

ПРИМЕНЕНИЕ и ТИПЫ культивируемых клеток

Прежде чем биохимик решит использовать клеточные культуры, он должен убедиться, что те преимущества, которые он при этом получает, перекроют сопряженные с данным методом трудности. При этом он не должен опасаться, что методы культивирования клеток слишком трудоемки для постоянного использования и что для достижения необходимого успеха ему придется прибегать чуть ли не к черной магии. Эти опасения в известной степени основаны на опыте исследователей, работавших с культурами клеток до 1960 г. За предшествующие тридцать лет удалось культивировать в течение различного времени практически все главные типы клеток, что позволило получить весьма ценную информацию, но это явилось результатом чрезвычайно напряженного труда.

После 1960 г. многие затруднения, встающие на пути биохимиков при использовании этого метода, были устранены в результате трех событий. Наиболее важную роль сыграл, возможно, тот факт, что промышленные компании взяли на себя поставку культуральных сред, сывороток, клеток и посуды для культивирования, что позволило выращивать клетки эпизодически или постоянно на самой различной поверхности—от менее одного квадратного сантиметра до нескольких квадратных метров. Это стало возможным только потому, что, с одной стороны, были созданы простые среды, обеспечивающие хороший рост клеток, а с другой—разработаны простые методы выделения первичных клеток, селекции клонов и хранения клеточных линий.

Главное преимущество культивируемых клеток, которое полностью используется клеточными биологами, но часто игнорируется биохимиками,—это возможность прижизненного наблюдения клеток с помощью микроскопа. Существенно то, что при работе с культурами клеток в эксперименте используются здоровые клетки и что они сохраняют жизнеспособность в течение всего эксперимента. Убедиться в этом можно, периодически тестируя культуру клеток. Более того, легко оценивать относительное содержание жизнеспособных клеток. При опытах же на целом животном состояние почек, например, можно оценить лишь в конце эксперимента, и к тому же обычно лишь качественно.

Культуры клеток представляют собой гомогенную популяцию генетически однородных клеток, растущих в постоянных условиях. Более того, исследователь может изменять эти условия в определенных пределах, что позволяет ему оценивать влияние на рост клеток самых различных факторов—рН, температуры, концентрации аминокислот, витаминов и т. п. Рост может быть оценен в течение короткого периода времени либо по увеличению числа или размера клеток, либо по включению радиоактивных предшественников в клеточную ДНК. Эти реальные преимущества по сравнению с исследованиями на целых животных ставят клеточные культуры как экспериментальную систему в один ряд с культурами микроорганизмов. Использование клеточных культур позволило в течение нескольких недель проанализировать ростовые потребности клеток человека и подтвердить результаты десятилетних исследований людей, относящихся к генетически различным популяциям, живущих в различных условиях окружающей среды. Более того, при работе с культурами клеток существенные результаты могут быть получены при использовании очень небольшого количества клеток. Эксперименты, требующие для выяснения того или иного вопроса использования 100 крыс или 1000 человек, могут быть с равной статистической достоверностью поставлены на 100 культурах на покровных стеклах. Если каждую клетку рассматривать как независимый объект эксперимента, то одна культура на покровном стекле даст более достоверный ответ, чем целая клиника, полная больных. Это является важным преимуществом, когда дело касается человека, и, кроме того, снимает многие этические

проблемы, возникающие при необходимости использовать для эксперимента большую группу животных. В ряде случаев на конечных стадиях эксперимента все же возникает необходимость в опытах на целых животных, однако ничто не мешает при этом использовать клеточные культуры в предварительных исследованиях.

Поскольку клетки в культуре легко доступны для различных биохимических манипуляций, то при работе с ними радиоактивные предшественники, яды, гормоны и т. п. могут быть введены в заданной концентрации и в течение заданного периода времени. Количество этих соединений может быть на порядок меньше, чем при экспериментах на целом животном. Исчезает также опасность того, что исследуемое соединение метаболизируется печенью, запасается мышцами или экскретируется почками. При использовании клеточных культур, как правило, бывает нетрудно установить, что при такой-то концентрации добавленное в культуру вещество находится в контакте с клетками в течение данного периода времени. Это обеспечивает получение реальных значений скорости включения или метаболизма исследуемых соединений. Интерпретация результатов таких экспериментов на целых животных чрезвычайно затруднительна, хотя и в клеточных культурах результаты могут маскироваться повреждающим действием исследуемых соединений. Однако в тех случаях, когда цель эксперимента — обнаружить действие того или иного лекарственного препарата или косметического средства на животное, факторы, создающие проблему для одного биохимика, могут явиться сутью эксперимента для другого.

Применение КК

Культивирование клеток позволило нам глубоко проникнуть в механизмы роста и дифференцировки клеток. Хотя детальные потребности в питательных факторах и механизмы контроля роста весьма сложны, культивируемые клетки в больших или малых количествах могут быть с успехом использованы в настоящее время для проведения биохимических экспериментов.

Изучение дифференцировки

Изучение дифференцировки у высших эукариот представляет собой чрезвычайно сложную проблему, однако мы уже располагаем несколькими системами, способными к дифференцировке *in vitro*. Преимущество таких систем заключается в том, что после воздействия дифференцировочного стимула популяция клеток претерпевает определенные изменения, которые можно легко выявить и количественно проследить. Такими изменениями могут быть образование белка или более сложные изменения структуры и характера роста клеток, как это имеет место при дифференцировке и слиянии миобластов или дифференцировке эпидермальных кератиноцитов, образующих систему, напоминающую ороговевающий слой кожи.

Большое количество клеточных линий получено из центральной нервной системы — в частности линии дифференцированных клеток глии и линии клеток нейронов. Кроме того, выделили линии клеток из опухолей периферической нервной системы (неопластические шванновские клетки). Поскольку клеткам-нейробластомы в культуре могут образовывать отростки, при культивировании этих клеток с дифференцирующимися миобластами происходит образование синапсов, что позволяет изучать передачу синаптических сигналов в весьма простой системе.

