцин



❖ Типы клеточных культур: постоянные культуры

- **Постоянные культуры (непрерывные клеточные линии)** - способны к неограниченному количеству генераций, анеуплоидные, теряют многие черты клеток-доноров:
 - не имеют предела числа делений, что позволяет наращивать их в неограниченном количестве
 - в связи с быстрым ростом поддержание культуры требует пассирования, возраст культуры считают по числу пассажей
- **опухолевые клетки** – сильно отличаются от нормальных, имеют увеличенный набор хромосом, могут быть заражены вирусами (непригодны для получения вакцин)
- **иммортиализованные клетки** - получены из нормальной ткани, приобретают способность к неограниченному числу делений в результате искусственного введения определенных генов или слияния с раковыми клетками

- Одна из самых распространенных клеточной линий - **линия клеток рака шейки матки HeLa**, полученная в 1951 г. от пациентки Генриетты Лакс, умершей вскоре после взятия этих клеток

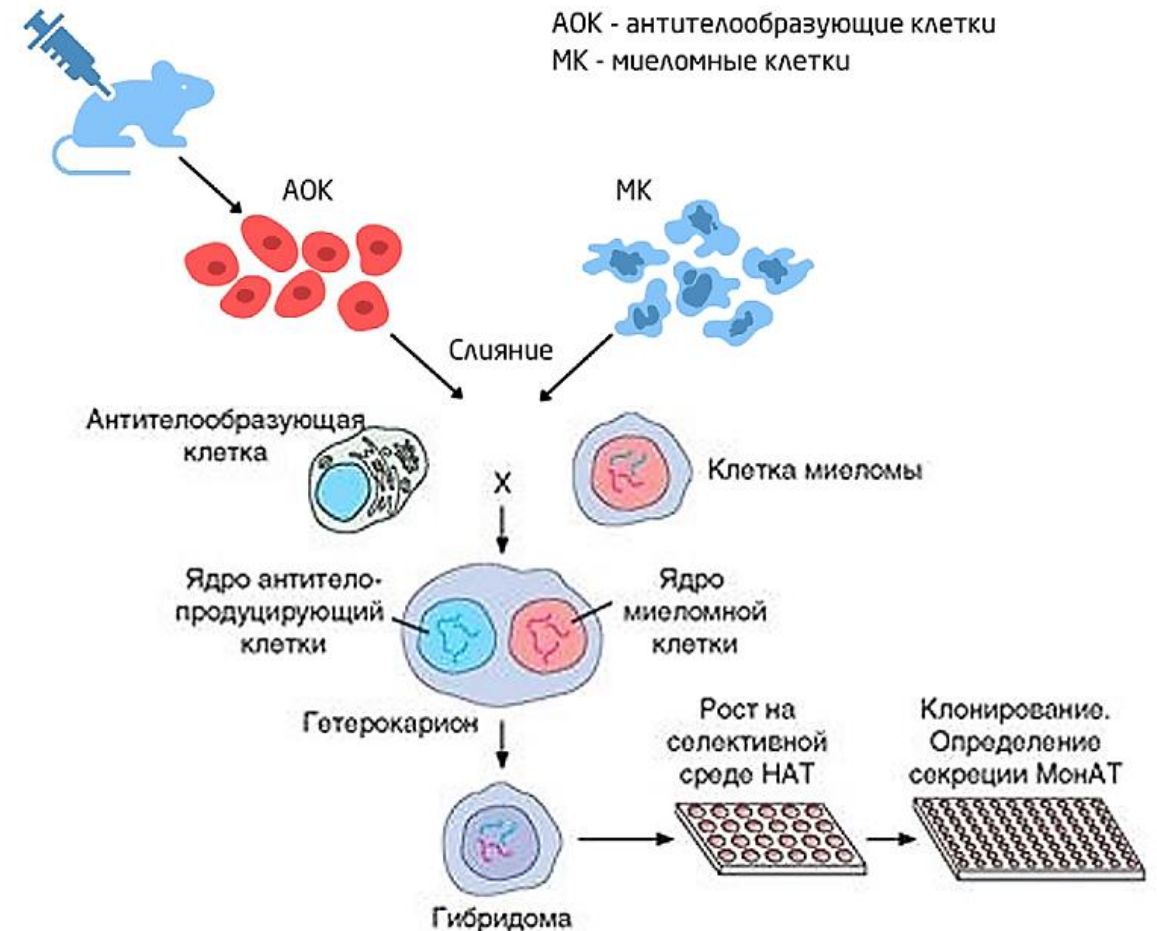




❖ Постоянные клеточные культуры: иммортализованные клетки

▪ Иммортализованные клетки

- если конечная клеточная линия претерпевает трансформацию и приобретает способность продолжать делиться, она трансформируется в непрерывную клеточную линию.
