

Лекція 4
Тема: Клітинні культури

План:

1. Використання ізольованих клітин
2. Поняття про біомолекули, клітини та організм
3. Виділення та культивування клітин
4. Проблеми культивування та відтворюваності в експериментах з живими клітинами
5. Різновиди клітинних культур
6. Використання клітин у наукових дослідженнях

Словник:

Адгезивна клітинна культура – клітинам якої для зростання необхідно прикріпитись до поверхні лабораторного посуду (пластику) або один до одного.

Позаклітинний матрикс – позаклітинна речовина, що складається з жорстких білкових фібрил та полісахаридного гідрогелю.

Гібридоми – гібриди, отримані в результаті злиття В-клітин та ракових клітин мієломи.

Диференціювання (клітинна) – процес дозрівання клітин із придбанням ними вузькоспеціалізованих функцій.

Іморталізована культура – клітки якої здатні ділитися без обмеження.

Індуковані плюрипотентні ствовові клітини (ІПСК) – плюрипотентні клітини, отримані із клітин зрілого організму. Це можуть бути клітини різного ступеня диференціювання, включаючи термінальну. Для індукції плюрипотентності ці клітини вводять особливі гени, впливають хімічними і механічними стимулами чи комбінують ці чинники.

Клітинна культура – клітини за умов *in vitro*.

Клітинний клон – культура однорідних клітин із єдиним предком.

Клітинна лінія – Клітинна культура, що складається з однорідних клітин.

Ліміт хейфліка – ліміт, що обмежує кількість поділів клітин, що становить 50-70 поділів для клітин людини. Обумовлений укороченням теломір.

Мезенхімальні клітини – клітини сполучної тканини (строми), здатні диференціюватися в клітини кісток, хрящів, м'язів та жирові клітини.

Орґаноїд – тривимірне утворення з різнорідних клітин, схоже будовою на мініатюрний орган (або його частина) і утворене *in vitro* зі стовбурових клітин шляхом самоорґанізації.

Пасірування – розведення клітинної культури, яке для адгезивних клітин супроводжується розривом міжклітинних зв'язків та зв'язків клітин з поверхнею.

Первинна культура – культура, виділена з організму та не пасована *in vitro*.

Плюрипотентні клітини – клітини, здатні диференціюватися в клітини всіх трьох зародкових листків (ендодерми – майбутні внутрішні органи, мезодерми – майбутні м'язи, кістки, кров та сечостатеві органи та ектодерми – майбутні нервова система та епітеліальні тканини), але не в клітини позазародкових органів (плацента та жовтковий).

Прогеніторні клітини – стовбурові клітини, детерміновані на диференціювання в певний тип клітин. Ці клітини, які на відміну від плюрипотентних стовбурових клітин, вже мають стійкі біомаркери, які можуть відрізнити їх і їх потомство від клітин інших типів.

Проліферація – розподіл клітин без зміни їх властивостей.

Ракові клітини – клітини, отримані з пухлин і, як правило, здатні до необмеженої кількості поділів *in vitro*.

Рекомбінантні білки – білки, отримані з допомогою живих клітин у результаті застосування у яких генів цих білків.

Стовбурові клітини – клітини-попередники, здатні диференціюватися у клітини різної спеціалізації.

Суспензійна культура – клітини якої можуть зростати в суспензії без прикріплення до поверхонь або одна до одної.

Теломіри – кінцеві фрагменти хромосом, які складаються з повторюваних послідовностей нуклеотидів (TTAGGG) і коротшають при кожному розподілі клітини.

Тіломераза – фермент, який збільшує теломери.

Трансдукція – Використання генів у клітини за допомогою вірусів.

Трансдиференційка – зміна спеціалізації зрілих клітин.

Трансфекція – використання генів у клітини без використання вірусів.

Експлант тканини – Шматок тканини з живими клітинами, поміщений у живильне середовище *in vitro*.

Ембріонні тельця – тривимірні утворення з недиференційованих ембріональних або індукованих плюрипотентних стовбурових клітин

Ембріональні стовлові клітини (ЕСК) – плюрипотентні клітини, отримані з ембріона.