Группа опухолевых клеток, плазматомы, получена из плазматических клеток, продуцирующих иммуноглобулины. Плазматомы, способные размножаться *in vitro* обеспечили значительный успех в изучении механизма образования антител. Эти клетки

используются при изучении структуры и функции иммуноглобулинов, и особенно при изучении структуры и образования информационных РНК, что сыграло важную роль в углублении нашего понимания процессинга РНК и уникальной перестройки генов для антител, приводящей к разнообразию антител. Эти исследования сыграли важную роль в нашем понимании сложных процессов дифференцировки.

Генетика

Одним из главных преимуществ бактериологов по сравнению с традиционными биохимиками, работающими с эукариотами, являлась доступность широкого набора мутантных микроорганизмов, что позволяло бактериологам проводить сложные генетические эксперименты. Изучение наследственных взаимосвязей у эукариот требовало длительного времени, причем особенно длительным временем генерации отличаются млекопитающие. Наиболее остро эта проблема проявилась при изучении генетики человека, которая в лучшем случае остается лишь описательной наукой. Способность клеток к росту в культуре привела к развитию методов клонирования, хранения и слияния клеток, что в свою очередь привело к становлению новой области науки—генетики соматических клеток.

Иммунология

Хотя, как указывалось выше, клеточные культуры и находили применение в иммунологии, в течение ряда лет использование этой системы осложнялось следующим обстоятельством. Клетки, синтезирующие интересующие исследователей антитела (например, клетки селезенки животных, иммунизированных специфическими антигенами), плохо росли в культуре или совсем не росли, а клетки миеломы продуцировали антитела с неизвестной специфичностью. Способность этих двух типов клеток к слиянию позволила в последнее время наладить крупномасштабное производство моноклональных антител. Если мышью иммунизировать неочищенным препаратом антигена и затем клетки ее селезенки гибридизовать с клетками миеломы, то среди полученных гибридных клеток найдется по крайней мере одна, продуцирующая антитела, специфические к исходному антигену. Эта клетка может быть клонирована и трансплантирована в мышью в форме опухоли, продуцирующей высокоспецифические антитела в количестве, измеряемом граммами. Представляя безусловный интерес для иммунологов, это, кроме того, дает возможность биохимику получать антитела к материалу, который он не может должным образом очистить. Такие антитела могут быть, в частности, использованы для генетического анализа антигенов поверхности клеток человека.

Образование клеточных продуктов

Культуры клеток могут стать ценным источником гормонов и других секретируемых материалов, если будут предприняты дальнейшие попытки оптимизации системы в этом направлении. Культуры клеток уже сейчас оказываются важными продуцентами видоспецифического противовирусного агента интерферона.

Вирусология и трансформация клеток

Тот прогресс в области вирусологии, который произошел в последнее десятилетие, в значительной степени обусловлен возможностью выращивать вирусы в культурах клеток. Дело не только в том, что при этом для получения вирусов не требуется большого количества животных. Дело также и в том, что благодаря этому методу прежние трудоемкие и плохо воспроизводимые тесты были заменены такими простыми, точными и воспроизводимыми методами детектирования вирусов, как методы бляшек, получения вирусов и окрашивания. В результате применения этих методов выяснилось, что вирусы способны не

только инфицировать и убивать клетки, но могут также вызывать изменения в характере роста клеток—феномен, известный как вирусная трансформация клеток. Эти изменения, приводящие к появлению клеток, не реагирующих на своих соседей так, как это характерно для нетрансформированных клеток, вызывают особый интерес в связи с тем, что они могут помочь нам понять природу трансформации, поскольку сходные изменения, происходящие с клетками *ин витро*, играют, очевидно, какую-то роль в индукции опухолей.

Поскольку в настоящее время большая часть вирусных заболеваний лечится путем введения антисыворотки, выращивание вирусов имеет важное значение как для идентификации вирусов, так и для их использования в получении вакцин. Эти задачи решаются большей частью с использованием клеточных культур, и многие вирусологические отделения клиник обеспечены оборудованием для выращивания клеток и получения вирусов в больших количествах.

Определение цитотоксичности

Главным направлением использования клеточных культур представляется тестирование и изучение механизма действия различных веществ, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов, детергентов, косметических средств, инсектицидов, консервантов и т. п. Результаты, полученные на клеточных культурах, нельзя, безусловно, экстраполировать на целые организмы, но не вызывает сомнения, что если то или иное вещество оказывает повреждающее действие в нескольких линиях культивируемых клеток, то следует ожидать неблагоприятного эффекта и при введении этого вещества целому животному. Помимо того, что использование культур клеток избавляет от страданий большое количество животных, использование культур клеток человека позволяет оценивать повреждающее действие веществ у вида, недоступного для экспериментов такого рода, т. е. у человека. Более того, как уже упоминалось выше, результаты тестов оказываются более воспроизводимыми, когда они проводятся *ин витро*.

Культура растительной ткани

Хотя культивирование растительных клеток основано на тех же принципах, что и культивирование животных клеток, методология культивирования в двух этих случаях несколько различается. В известной степени это обусловлено историческими причинами, но определенную роль играют также и различия в особенностях роста растительных клеток, растущих в культуре. Так, клетки моркови или табака могут расти в виде каллюса, в виде суспензии или же в их культуре может быть индуцирован эмбриогенез. Для получения культур каллюса используются побеги или стебли. Побеги для этой цели получают из стерилизованных семян, проращиваемых в асептических условиях.

При использовании же стеблей их стерилизуют и расщепляют в асептических условиях так, чтобы их сердцевина была доступна для питательной среды. В качестве сред для культивирования обычно используют модификации предложенной ранее среды, к которой добавляют растительные гормоны роста, 3-индолилуксусную кислоту и кинетин, или их аналоги. Однако среды, используемые в повседневной практике, значительно различаются между собой.

Культуры каллюса начинают свой рост из растительной ткани, и такой тип культуры используется для поддержания материала. Культуры каллюса обычно поддерживаются на поверхности твердой агаровой среды. По этой причине различные участки каллюса оказываются в различных условиях окружающей среды; поэтому в большинстве случаев для биохимических исследований используются диспергированные клетки каллюса, растущие в

суспензии. При возвращении на твердую среду клетки претерпевают определенную последовательность клеточных делений, приводящих к появлению адвентивных эмбрионов.