- трансформация или мутация могут происходить естественным путем, либо быть вызваны вирусами или химическими веществами, либо возникать в результате внедрения клеточных культур в раковую ткань
- клетки, выращенные таким образом, можно субкультивировать и культивировать в течение длительного времени в виде постоянных и бессмертных клеточных линий
- они быстро растут и менее внимательны к своим потребностям в питании, способны расти до большего числа клеток и отличаются по фенотипу от исходной ткани



- Образование гибридом в результате слиянием клонов лимфцитов с миеломными клетками
- Результат – непрерывная клеточная линия, продуцирующая моноклональные антитела

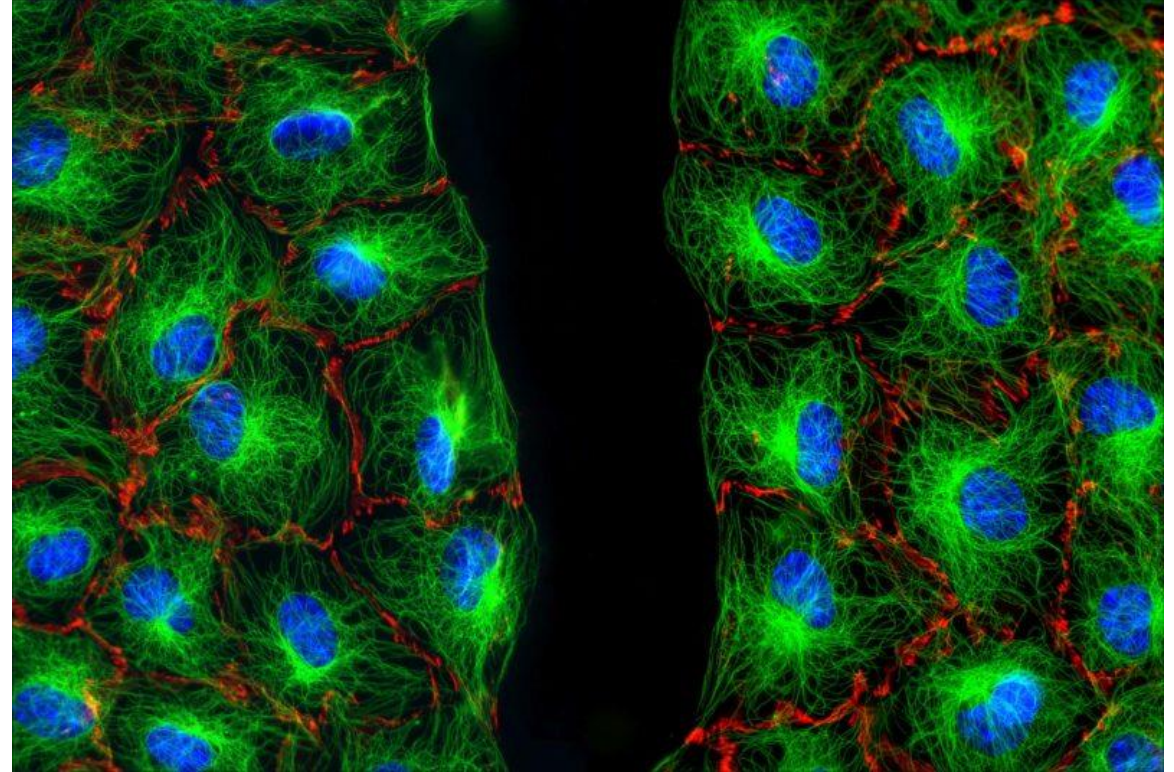


❖ Типы клеточных культур: способы выращивания

- **Монослойные (адгезионные) культуры** – культивирование клеток в виде одного слоя, прикреплённого к какой-либо поверхности, другим клеткам, либо специально обработанному искусственному субстрату
 - клеточный монослой занимает от 80 % до 100 % субстрата, оставляя 20 % на промежутки между клетками и формирование межклеточных связей