1. Використання ізолюваних клітин

Більшість медико-біологічних досліджень проводиться на клітинах *in vitro*. Клітини використовують як модельний біологічний об'єкт у наукових дослідженнях, при тестуванні та виробництві ліків. Крім цього, вчені навчилися виправляти генетичні помилки в клітинах та наділяти їх здатністю протистояти деяким захворюванням, що є основою для медичних технологій майбутнього – генної та клітинної терапії.

Об'єктом біологічних та молекулярно-біологічних досліджень є живі організми. Складовими частинами організму є органи, які у свою чергу складаються з тканин, а ті з клітин.

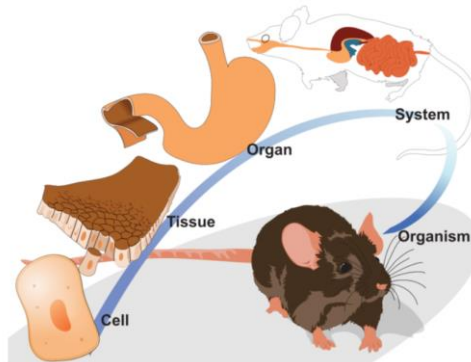


Рис. 1 – Організація живих організмів

Найбільш поширеним модельним об'єктом молекулярно-біологічних досліджень є клітинна культура. Клітинна культура - це клітини, що вирощуються зазвичай у пластикових флаконах, планшетах або чашках Петрі в спеціальному живильному середовищі при контрольованих температурі, вологості та рівні вуглекислого газу (рис).

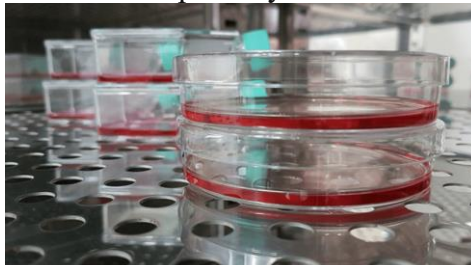


Рис. 2 – Чашки Петрі з клітинними культурами у спеціальному інкубаторі

Крім цього, культури клітин знайшли широке застосування у біотехнологіях, виробництві ліків та вакцин. За останні 10 років запущено близько тисячі клінічних випробувань протоколів клітинної терапії (тобто пересадки клітин на лікування захворювання).

2. Поняття про біомолекули, клітини та організм

Живий об'єкт складається з дрібніших складових частин: органів, тканин, клітин, органел, біомолекул і водночас є частиною масштабніших систем – таких як харчові ланцюжки, екосистеми, спільноти.

Наочною ілюстрацією служать слизовики. Ці одноклітинні мають здатність об'єднуватися з десятків тисяч клітин у плазмодій, який у пошуках їжі може швидко пересуватися і викидати спори на велику відстань, а потім знову розпадатися на окремі клітини (відео 1). Багато бактерій теж мають здатність формувати щільні конгломерати – біоплівки, в яких внутрішні клітини захищені зовнішніми від навколишнього середовища. Тобто об'єднання багатоклітинної структури призводить до виникнення нових функцій, відсутніх в окремих клітин. Конкурентні переваги за рахунок придбання нових здібностей спричинили об'єднання одноклітинних організмів у багатоклітинні близько 1 млрд років тому.



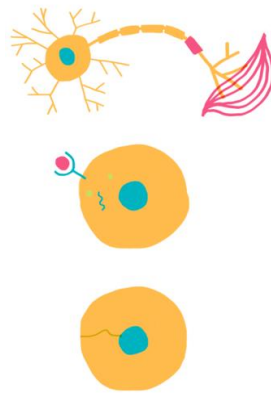
Відео 1. *Dictyostelium discoideum* — одноклеточный слизевик.

📖 Цікаві факти 😊

Dictyostelium discoideum (диктіостеліум) - клітинний слизевик. У природі *D. discoideum* мешкає у ґрунті та підстилці (вологому листовому опаді). Поодинокі амеби *D. discoideum* харчуються переважно бактеріями. Поширений *D. discoideum* у змішаних та широколистяних лісах помірного поясу.