В последнее время культура растительной ткани приобрела большое значение для сельскохозяйственной промышленности. Произошло это, когда было показано, что из одной клетки, отделенной от каллюса, может быть выращено индивидуальное растение моркови, т. е. тысячи идентичных растений моркови могут быть получены из одного кусочка каллюсной ткани. Следовательно, при получении растения с повышенной продуктивностью нет необходимости ждать несколько лет для его воспроизводства и накопления достаточного количества посевного материала. Вместо этого в течение нескольких месяцев можно получить много идентичных клонированных растений. Все эти растения будут одинаковы по внешнему виду, цвету и размеру с редкими случаями неконтролируемых вариаций.

ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК

Первичные клетки и трансформация

Клетки, полученные от животного и поддерживаемые в культуре, называют первичными клетками до тех пор, пока они не будут субкультивированы. При успешном установлении культуры первичные клетки начинают размножаться, и их необходимо периодически пересевать (субкультивировать). При достижении полного монослоя первичную культуру следует пересевать в 2 или 4 новых флакона, причем рассев культуры может повторяться примерно с недельным интервалом в течение нескольких месяцев. Клетки могут при этом оставаться диплоидными и сохранять многие характерные особенности исходного эксплантата. Такую культуру называют клеточной линией. В ней может присутствовать несколько различных сортов клеток, и некоторые характерные особенности клеток могут оказаться нестабильными. Клетки можно клонировать, причем некоторые клоны могут обладать стабильным фенотипом.

Ранее исследователи полагали, что при поддержании соматических клеток в культуре в подходящих условиях клетки могут делиться в течение неограниченно долгого времени, сохраняя немодифицированную форму. Однако дальнейшие исследования показали, что это не так. Культуры первичных клеток легко получить из многих тканей. Какое-то время эти клетки экспоненциально размножаются, но затем примерно через 6 месяцев скорость роста культуры снижается, а через 10 месяцев клетки дегенерируют и погибают. Это наблюдается после 50 генераций, когда из каждой начальной первичной клетки образуется культура примерно из 1022 клеток.

В литературе не имеется твердой точки зрения на употребление терминов «линия клеток» и «штамм клеток», в связи с чем многие авторы рассматривают их как взаимозаменяемые. Другие же исследователи определяют штамм клеток как популяцию клеток, полученную из первичной культуры путем посева, а под линией клеток понимают клеточную популяцию, полученную из первичной культуры и выращиваемую неопределенно долгое время *ин витро*.

Соотношение между количеством генераций и количеством пассажей зависит от отношения пассирования. Если клетки пассируются таким образом, что содержимое одного флакона распределяется между двумя новыми флаконами (отношение пассирования 1:2), то количество пассажей и количество генераций оказываются одним и тем же. В этом случае образование полного монослоя и необходимость пассирования достигаются после удвоения числа клеток в культуре. При отношении пассирования 1 : 4 возраст клеток, выраженный в количестве генераций, будет вдвое выше, чем количество пассажей.

Потребности в питательных веществах

В 40-х и начале 50-х годов большая часть клеток выращивалась в плазме или на фибриногеновом сгустке в присутствии тканевых экстрактов или их ультрафильтратов. В своей классической работе Игл исследовал потребности этих клеточных линий в питательных веществах. Ему удалось добиться размножения клеток этих штаммов в среде определенного состава, содержащей смесь аминокислот, витаминов, солей и углеводов, а также небольшое количество диализованной сыворотки лошади или человека. Специфическая питательная недостаточность индуцировалась удалением из среды какой-либо аминокислоты или витаминов, причем последствия этого удаления должны были быть скомпенсированы при восстановлении недостающего компонента. 27 факторов были определены как незаменимые для роста. Они составили основу среды, известной как «базальная среда Игла», или БСИ. Из 20 аминокислот 13 оказались незаменимыми, а остальные 6 могли быть синтезированы клетками из других источников углерода. Удаление любого из семи витаминов приводило к развитию симптомов недостаточности. Таким образом, Игл, используя метод культивирования клеток, продемонстрировал питательные потребности клеток мыши и человека. При культивировании клеток в БСИ среду необходимо обновлять, и поэтому БСИ была вскоре заменена на минимальную среду Игла (МСИ) (МЕМ) в которой концентрация различных компонентов была повышена, что обеспечивало непрерывный рост клеток в культуре в течение нескольких суток без смены среды.

Сыворотка служит источником неидентифицированных факторов в среде Игла. До сих пор нет общего мнения относительно роли сыворотки в клеточных культурах. Неизвестно, является ли сыворотка источником низкомолекулярных соединений, требующихся в очень малых количествах и переносимых сывороточными белками, или же сыворотка обеспечивает клетки незаменимыми белками, или же, наконец, сыворотка служит источником и низкомолекулярных и высокомолекулярных незаменимых соединений. Было показано, что альфа-глобулиновая фракция (фетуин), присутствующая как в сыворотке плода, так и в сыворотке взрослого организма, способствует прикреплению клеток к стеклу и их распластыванию, т. е. обоим процессам, необходимым для размножения клеток. Действие фетуина приписывают его антитриптической активности. В настоящее время после трипсинизации ткани или клеточного монослоя действие трипсина обычно блокируют добавлением среды, содержащей сыворотку.

В 70-х годах исследователей заинтересовала роль сывороточного альбумина в культурах в связи со способностью этого белка служить переносчиком для небольших молекул. Эти небольшие молекулы (гормоны) могут стимулировать рост различных типов клеток.

Одна из проблем, возникающих при попытках получать культуры одиночных клеток или культуры клеток с низкой плотностью (например, 100 клеток в 1 мл), заключается в том, что в этих условиях клетки погибают или растут очень медленно. Клетки могут расти при низкой плотности, если помимо обычных компонентов добавлять в среду серин или цистин. В результате Подробного изучения этих и других потребностей, зависящих от плотности популяции, была разработана концепция «кондиционированной среды». Клетки способны синтезировать различные добавочные компоненты, однако они выходят из клеток в среду со скоростью, превышающей биосинтетическую способность клеток. Кондиционированная среда—это такая среда, в которой концентрация метаболитов находится на таком уровне, что наступает равновесие между выходом метаболитов из клеток в среду и обратным захватом этих метаболитов клетками.