Колонка из флаконов Ру с монослойными культурами клеток



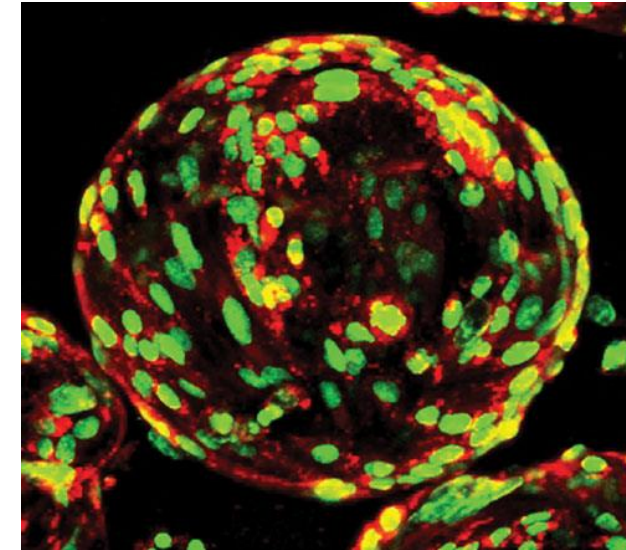
▪ Клетки в монослое:

- формируют сложные связи с другими клетками и поверхностью
- способны коллективно мигрировать, чтобы заполнить бесклеточную поверхность, что воспроизводит поведение ткани *in vivo*, например заживление ран.



❖ Типы клеточных культур: способы выращивания

- **Суспензионные культуры** – тип клеточной культуры, в которой отдельные клетки или их небольшие агрегаты функционируют и размножаются в питательной среде
 - используются для культивирования неадгезивных клеточных линий (кроветворные клетки, растительные клетки)
 - для поддержания клеток в суспензии ее необходимо перемешивать и культивировать в определенном диапазоне плотности клеток, чтобы избежать их гибели



- Культура клеток почки человека на магнитном микроносителе (иммуногистохимия)

- **Монослойное культивирование на микроносителях**

- микроносители – мелкие твердые частицы, поддерживаемые во взвешенном состоянии благодаря перемешиванию.
- на поверхности микроносителей клетки растут в виде монослоя
- метод совмещает монослойное и суспензионное культивирование



❖ Типы клеточных культур: способы выращивания

- **Объемное культивирование (3D культура клеток)** - искусственно созданная среда, в которой клетки растут и взаимодействуют с окружающей средой во всех трех измерениях

- **Трехмерные культуры** выращивают:

- в биореакторах, небольших капсулах, в которых клетки могут превращаться в **сфероиды**, или 3D клеточные колонии (*бескаркасные методы*)
- на пористых и микроволокнистых биоматериалах (*каркасные методы*)

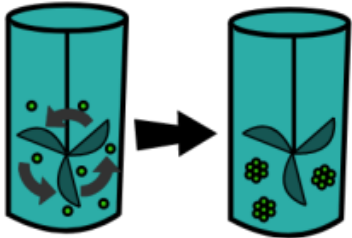
- **Каркасные методы:**

- опухолевые клетки человека на волокнистой трехмерной поддерживающей сети

- **Висячая капля**



- **Биореактор**



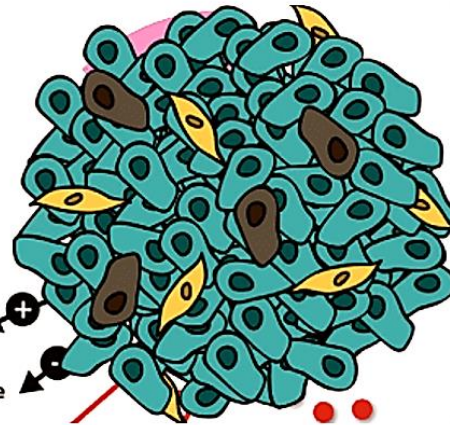
Cellular heterogeneity:

