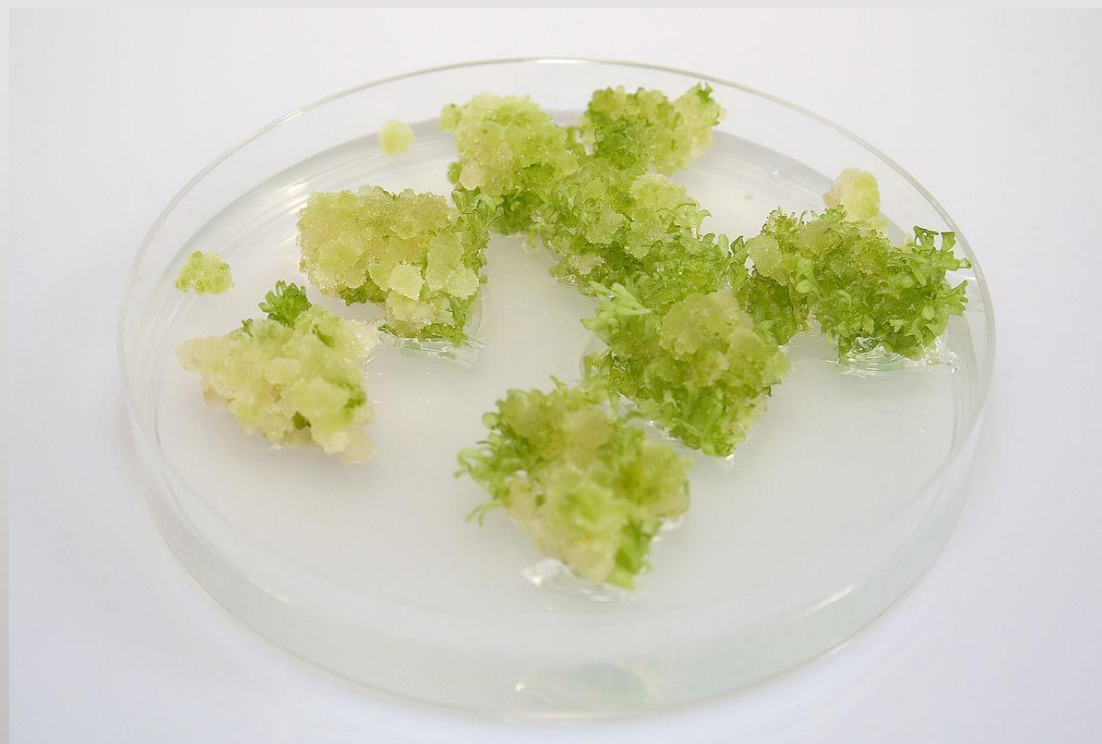


Культура клеток и тканей. История.



Первые попытки культивирования клеток *in vitro* были сделаны в 19 в. В 1885 г. Ру (*W. Roux*) удалось в течение нескольких дней поддерживать развитие медуллярной пластинки куриного эмбриона в солевом р-ре, а в 1887 г. Арнольду (*J. Arnold*) — наблюдать миграцию лейкоцитов лягушки. Однако в это время не было реальной базы для создания условий, способных поддерживать жизнедеятельность клеток и тканей *in vitro*.

Подлинным началом культивирования клеток вне организма считаются опыты Харрисона (*R. G. Harrison*), который в 1907 г. эксплантировал в сгустках лимфы лягушки кусочки медуллярной трубки эмбриона лягушки. Через несколько недель культивирования у этих клеток вырастали аксоны. Метод культивирования в сгустке лимфы, позднее в сгустке плазмы, с добавлением эмбриональных экстрактов стал одним из общепринятых и используется до наст. времени.

Развитию методов культивирования во многом способствовали исследования *А. Карреля*, который показал возможность длительного культивирования клеток в условиях строгой асептики. Флаконы Карреля являются необходимым элементом оборудования современных культуральных лабораторий. Большой вклад в разработку методов культивирования клеток внесли отечественные ученые *А. А. Максимов, А. В. Румянцев, Г. К. Хрущов, Н. Г. Хлопин и А. Д. Тимофеевский*. Группа исследователей из Национального ракового ин-та (США) под руководством *Эрла (W. Earle)* разработала методы культивирования клеток на стекле, получила культуры одиночных клеток и клеток в суспензии. Результатом работ *Фишера (D. Fischer, 1948), Мортон, Паркера, Морган (H. J. Morton, R. Parker, J. F. Morgan, 1950), Игла (H. Eagle, 1955)* явилось создание современных питательных сред для культивирования клеток млекопитающих *in vitro*.