КОНТРОЛЬ РОСТА

Клеточный цикл и цикл роста

Растущие клетки регулярно делятся примерно один раз в каждые 24 часа. В период между делениями, т. е. в интерфазе, клетки удваивают количество ДНК в течение определенной фазы клеточного цикла, так называемой фазы синтеза ДНК или фазы S. Фаза S отделена от клеточного деления или митоза двумя периодами G1 и G2. При отсутствии каких-либо ограничений клетки равномерно распределены по клеточному циклу, и если количество клеток удваивается через правильные промежутки времени, то говорят, что культура находится на стадии экспоненциального роста.

Обычно после короткого периода экспоненциального роста тот или иной фактор становится лимитирующим. Это может происходить в результате истощения какого-либо фактора среды или же в результате того, что культивируемые клетки полностью покроют поверхность, на которой они растут. Скорость роста культуры при этом замедляется, и количество клеток в культуре достигает насыщения (конечная плотность клеток). Когда дальнейшие деления клеток прекращаются, наступает стационарная фаза роста культуры. При восстановлении в культуре лимитирующего фактора клетки возвращаются в фазу G1 клеточного цикла, происходит цикл синтеза ДНК, после чего клетка делится. Имеется несколько теорий, объясняющих такой тип контроля роста, но все они исходят из предположения, что контроль осуществляется на каком-то этапе, расположенном вскоре после деления. После прохождения этого этапа клетки включаются в клеточный цикл и делятся.

Большая часть клеток у животных находится под такой формой контроля роста, что они прекращают продвижение по клеточному циклу, вскоре после митоза. Следовательно, для стимуляции первичной клеточной культуры, прежде чем клетки возобновят движение по циклу к фазе деления, следует устранить ограничение роста. Клетки некоторых быстро растущих опухолей утрачивают чувствительность к контролю роста, и по-этому полученные из опухолей первичные клетки легко адаптируются к росту в культуре и могут «дорастет» до более высокой плотности по сравнению с клетками из нормальных тканей.

В культурах иногда образуются гигантские клетки—особенно в случаях роста в неоптимальных условиях. Образование таких клеток обусловлено тем, что растущие клетки теряют способность делиться и могут увеличиваться в размере, пока не достигнут в диаметре 1 мм и более. Частота образования гигантских клеток заметно увеличивается в результате облучения. Наличие небольшого количества гигантских клеток в популяции, вероятно, не представляет особых проблем для биохимических исследований, но если их число растет, то это отражает плохие условия культивирования;

такие культуры должны быть выбракованы и заменены новыми культурами, растущими в нормальной среде.

Зависимость от прикрепления и рост в суспензии

Хотя лимфоциты не обнаруживают тенденции к агрегации *in vivo*, могут расти *in vitro* в суспензии, большинство нетрансформированных клеток млекопитающих могут расти только будучи прикрепленными к субстрату—либо к другим клеткам, либо к коллагену, либо к стеклу или пластику. Пластиковая поверхность должна быть специально обработана, чтобы клетки могли к ней прикрепиться, причем клетки эукариот не прикрепляются к пластиковым чашкам, предназначенным для бактериальных культур. При покупке пластиковой посуды важно выяснить, что она предназначена для культуры тканевых клеток; в каталогах такая посуда обычно обозначается буквами TC (tissue culture). К природным субстратам, на которых фибробласты растут *in vivo*, относится коллаген. Другим излюбленным субстратом для изучения закономерностей роста клеток в зависимости от прикрепления к субстрату

является желатин (денатурированный коллаген) Чашки могут быть обработаны водным раствором желатина (1% в течение 2 ч при 4°C), после чего их следует ополоснуть водой и хранить при комнатной температуре вплоть до употребления.

Для некоторых целей рост клеток, прикрепленных к субстрату, оказывается предпочтительнее, но для других целей лучше использовать клеточные суспензии. Как правило, клетки, отделившиеся от субстрата, на котором они росли, неспособны к росту в суспензии и быстро дегенерируют. Было показано, что если L-клетки поддерживать во вращающемся флаконе при скорости его вращения 40 об/мин, то такие клетки не прикрепляются к поверхности, а добавление в культуру метилцеллюлозы до концентрации 0,1% предотвращает агрегацию клеток и поддерживает их жизнеспособность. Был отобран ряд клеточных штаммов, хорошо растущих в суспензии, но некоторые другие штаммы клеток могут расти как на субстрате, так и в суспензии в зависимости от солевого состава культуральной среды; удаление двухвалентных ионов и увеличение концентрации фосфата благоприятствуют росту клеток в суспензии.

Регуляция, зависящая от плотности культуры (контактное торможение)

Первичные клетки, которые делятся в культуре, могут претерпевать так называемое контактное торможение движения. Когда две клетки приближаются друг к другу, то в зоне контакта прекращаются специфические движения клеточной мембраны. Первичные клетки, следовательно, не могут расти друг над другом, и в большинстве случаев достижение плотного монослоя сопровождается прекращением клеточных делений. Этот феномен характерен не только для первичных клеток, но наблюдается также во многих клеточных линиях. Прекрасным примером этому служит линия мышинных фибробластов 3Т3. Клетки этой линии быстро размножаются в редкой культуре, но как только клетки образуют полный монослой (~10⁶ клеток на чашку диаметром 6 см), все деления полностью прекращаются. Эти нетрансформированные клетки могут в течение некоторого времени полностью сохранять жизнеспособность в таком покоящемся состоянии. Конечная плотность клеток зависит от концентрации сыворотки в среде. Было показано, что добавление сыворотки к контактно-заторможенной культуре индуцирует цикл синтеза ДНК и клеточных делений. Из сыворотки было выделено несколько факторов, обладающих способностью снимать контактное торможение. Ослабленным контактным торможением характеризуются также клетки, трансформированные вирусами, так что такие клетки могут достигать более высокой конечной плотности. Считается, что эти клетки утрачивают зависящую от плотности регуляцию. Трансформированные клетки в отличие от нетрансформированных продолжают расти вплоть до истощения среды, и если после этого не сменить среды, то клетки быстро погибают. Создается впечатление, что рост трансформированных клеток менее зависим от таких макромолекулярных компонентов сыворотки, как гормоны и факторы роста, и ограничивается только при истощении в среде низкомолекулярных компонентов.