Cancer cells + Cancer stem cells + Stromal cells
(e.g., fibroblasts, endothelial cells)

Microenvironment gradients:

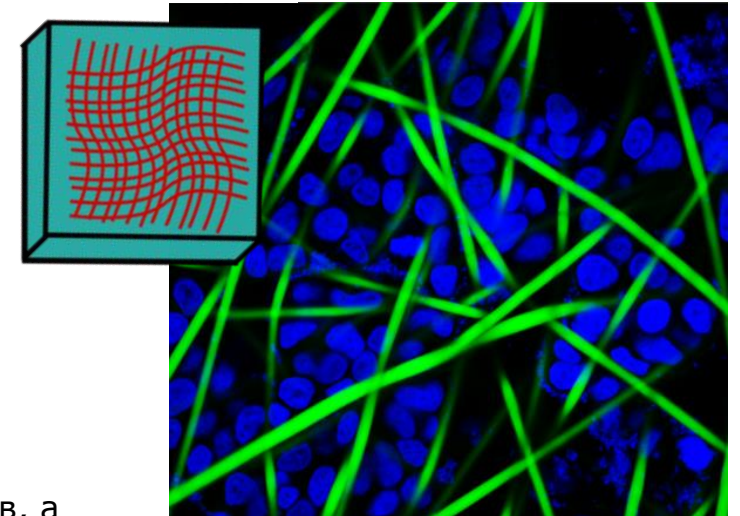
Nutrients, O₂ and pH

CO₂ and waste



- **Сфероиды** – шарообразные агрегаты из клеток:

- имеют сложную, отражающую все виды межклеточных контактов, а также взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом,
- могут быть сформированы из разных видов клеток,
- удобная модель для доклинических исследований лекарств





❖ Системы для культивирования и консервации клеток

- **Непроточные культуры** - клетки находятся в фиксированном объеме среды, которая периодически обновляется, избыток клеток удаляется



- **Проточные культуры** - клетки находятся в гомеостатических условиях с постоянным поддержанием оптимальной концентрации питательных веществ и плавным отводом метаболитов и избытка клеток



ДЕПОЗИТАРИЙ
ЖИВЫХ СИСТЕМ
"НОЕВ КОВЧЕГ"

- Криоконсервированные ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) культуры клеток человека и животных собраны в коллекциях глобальных центров хранения, изучения и использования биологических ресурсов
- Наиболее полная коллекция ATCC (Американская коллекция типовых культур) насчитывает более 4600 клеточных культур эукариот, в России – проект МГУ «Ноев ковчег»



❖ Современная лаборатория культивирования клеток: базовое оборудование

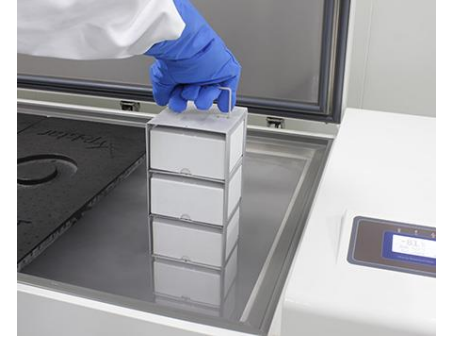
- **Ламинарный бокс**
(стерильность, воздухообмен)



- **Инvertированный микроскоп**



- **Холодильное оборудование**
(низкотемпературная заморозка, криоконсервация)



- **CO₂ - инкубаторы**



- **Лабораторное оборудование**
(центрифуги, шейкеры и др.)



- **Расходные материалы**
(питательные среды, реактивы, лабораторная посуда и др.)