Якщо їжі не вистачає, амеби злипаються разом і мігрують туди, де середовище сприятливіше. Там вони розпадаються на окремі клітини. Перед міграцією амеби не з'їдають усі доступні бактерії, а беруть із собою їх запаси. На новому місці вони розсіюють їх, утворюючи запаси їжі. Рухомі агрегати, що утворюються з амеб, а потім багатоклітинні плоді тіла складної будови цікаві процесами міжклітинної сигналізації, клітинного диференціювання, морфогенезу та ін., що дозволяють використовувати слизевика як модельний об'єкт.

У багатоклітинних організмах клітини існують у нерозривному зв'язку одна з одною протягом сотень мільйонів років еволюції і за цей час повністю перебудувалися на виконання конкретних функцій. Спектр експресованих клітиною генів, її функції та активність, форма та розмір, швидкість поділу та загибель регулюються зв'язками з іншими клітинами організму. У ссавців цей зв'язок заснований на всіляких сигналах: хімічних (гормони, цитокіни, ростові фактори, поживні речовини, похідні кисню, іони металів та ін), механічних та електричних (переданих нейронами) (рис. 3).



Синаптична взаємодія

Хімічна (ендокринна та паракринна)

Механічна

Рис. 3 – Взаємодії між клітинами

Якщо у клітини в організмі порушуються нормальні зв'язки з оточенням, вона або вмирає (апоптоз), або стає раковою. При виділенні з організму та переносі в чашку Петрі клітини теж втрачають майже всі зовнішні зв'язки, але в сприятливих умовах деякий час живуть і діляться (проте можуть стати раковими).

У нових, штучних умовах клітини зберігають лише геном, проте інші властивості змінюються — розмір, швидкість зростання, експресія генів, функціональна активність, чутливість до ліків, метаболізм, склад мембран та інші. У зв'язку з цим ведеться активний пошук умов *in vitro*, які максимально відтворюють умови *in vivo*.

Більшість тканин організму містять кілька типів клітин, мають складну структуру позаклітинного матриксу та пронизані мережею судин та нервів (рис. 4).

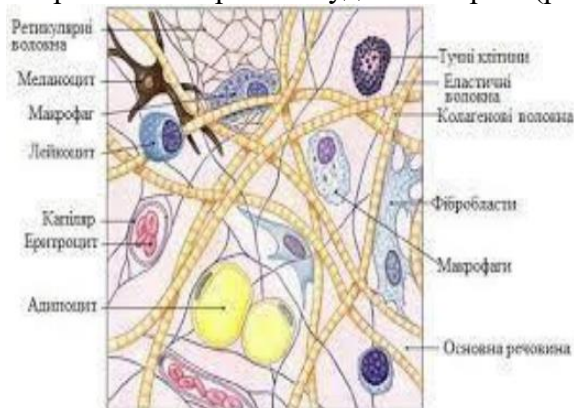


Рисунок 4. Складна організація сполучної тканини *in vivo*, що складається з: декількох типів клітин (фібробласти, жирові клітини, макрофаги та інші лейкоцити), декількох типів волокон (1 - еластичні, 2 - ретикулярні і 3 - колагенові), нервів і судин, укладених у гідрогель з полісахаридів.

Повністю відтворити таку архітектуру *in vitro* поки що неможливо, а отже, і клітини в культурі поки що залишаються лише наближенням до клітин у складі організму.

Джерелом клітин може бути будь-яка тканина організму. У більшості тканин клітини знаходяться всередині так званого позаклітинного матриксу, який поділяє тканину на ділянки та формує її архітектуру. Позаклітинний матрикс складається з білків, що утворюють фібрили: колагену, фібронектину, еластину та протеогліканів з довгими полісахаридними гілками (глікозаміногліканами).

3. Виділення та культивування клітин

Для виділення клітин необхідно зруйнувати позаклітинний матрикс і розірвати зв'язки між клітинами, після чого клітини розсипаються (рис. 5).

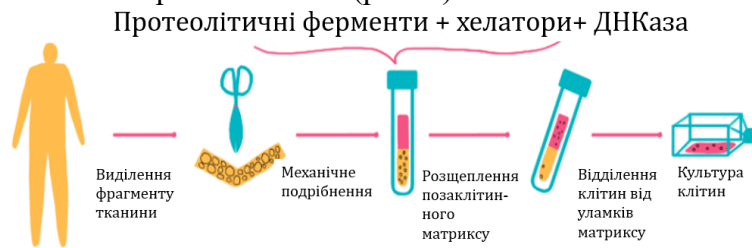


Рисунок 5. Схема виділення клітин із тканини.