После того как в 50-х гг. 20 в. была показана возможность размножения вируса полиомиелита на ряде клеточных культур и возникла практическая заинтересованность в разработке методов К. к. и т., для получения вакцин эта область исследований начала стремительно развиваться. Создание специальных сред культивирования позволило получить культуры клеток из разных органов и тканей многих видов млекопитающих и человека (см. таблицу). Были выведены специальные суспензионные культуры, приближающиеся по своим способностям давать большую биомассу к культурам микроорганизмов. Суспензионные культуры нашли применение в вирусологии для накопления вирусов энцефаломиелита лошадей, клещевого энцефалита, везикулярного стоматита, осповакцины, гриппа, болезни Ньюкасла, а также в производстве биологически активных препаратов: ферментов, антител, вакцин. Различные Культуры клеток и тканей применяются с диагностическими целями для культивирования вирусов.

Обнаружение явления спонтанной злокачественной трансформации клеток *in vitro*, а также трансформации с помощью ряда вирусов и химических канцерогенов явилось экспериментальной основой изучения механизмов канцерогенеза. Разработаны методы слияния клеток для образования гибридов соматических клеток, которые используются для картирования генов млекопитающих.

Совершенствование методов культивирования клеток явилось основой развития цитогенетики человека, идентификации синдромов, связанных с нарушением числа и структуры хромосом (синдромы Дауна, Шерешевского — Тернера, Клайнфелтера, Эдвардса, Патау, кошачьего крика и т. д.). Успехи в области цитогенетики и картирования генов связаны с разработкой принципиально новых методов дифференциальной окраски хромосом. Совершенствование методов культивирования амниотических клеток плода и техники амниоцентеза позволило подойти к решению основных вопросов медико-генетического консультирования — пренатальной диагностике хромосомных заболеваний и наследственных биохимических нарушений обмена.

Основные принципы культивирования

Выделение клеток

Для культивирования вне организма живые клетки могут быть получены несколькими способами. Клетки могут быть выделены *из крови*, но к росту в культуре способны только лейкоциты. Моноядерные клетки могут быть выделены *из мягких тканей* с помощью таких ферментов как коллагеназа, трипсин, проназа, разрушающих внеклеточный матрикс. Кроме того, в питательную среду можно поместить кусочки тканей и материалов.

Культуры клеток, взятых непосредственно от объекта, называются первичными. Большинство первичных клеток, за исключением опухолевых, имеют ограниченный срок использования. После определенного количества делений клетки такие стареют и прекращают делиться, хотя могут при этом сохранить жизнеспособность.

Существуют *иммortalизованные («бессмертные»)* линии клеток, способные размножаться бесконечно. У большинства опухолевых клеток эта способность является результатом случайной мутации, но у некоторых лабораторных клеточных линий она приобретена искусственно, путём активации гена теломеразы.

Культивирование клеток.

Клетки выращивают в специальных питательных средах, *при постоянной температуре*, а для клеток млекопитающих обычно необходима также *специальная газовая среда*, поддерживаемая в инкубаторе клеточных культур. Как правило, регулируется концентрация в воздухе углекислого газа и паров воды, но иногда также и кислорода. Питательные среды для разных культур клеток различаются *по составу, рН, концентрации глюкозы, составу факторов роста и др.* Факторы роста, используемые в питательных средах, чаще всего добавляют вместе с сывороткой крови. Одним из факторов риска при этом является возможность заражения культуры клеток прионами или вирусами. При культивировании одной из важных задач является исключение или сведение к минимуму использование зараженных ингредиентов. Однако на практике это бывает достигнуто не всегда. Наилучшим, но и наиболее дорогостоящим способом является добавление вместо сыворотки очищенных факторов роста.