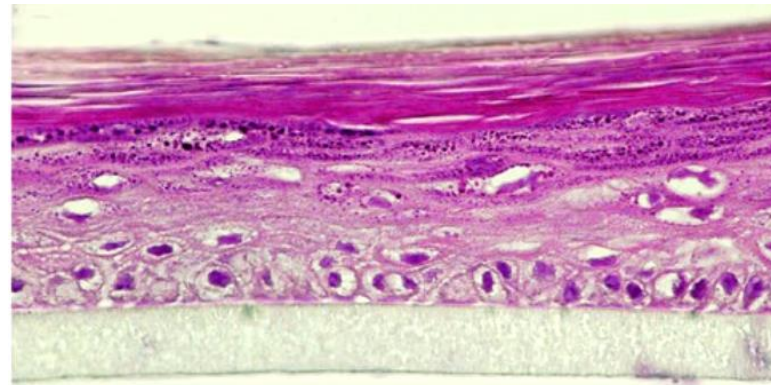
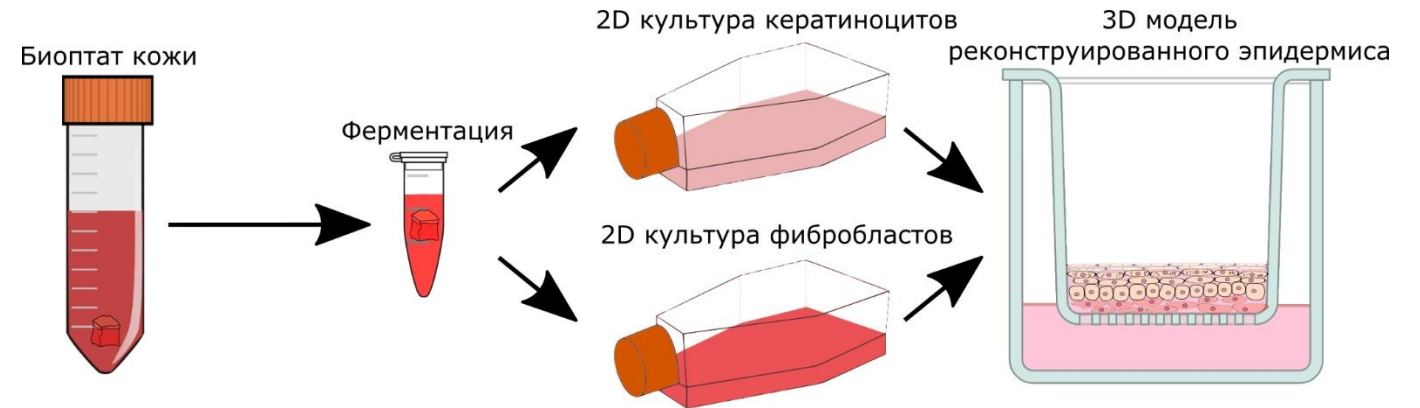
II. Органотипические культуры

III. Органные культуры, культуры эксплантатов *ex vivo*



❖ Органотипические культуры

- В органотипических культурах **совместно культивируется несколько типов клеток**
- Такие культуры могут включать поддерживающий каркас для имитации архитектуры органа *in vivo*
- **Модели кожи** – наиболее продвинутие органотипические системы (*живой эквивалент кожи – ЖЭК*)
 - ЖЭК – тканевая трехмерная конструкция, состоящая из слоя кератиноцитов и лежащего под ним слоя ФБ, погруженных в матрицу, имитирующую внеклеточный матрикс