По мере роста клеточного монослоя происходят следующие изменения: 1) клетки становятся более скученными и менее распластанными, что приводит к уменьшению доли клеточной поверхности, обращенной к среде; 2) среда истощается по питательным и другим компонентам, особенно в зоне, непосредственно примыкающей к клеткам. Если из полного монослоя нетрансформированных клеток (например, мышинных эмбриональных клеток 3Т3) удалить часть пласта, то в клетках, примыкающих к краю такой «раны», происходит стимуляция синтеза ДНК и делений. В результате клетки быстро занимают поверхность «раны» в монослой. Это явление, известное под названием топоингибирования, объясняется в настоящее время увеличением обращенной к среде поверхности у клеток, находящихся на краю «раны», вызванном удалением соседних клеток.

Снижение распластывания клеток при достижении полного монослоя, а также ошаривание и прекращение роста клеток при их откреплении от подложки легли в основу представлений о тесной связи степени распластывания нетрансформированных клеток с их ростом. Остается неясным, контролируют ли клетки скорость захвата питательных веществ и собственный рост путем активного контроля своей формы.

Межклеточная адгезия происходит в три этапа.

1. Начальное соединение клеток, не требующее энергии.
2. Спустя 2 мин при 27 °С между клетками образуется связь, разрушающаяся 0,01%-ным трипсином. Эта связь образуется только между клетками, но не между клетками и субстратом.
3. Спустя 8 мин при 37 °С образуется более стабильная связь.

Однако, за исключением случаев щелевых контактов (gap junction), расстояние между клетками и между клетками и субстратом оказывается не меньше 45 нм.

Клеточная мембрана

Клеточная мембрана представляет собой жидкий, частично отрицательно заряженный двойной слой. Отрицательно заряженные гликопротеиды располагаются на наружной поверхности клеточной мембраны, но их полипептидные цепи проникают через клеточную мембрану и контактируют с внутриклеточными белками. Именно эти поверхностные гликопротеиды и играют ведущую роль в межклеточном узнавании и клеточной адгезии.

Показано, что существует тесная корреляция между гликопротеидами клеточной поверхности и феноменом клеточной трансформации. Было показано, что гликопротеиды клеточной поверхности могут маскировать участки агглютинации, узнаваемые на клеточной мембране растительными лектинами, такими, как фитогемагглютинин и конканавалин, и тем самым препятствовать агрегации нетрансформированных клеток этими лектинами. Эти участки агглютинации доступны для лектинов на поверхности опухолевых клеток и могут стать частично доступными на поверхности нетрансформированных клеток в результате обработки последних 0,005%-ной проназой или 0,007 %-ным трипсином. Такая обработка приводит к частичной потере контактного торможения и индуцирует цикл деления, как это было показано, в полном монослое клеток ЗТЗ.

Гликопротеиды клеточной поверхности могут также маскировать антигены гистосовместимости и влиять тем самым на способность асцитных клеток к трансплантации. Главным гликопротеидом клеточной поверхности является фибронектин. Этот белок известен также под названиями *cig* (от англ. Cold insoluble globulin—нерастворимый на холоду глобулин), CSP (от англ. Cell surface protein — клеточный поверхностный белок), α 2-SB (от англ.—surface binding glucoprotein - поверхностный связывающий гликопротеид) и белок LETS (от англ. large, external, transformation -sensitive — большой, внешний, чувствительный к трансформации белок). Фибронектин характеризуется молекулярной массой 220000, но может существовать также в форме связанных дисульфидными связями димеров и более высоких олигомеров; этот белок обнаруживается в сыворотке и на поверхности нормальных, но не трансформированных клеток. Он может быть удален с клеточной поверхности очень низкими концентрациями трипсина. Фибронектин отсутствует на поверхности митотических клеток, и его количество резко увеличивается при достижении нормальными клетками полного монослоя, или при остановке клеточной пролиферации при низкой концентрации сыворотки. Добавление фибронектина к трансформированным клеткам приводит к частичной нормализации клеточного фенотипа, что выражается в увеличении адгезии клеток друг к другу и к субстрату. По-видимому, фибронектин является одним из факторов сыворотки, облегчающих прикрепление и распластывание клеток на

поверхности культуральной посуды. Более того, антитела к фибронектину индуцируют появление у нормальных клеток некоторых свойств трансформированных клеток.

Фибронектин нельзя относить к интегральным мембранным белкам, поскольку он может быть удален с клеточной поверхности при обработке клеток 1 М мочевиной. Молекулы фибронектина весьма гибки и состоят из нескольких, лабильно связанных доменов. На клеточной поверхности фибронектин образует относительно неподвижную фибриллярную сеть, связанную через мембрану клетки с элементами цитоскелета.

Функции в культуре клеток, связанные с дифференцировкой

В большинстве случаев клетки, полученные из первичных культур, быстро возвращаются к недифференцированному фибробластоподобному или эпителиоподобному типу. Вместе с тем выделяется все большее количество клеточных линий, в которых клетки сохраняют некоторые функции исходных тканей. Одной из главных проблем в установлении линий дифференцированных клеток является присутствие в исходном эксплантате гораздо более быстро растущих недифференцированных фибробластов. В обычных условиях эти фибробласты быстро вытесняют дифференцированные эпителиальные клетки. В некоторых случаях, однако, быстрое прикрепление фибробластов к субстрату может быть использовано для их удаления из смешанной культуры.

Было показано (Turner, 1978), что в отсутствие сыворотки только фибробласты мышечной ткани куриных эмбрионов могут прикрепиться к субстрату, а миобласты остаются в суспензии и могут быть выделены путем пересева в следующий сосуд в присутствии сыворотки.

Потеря способности к дифференцировке часто связана с высокой скоростью роста клеток в культуре, так как при подавлении скорости роста или синтеза ДНК наблюдается восстановление дифференцировочных функций. Так, линия гипофизарных клеток крысы, обычно продуцирующая гормон роста (СТГ), после обработки бромдексиуридином в концентрации 3 мкг/мл приобретает способность синтезировать пролактин. Клетки эритролейкоза Френд в результате обработки масляной кислотой прекращают деления и начинают синтезировать гемоглобин.

ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Некоторые первичные клетки могут быть приобретены у фирм-поставщиков. Если фирма-поставщик расположена неподалеку и может поставлять клетки в день выделения, то такой источник клеток вполне приемлем. В других же случаях культуры первичных клеток следует получать самостоятельно. Во всех случаях самостоятельное получение первичных культур необходимо при использовании тканей экспериментальных животных.