Клетки можно выращивать в суспензии, либо в адгезивном состоянии. Некоторые клетки (такие, как клетки крови) в естественных условиях существуют во взвешенном состоянии. Существуют также линии клеток, искусственно измененных таким образом, чтобы они не могли прикрепляться к поверхности; это сделано для того, чтобы увеличить плотность клеток в культуре. Для выращивания адгезивных клеток требуется поверхность, например, культура ткани, или пластик, покрытый элементами внеклеточного матрикса для улучшения адгезивных свойств, а также для стимулирования роста и дифференцировки. Большинство клеток из мягких и твердых тканей адгезивны.

Из адгезивного типа культуры выделяются органотипические культуры клеток, которые представляют собой трёхмерную среду, в отличие от обычной лабораторной посуды. Эта система культивирования физически и биохимически наиболее сходна с живыми тканями, но имеет некоторые технические сложности в обслуживании (например, нуждается в диффузии). С целью обеспечения необходимых физических условий для культивирования адгезивных культур и заселения объема внеклеточного матрикса тканеинженерных конструкций используются системы динамического культивирования на основе роторных и вихревых биореакторов, компрессионных биореакторов, биореакторов с механическим натяжением и гидростатическим давлением, специальных биореакторов для электростимуляции клеток и тканей, а также комбинированных биореакторов.



Культуры клеток растений, как правило, выращиваются либо в виде суспензии в жидкой питательной среде, либо в виде каллусной культуры на твердой питательной основе.

Культивирование недифференцированных клеток и каллуса требует соблюдения определенного баланса гормонов роста растений ауксинов и цитокининов.

Для культивирования небольшого количества клеток бактерий и дрожжей клетки высеивают на твердую питательную среду на основе желатина или агар-агара. Для массового производства применяют выращивание в жидких питательных средах (бульонах).

Культуры вирусов выращивают на культурах клеток млекопитающих, растений, грибов или бактерий, в зависимости от природного хозяина конкретного типа вирусов. Но при некоторых условиях могут быть выращены и в клетках другого типа. В этом случае культура клеток сама служит средой для роста и репликации вируса.

Особенности выращивания клеток

При выращивании клеток, из-за постоянного деления может возникнуть их переизбыток в культуре. В результате чего могут возникнуть следующие проблемы:

- Накопление в питательной среде продуктов выделения, в том числе токсичных.
- Накопление в культуре омертвевших клеток, прекративших жизнедеятельность.

Скопление большого количества клеток оказывает негативное влияние на клеточный цикл, рост и деление замедляются, а клетки начинают стареть и отмирать.

По той же причине может начаться клеточное дифференцирование.

Для поддержания нормального функционирования культур клеток а также для предотвращения негативных явлений периодически проводят замену питательной среды, пассажирование и трансфекция клеток. Во избежание загрязнения культур бактериями, дрожжами, или другими линиями клеток, все манипуляции обычно проводят с соблюдением правил асептики в стерильном боксе. Для подавления микрофлоры в питательную среду могут быть добавлены антибиотики (пенициллин, стрептомицин) и противогрибковые препараты (амфотерицин Б).

Одним из продуктов метаболизма в клетках являются кислоты, вследствие чего рН среды постепенно снижается. Для контроля кислотности питательных сред, в них добавляют индикаторы рН. Если культура клеток адгезивная, питательную среду можно полностью заменять.

Использование клеточных культур.

Массовое культивирование клеток является основой для промышленного производства вирусных вакцин и разнообразных продуктов биотехнологии.

Продукты биотехнологии Промышленным методом из культур клеток получают такие продукты, как ферменты, синтетические гормоны, моноклональные антитела, интерлейкины, лимфокины, противоопухолевые препараты. Хотя многие простые белки относительно просто могут быть получены с использованием рДНК в бактериальных культурах, более сложные белки, такие как гликопротеины, в настоящее время могут быть получены только из животных клеток. Одним из таких важнейших белков является гормон эритропоэтин. Стоимость выращивания культур клеток млекопитающих является довольно высокой, поэтому в настоящее время проводятся исследования по возможности производства сложных белков в культурах клеток насекомых или высших растений.

С применением методики культивирования клеток в настоящее время выпускаются вакцины против полиомиелита, кори, эпидемического паротита, краснухи, ветрянки. Вследствие угрозы пандемии гриппа, вызываемого штаммом вируса H5N1, в настоящий момент правительство Соединенных Штатов финансирует исследования по получению вакцины против птичьего гриппа с использованием клеточных культур.



Спасибо за внимание!