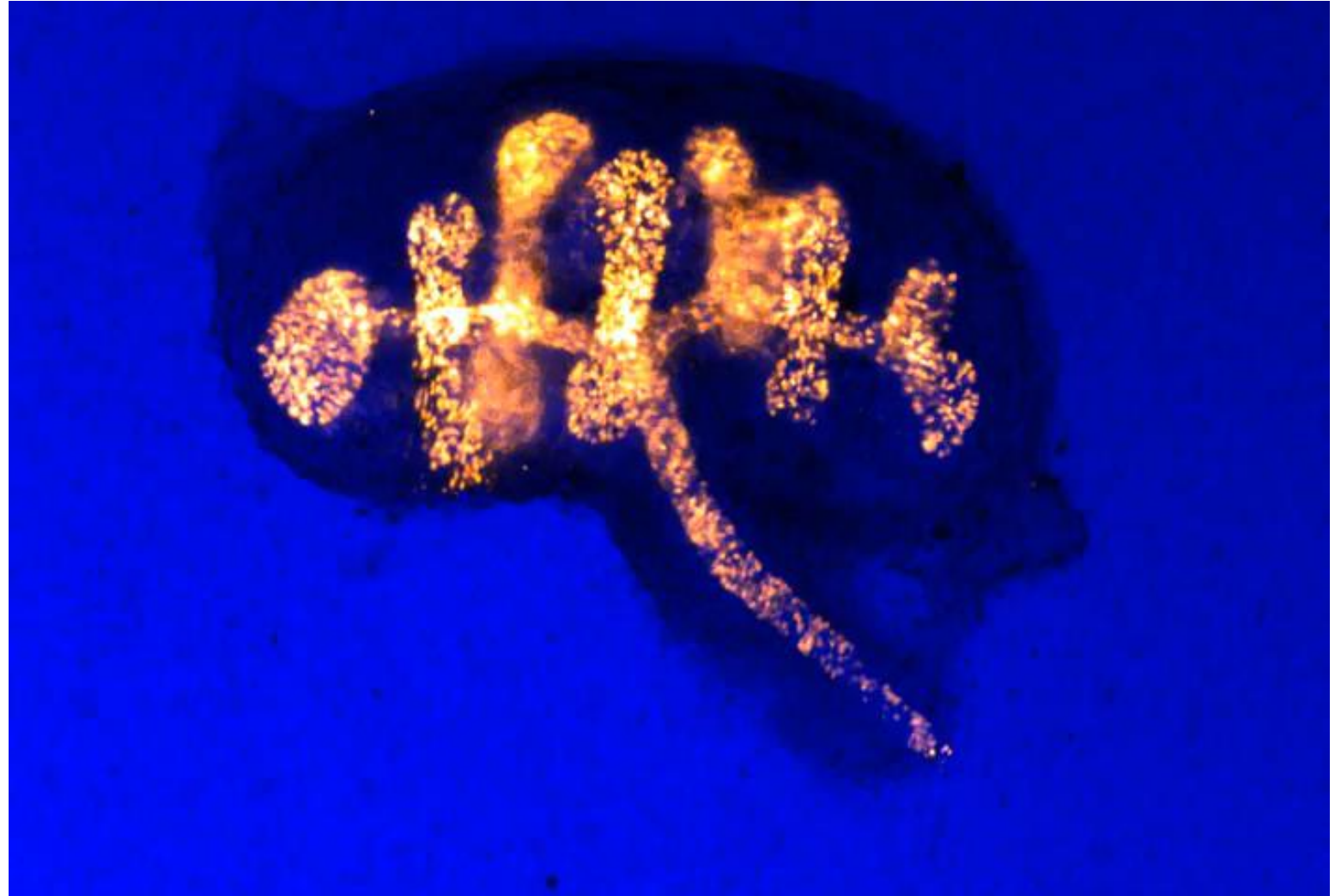




❖ Органные культуры, культуры эксплантатов *ex vivo*

- В органной культуре отдельные органы или их фрагменты (эксплантаты) культивируют на границе раздела «жидкость – газ», что позволяет воспроизводить *ex vivo* процессы, происходящие *in vivo*
- Основные ограничения метода – высокая трудоемкость и невозможность длительного поддержания жизнеспособности объектов

- **Пример органной культуры:**
формирование туловищной почки
зародыша мыши
(иммунофлуоресцентная метка,
таймлапс, 67 час. культивирования)





❖ Заключение



- **Культивирование клеток вне организма** позволяет:
 - изучать гистофизиологию внутриклеточных механизмов жизнедеятельности клеток
 - исследовать механизмы нормального и патологического роста и развития клеток/тканей/органов (*эмбриогенез, гистогенез, туморогенез, межклеточные и межтканевые взаимодействия*)
 - проводить тестирование эффектов и изучение механизмов действия биологически активных и лекарственных веществ
 - проводить генетическую диагностику

- **Клеточные и органные культуры** - базовый элемент:
 - современных биотехнологий по производству многих биопрепаратов, культивирования вирусов для идентификации и получения вакцин
 - вспомогательных репродуктивных технологий
 - технологий создания искусственных тканей и органов (*тканевая инженерия, 3D-биопринтинг*)
 - методов регенеративной медицины (*клеточная терапия*)