АТСС поддерживает стоки (stocks — маточные культуры, концентраты, клеток в замороженной в жидком азоте форме и транспортирует их замороженными в твердой углекислоте. Поскольку клетки обладают низкой жизнеспособностью при температуре сухого льда, то сразу после получения их следует использовать или перезаморозить в жидком азоте.

Незамороженные клетки можно транспортировать в виде монослоя либо в сосуде, содержащем лишь следы культуральной среды, либо в сосуде, полностью наполненном средой. В обоих случаях сосуды должны быть проадо закупорены для избежания испарения среды, и внешняя температура при транспортировке не должна выходить из диапазона 10—37°C. Даже в этих случаях может происходить повреждение клеток, так что этот метод транспортировки пригоден только для небольших расстояний. Среды и сыворотки для клеточных культур проще всего получать от специализированных фирм, таких, как Flow

Lab. & Gibco Biocult. Можно покупать среды, которые требуют только лишь добавления сыворотки перед использованием, но предпочтительнее использовать концентрированные и сухие среды, особенно при необходимости больших количеств среды.

ТИПЫ КЛЕТОК

Список типов клеток, которые в настоящее время можно культивировать достаточно велик. Это элементы соединительной ткани (фибробласты), скелетные ткани (кость и хрящи), скелетные, сердечные и гладкие мышцы, эпителиальные ткани (печень, легкие, молочная железа, кожа, мочевого пузыря, почки), клетки нервной системы (глиальные клетки и нейроны, хотя последние лишены способности к пролиферации), эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз, клетки островков Лангерганса), меланоциты и много различных типов опухолевых клеток. Использование маркёров, специфических для данного типа клеток, позволяет определять предков, от которых получены такие культуры, но далеко не во всех случаях удастся установить положение клеток в их "родословной". Чтобы клетки пролиферировали, они должны происходить скорее от недифференцированных клеток-предшественников, чем от полностью дифференцированных клеток, у которых способность к пролиферации в норме утрачивается. Однако популяция не обязательно должна быть гомогенной и обладать фиксированным фенотипом. Некоторые культуры, например кератиноциты эпидермиса, содержат стволовые клетки, клетки-предшественники и кератинизированные чешуйчатые клетки. В такой культуре происходят постоянное обновление за счет стволовых клеток, пролиферация и созревание клеток-предшественников и терминальная необратимая дифференцировка, сопровождающаяся "слушиванием" чешуйчатых клеток в культуральную среду. Культуры других клеток, например фибробласты, представляют собой относительно однородную популяцию пролиферирующих клеток при низкой плотности монослоя (~104 клеток/см²) и столь же однородную популяцию более дифференцированных, непролиферирующих клеток при высокой плотности монослоя (105 клеток/см²). Эта популяция фиброцит-подобных клеток при высокой плотности монослоя способна к возвращению в клеточный цикл в результате трипсинизации, снижающей плотность клеток в монослое, или соскоба части клеток, приводящего к появлению свободного "края" монослоя.

Дифференцировка и пролиферация клеток регулируются не только плотностью монослоя, но и питательными факторами среды (сыворотка, ионы Ca²⁺), гормонами, взаимодействием с внеклеточным матриксом.

Дифференцировка

Ведение клеточных линий требует постоянного увеличения числа клеток. Поэтому неудивительно, что продолжавшийся много лет выбор условий культивирования был направлен на обеспечение максимальной скорости клеточной пролиферации. Эти условия, как правило, оказывались неблагоприятными для дифференцировки клеток, при которой их рост существенно ограничивается или полностью подавляется. К условиям, способствующим размножению, относятся низкая плотность клеток, низкая концентрация Ca²⁺ (100-600 мкМ) и присутствие ростовых факторов, таких как фактор роста эпидермиса (ФРЭ), фактор роста фибробластов (ФРФ) и фактор роста, синтезируемый тромбоцитами (ФРСТ). Высокая плотность клеток (выше 105 клеток/см²), высокие концентрации Ca²⁺ (300-1500 мкМ) и присутствие индукторов дифференцировки (гормоны, например гидрокортизон, фактор созревания глии, фактор роста нервов, ретиноиды и полярные растворители, такие как диметилсульфоксид, способствуют прекращению клеточного деления и индуцируют дифференцировку клеток.

ЧТО ВЫБРАТЬ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТА?

Органная культура и культура клеток

Исходно тканевыми культурами называли эксплантаты целых фрагментов тканей, полагая, что в этих фрагментах, по крайней мере частично, поддерживается гистологическая целостность. Теперь "культура ткани" превратилась в общее понятие, включающее в себя как органную культуру, в которой небольшие фрагменты ткани или целые эмбриональные органы эксплантируются с сохранением тканевой архитектуры, так и культуру клеток, когда ткани диспергируются механически, ферментативно или путем спонтанной миграции клеток из эксплантата, и клетки размножаются в виде суспензии или монослоя, прикрепившихся к субстрату клеток.

При выборе того или иного типа культуры следует принимать во внимание – следующие соображения. Органная культура сохраняет межклеточные взаимодействия, в течение долгого периода поддерживает гистологическую и биохимическую дифференцировку и после начальной травмы эксплантации и ряда центральных некрозов остается, как правило, в нерастущем равновесном состоянии в течение нескольких дней и даже недель. Эти культуры не способны к размножению, наблюдаются разбросы в параллелях. Количественные исследования органных культур осложняются из-за небольших различий в геометрии и составе эксплантатов. КК, напротив, лишены, как правило, структурной организации, теряют характерную гисто-типическую архитектуру и связанные с ней биохимические признаки и обычно не достигают равновесного состояния при отсутствии специальных условий. Клетки в культурах размножаются, что обеспечивает получение большой массы клеток и их разделение на идентичные параллели. Культивируемые клетки могут быть охарактеризованы, и определенная клеточная популяция может быть сохранена путем замораживания. Клетки идентифицируют по фенотипическим признакам, путем выращивания в селективной среде, физическим отбором, клонированием или генотипически для получения относительно однородной линии клеток. Свойства органных и клеточных культур представлены ниже.