Фрагмент тканини, отриманий прижиттєво (біопсією) або після смерті, подрібнюють механічно та обробляють протеолітичними ферментами, що розщеплюють позаклітинний матрикс (трипсином, колагеназою, гіалуронідазою, папаїном або їх комбінаціями). На додаток до ферментів використовують кальцій-зв'язуючі сполуки (хелатори), які забирають кальцій у молекул клітинної адгезії та послаблюють їх зв'язок між собою та з позаклітинним матриксом. Додавання ДНКази дозволяє запобігти склеюванню клітин у тягучі згустки за рахунок електростатичних взаємодій з ДНК, що вивільнилася з пошкоджених клітин. Після цього клітини відокремлюють від уламків матриксу (дебрису) центрифугуванням та/або фільтрацією та висаджують у культуральні флакони або чашки Петрі.

Клітинну культуру можна отримати й іншим способом: помістивши в культуральне середовище шматок тканини цілком, і тоді частина клітин поступово виповзе і засіє навколишній простір. Такий тип культури називається **експлантом**. Виділення та маніпуляції з клітинами зазвичай проводять у спеціальному стерильному боксі – ламінарній шафі (рис. 6).



Рисунок 6. Ламінарна шафа (забезпечує рівномірний вертикальний потік стерильного повітря, захищаючи культуру клітин від мікробного зараження).

У деяких тканин (кров, кістковий мозок) немає позаклітинного матриксу або клітини не пов'язані з ним, що суттєво спрощує процедуру виділення. Завдяки легкості виділення та збереження поверхневих молекул для цих клітин найбільш добре вивчено різноманітність типів та шляхи їх формування зі стовбурової клітини крові (гемопоетичної СК).

Після виділення клітини поміщають у живильне середовище і вирощують у чашках Петрі або флаконах в атмосфері вуглекислого газу (5% CO₂) та близької до 100% вологості у CO₂-інкубаторах (рис. 7). Поживне середовище складається з фізіологічних солей, буферу рН, амінокислот, вітамінів і глюкози, а також білкових ростових та поживних факторів. Індикатор феноловий червоний, що додається до середовища, дозволяє візуально контролювати рН і надає середовищу червоного кольору.



Рисунок 7. CO₂-інкубатор.

4. Проблеми культивування та відтворюваності в експериментах з живими клітинами

1) Деякі культури дуже чутливі до зовнішніх впливів чи коливань хімічного складу середовища.

2) Деякі процеси, що відбуваються в живих організмах, вимагають створення спеціальних умов (мікрооточення) для клітин.

3) Виникає проблема гомеостазу навколишнього середовища: клітини постійно споживають поживні речовини та виділяють метаболіти. Якщо вирішувати питання простою зміною культурального середовища, то концентрація речовин у середовищі між замінами буде постійною. Крім того, культуру клітин доведеться регулярно виймати з інкубатора, щоб змінити середовище або провести спостереження під мікроскопом.

4) Як забезпечити захист культури клітин від контамінації бактеріями, мікоплазмами та грибами?

5) Як домогтися відтворюваності експерименту? Клітини - живі об'єкти, на поведінку яких можуть вплинути навіть незначні фактори: часте відкриття дверцят інкубатора, різний час перебування культури поза інкубатором, освітлення при спостереженні культур під мікроскопом - все це може істотно вплинути на появу артефактів в експерименті.

Після виділення клітини протягом кількох годин (до доби) відновлюються від стресу («ремонтують» мембрану, відновлюють відрізані ферментами рецептори) і потім починають пристосовуватися до нових умов (прикріплюються до доступних поверхонь, переходять на новий режим метаболізму, змінюють форму та експресію генів та і т.д.). Винятком є клітини крові та кровотворні клітини з кісткового мозку, які виділені без використання ферментів та можуть бути проаналізовані відразу після виділення. У культурі деякі клітини крові також можуть прикріплюватися до поверхонь, активуватися та активувати інші клітини.

При необхідності відобразити клітини в їхньому нативному стані, дослідження бажано проводити в першу добу після виділення: за цей час клітини ще не встигнуть сильно змінити свій первісний вигляд.