Преимущества клеточной и органных культур

Органная культура

Гистология

Дифференцировка

Гетеро и гомотипические клеточные взаимодействия

Взаимодействие с матриксом

Культура клеток

Размножение и получение биомассы.

Клонирование, селекция и очистка.

Выяснение свойств клеток и их сохранение

Получение параллелей и количественные оценки.

Ткань эмбриона и взрослого животного

Как правило, культуры, полученные из эмбриональных тканей, характеризуются лучшей выживаемостью и более активным ростом по сравнению с культурами из соответствующих взрослых тканей. Это отражает, по-видимому, более низкий уровень специализации и наличие реплицирующихся клеток-предшественников или стволовых клеток в эмбрионах. Взрослые ткани обладают, как правило, пониженным пролиферативным пулом и более высоким содержанием неделящихся специализированных клеток, ассоциированных зачастую с более структурированным и слабо дезагрегирующим внеклеточным матриксом.

Получение первичных культур клеток взрослых тканей и их размножение являются более сложной задачей, и продолжительность жизни таких культур, как правило, невелика. Эмбриональные ткани обладают многими практическими преимуществами, но мы всегда должны помнить, что в ряде случаев эти клетки отличаются от взрослых клеток, и мы не можем быть уверены, что они созреют до соответствующего взрослого типа, если это не будет подтверждено результатами анализа соответствующих свойств.

Нормальная ткань и опухолевая ткань

Нормальные ткани, как правило, дают начало культурам с ограниченным временем жизни, тогда как культуры клеток, полученных из опухолей, способны пролиферировать неограниченно долгое время. Известно, однако, несколько линий неограниченно пролиферирующих клеток (клетки почки собаки MDCK, фибробласты 3T3), которые не прививаются при введении животным, то есть не являются опухолеродными.

Нормальные клетки растут обычно как недифференцированные стволовые клетки или клетки-предшественники, и наступление дифференцировки в такой культуре сопровождается часто полным прекращением пролиферации клеток. Некоторые нормальные клетки, например фиброциты и клетки эндотелия, способны дифференцироваться, затем дедифференцироваться, возобновлять пролиферацию и вновь дифференцироваться. Другие - например ороговевающий эпителий и многие кроветворные клетки - после инициации дифференцировки неспособны к возобновлению пролиферации.

В культурах клеток, полученных из опухолей, возможна, по крайней мере частичная, дифференцировка при сохранении способности к пролиферации. Во многих исследованиях используется такая способность опухолевых клеток. Для изучения дифференцировки вполне пригодны клетки мышины меланомы B16, крысиные гепатомы с минимальными отклонениями, клетки нейробластом человека и грызунов. При этом всегда остаются сомнения, можно ли применять полученные результаты к процессам нормальной дифференцировки.

Ограниченные и постоянные клеточные линии

После нескольких пересевов линия клеток либо гибнет (ограниченная линия клеток), либо "трансформируется" и становится постоянной клеточной линией. Не всегда ясно, возникают стволовые клетки постоянной культуры в ходе пассирования, или они предсуществуют в замаскированной форме в популяции клеток ограниченной линии. Различия в свойствах этих клеток и большой период времени, предшествующий их появлению (иногда несколько месяцев), позволяют предположить мутационную природу их появления (хромосомные перестройки, транслокации, частичное или полное неспаривание или точечные мутации). Нельзя исключить и возможность предсуществования "бессмертных" клеток, особенно в культурах, полученных из опухолей.

Признаки появления постоянной клеточной линии:

Появление постоянной линии клеток констатируется по морфологическим изменениям (уменьшение размера клеток, снижение их адгезивности, округление и увеличение ядерно/цитоплазматического отношения), по увеличению скорости роста (время удвоения клеток в культуре снижается с 36-48 до 12-36 ч), по снижению зависимости от сыворотки, по увеличению эффективности клонирования, по снижению зависимости от субстрата (способность пролиферировать в суспензии вырастает так же, как и формирование клонов в агаре), по увеличению гетероплоидности (хромосомные различия между клетками) и анеуплоидности (отличие от донорского эуплоидного кариотипа) и по увеличению опухолеродности. Черты сходства между спонтанной трансформацией *in vitro* и злокачественной трансформацией очевидны, но тем не менее нельзя считать эти два

процесса идентичными. Нормальные клетки могут трансформироваться в постоянную линию, не становясь при этом злокачественными; из злокачественных опухолей можно получить культуры, которые трансформируются и приобретают указанные выше признаки и при этом становятся более, а иногда менее опухолеродными.

К преимуществам постоянных линий клеток относятся их более высокая скорость роста, возможность достижения более высокой плотности, а следовательно, и большего выхода биомассы, их меньшая зависимость от сыворотки и возможность поддержания в более простых средах, а также их способность к росту в суспензии. К недостаткам этих линий относятся повышенная хромосомная нестабильность, отклонение от фенотипа донора и утрата специфических тканевых маркеров.

Газовая фаза

Состав газовой фазы определяется тремя факторами: а) типом среды, б) использованием открытых (чашки Петри, многолуночные чашки) или закупоренных (флаконы, бутылки) культуральных сосудов и в) требуемой буферной емкостью. Некоторые параметры культивирования могут варьировать, но должны соблюдаться одно главное правило. Правило заключается в том, что концентрация бикарбоната и парциальное давление CO_2 должны находиться в равновесии.

Следует помнить, что отношение CO_2/HCO_3 существенно для большинства клеток, так что ни флаконы, ни чашки не могут быть использованы без наличия CO_2 в атмосфере.

Субстрат

Природа субстрата определяется главным образом типом используемых клеток и характером проводимых исследований. Почти повсеместное распространение получил в настоящее время полистирол, обработанный таким образом, чтобы увеличить смачиваемость и придать поверхности отрицательный заряд. В особых случаях (культуры нейронов, мышечных клеток и некоторые культуры эпителиальных клеток) пластиковая поверхность покрывается желатином, коллагеном или полилизинном для придания ей положительного заряда. Может быть использована и стеклянная посуда, но она должна быть тщательно вымыта с применением нетоксичных детергентов (7X).

Культуральные сосуды варьируют по размеру от многолуночных пластинок Тераски (площадь поверхности $\sim 1 \text{ мм}^2$, объем среды 5-10 мкл) и микротитровальных пластинок ($\sim 30 \text{ мм}^2/100-200 \text{ мкл}$) до набора чашек и флаконов с площадью поверхности до 180 см^2 . Определяющими факторами при выборе культуральной посуды являются: требуемое количество клеток (максимальная плотность большинства трансформированных культур 5×10^5 клеток/ см^2), требуемое количество параллелей (96 для микротитровальной пластинки) и порядок отбора образцов. 24-луночные чашки достаточно хороши для большого количества параллелей при одновременном отборе образцов, но когда отбор образцов производится в разное время, предпочтительнее использовать индивидуальные флаконы или бутылки. Чашки Петри дешевле флаконов и достаточно удобны для последующих обработок клеток, например при окрашивании или экстракции. Флаконы могут быть герметично закрыты; при этом не требуется инкубатора с продувкой CO_2 ; кроме того, при использовании флаконов снижается опасность заражения культур. В случае суспензионных культур главным определяющим фактором является объем сосуда. При увеличении объема могут создаваться проблемы в перемешивании и аэрации культур

ПЕРВИЧНАЯ КУЛЬТУРА

На первом этапе получения первичной культуры происходит стерильное удаление фрагмента ткани животного и его механическая или ферментативная дезагрегация. Ткань

может быть просто измельчена до кусочков объемом около 1 мм³, которые прикрепляются к поверхности чашки благодаря собственной адгезивности, или наличию насечек на чашке или с помощью сгустка плазмы. В этих случаях будет происходить рост клеток из фрагментов и клетки, мигрирующие из эксплантатов, могут использоваться для пассирования. Фрагменты ткани (эксплантаты) могут переноситься на новые чашки; мигрирующие клетки могут удаляться трипсинизацией, а остающийся эксплантат будет образовывать новые выросты. Трипсинизированные I клетки пересеваются в новые сосуды и становятся вторичной культурой. По формальным признакам такая культура носит название линии клеток. Первичные культуры могут быть также получены путем (деагрегации тканей ферментами, например трипсином (0,25% -ный неочищенный или 0,01-0,05%-ный очищенный) или коллагеназой (200-2000 ед./кл, неочищенная). Клетки образующейся при этом суспензии оседают, прикрепляются и распластываются на поверхности стекла или пластика. Такой способ получения культуры обеспечивает более высокий выход клеток, хотя он кажется более селективным, поскольку только определенные клотки переживают диссоциацию. На практике успешное получение первичных культур из многих тканей, особенно из эпителия, связано с использованием коллагелазы; при этом размер эксплантата снижается до небольшого кластера клеток, который затем прикрепляется к субстрату и разрастается.

Субкультивирование

Монослойная культура может быть перенесена во второй культуральный сосуд после диссоциации клеток монослоя трипсином и разведения. В случае субкультивирования суспензионных культур достаточно только разведения. Диссоциация клеток монослойной культуры достигается лучше всего промыванием монослоя фосфатным солевым буфером (ФСБ) или ФСБ с 1мМ этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) и последующей инкубацией с холодным раствором трипсина (0,25%-ный неочищенный или 0,01-0,05%-ный очищенный) в течение 30 с. После этого трипсин удаляется, клетки инкубируют дополнительно в течение 15 мин. Затем клетки суспендируют в среде, определяют их количество и засевают на новые флаконы.

Кривая роста

После посева клеток во флакон они входят в лаг-период продолжительностью 2-24 ч., сменяющийся периодом экспоненциального роста (логарифмическая фаза). В конце этого периода клетки достигают плотного монослоя и входят в период медленного роста или покоя (фаза плато). Эти фазы характерны для всех клеточных линий и позволяют получить воспроизводимые характеристики клеточных линий: продолжительность лаг-периода, время удвоения популяции в середине логарифмической фазы и насыщающую плотность клеток в монослое на фазе плато. Воспроизводимость этих характеристик возможна только при постоянстве условий культивирования.

Определение параметров ростового цикла весьма существенно для пассирования культуры и для проведения экспериментов на культурах. Поведение клеток и их биохимические свойства заметно различаются на разных фазах роста культуры, так что важно контролировать стадию ростового цикла, на которой в культуру добавляются различные препараты или реагенты или производится сбор клеток для пересева. Форма кривой роста позволяет также получить информацию о репродуктивном потенциале культуры.

Заражение культуры клеток

Опасность микробного заражения культур в значительной мере снижена благодаря использованию антибиотиков и ламинарных боксов. Однако следует по мере возможности

избегать культивирования клеток с антибиотиками, поскольку проблема хронического латентного заражения все еще остается острой.

Следует как можно чаще производить визуальную оценку микробного заражения культуры по быстрому изменению pH. Как правило, заражение сопровождается снижением pH, хотя некоторые грибы могут индуцировать увеличение pH. Заражение может также приводить к помутнению среды, появлению межклеточного гранулярного материала при микроскопическом обследовании и к появлению взвешенного в среде неидентифицированного материала. Во всех этих случаях культуральные сосуды изолируются без открывания пробок и автоклавируются. В сомнительных случаях образцы культуры следует исследовать в фазово-контрастном микроскопе, путем окраски по Граму и с помощью стандартных микробиологических методов.

Микоплазма

Источником заражения микоплазмой при культивировании клеток могут быть: культуральная среда, сыворотка, трипсин или сам исследователь. Заражение не выявляется невооруженным глазом, и, поскольку оно не приводит к изменению роста культуры, заражение микоплазмой часто остается незамеченным. Следует регулярно (один раз каждые 1-3 мес.) проверять культуры на наличие в них микоплазмы, поскольку такое заражение существенно изменяет биохимию клеток, их антигенные свойства и параметры роста культуры. Предложено несколько методов выявления микоплазмы, но наибольшее распространение получил метод флуоресцентного окрашивания ДНК.

Заражение культуры другими клетками

Важность проблемы недооценивается, однако последствия ее проявляются очень часто. Чтобы избежать перекрестного загрязнения культур, не следует использовать одни и те же бутылки со средой и реагентами при работе с различными линиями клеток. Кроме того, пипетки, имевшие контакт с флаконами и бутылками с клетками, не следует повторно использовать для отбора среды из соответствующих емкостей.