5. Різновиди клітинних культур

Клітинні культури розрізняють за їхнім джерелом, наявності загального предка, здатності клітин розмножуватися, прикріплюватися до поверхні, утворювати багатоклітинні конгломерати тощо.

У лабораторній практиці найпоширенішими є *ракові клітини*. Вони не мають межі числа поділів, будучи практично безсмертними, що дозволяє збільшувати їх у необмеженій кількості. Оскільки при постійному зростанні клітин місце в чашці Петрі (або в обсязі культури) періодично закінчується, час від часу їх потрібно пересівати: відкріплювати від поверхні, розбивати клітинні скупчення за допомогою ферментів та ЕДТА (хелатор кальцію),

а потім заново сіяти у меншій щільності, що дозволяє їм розмножуватись далі. Ця процедура називається **пасеруванням**, а вік культури часто вважають за кількістю таких пасажів.

Саме виробництво вакцин стало основним мотивом отримання культури «**нормальних**» клітин. З цією метою Леонард Хейфлік (фото 1) виділяв клітини з абортного матеріалу і виявив наявність межі числа поділів клітин у культурі, що отримала назву межі Хейфліка. Для людських клітин ця межа становить 50-70 поділів і обумовлена укороченням теломер - фундаментальним механізмом старіння клітин.

В 1965 Хейфлік отримав лінію фібробластів легенеї WI-38, яка смертна, але була напрацьована і заморожена в достатній кількості, щоб забезпечити дослідження по всьому світу і по сьогодні. Ця лінія знайшла широке застосування у виробництві вакцин та нині широко використовується для вивчення молекулярних механізмів старіння.



Фото 1 – Леонард Хейфлік

Іморталізовані клітини: отримані з нормальної тканини, які набули здатності до необмеженої кількості поділів. Найбільш делікатний і більш поширений спосіб іморталізації - це введення в клітину гена теломеразної зворотної транскриптази (TERT), яка добудовує теломери і запобігає їх укорочування при розподілі.

Диференційовані клітини (які придбали свою кінцеву спеціалізацію) становлять більшу частину клітин організму та практично не діляться. Будучи основними складовими у всіх органах і тканинах, вони є мішенню дії більшості ліків, що робить їх дуже затребуваними для досліджень. У культурі їх можна отримати шляхом спрямованої диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин у потрібний тип клітин.

Найбільш поширеними культурами диференційованих клітин є первинні клітинні культури - клітини, виділені із зрілої тканини та не пасеровані *in vitro* (рис. 8). Число поділів таких клітин критично залежить від умов культивування, але рідко становить понад 5-10 разів. Винятком є стовбурові, прогеніторні та деякі спеціалізовані клітини, наприклад, активовані Т-і В-лімфоцити. Крім того, при тривалому культивуванні первинна культура схильна до заміщення фібробластами.

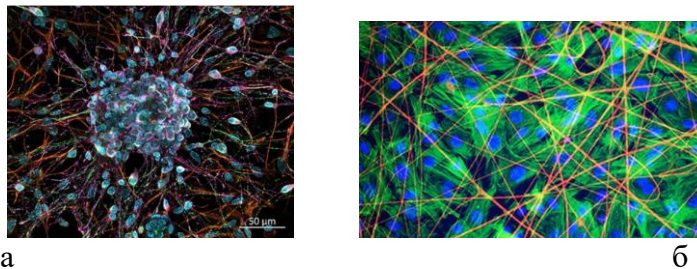


Рисунок 8. Приклади первинних клітинних культур: нейрони (а) та кардіоміоцити (б).
сайт www.flickr.com

Багато досліджень виконуються саме на первинних клітинних культурах, що мають ряд переваг у порівнянні з раковими та іморталізованими клітинами:

- Вони краще відповідають клітинам *in vivo*: нейрони проводять електричні імпульси, гепатоцити секретують альбумін, макрофаги фагоцитують бактерії і т.д.
- Якщо говорити про клітини тварин, вони легко доступні за наявності віварію – залишається лише отримати їх (що, втім, досить трудомістко).

- Доступність людських клітин визначається типом тканини: поширені культури ендотеліальних клітин із пуповинної вени та мезенхімальних стромальних клітин із жирової тканини, джерелами яких є побічні продукти акушерства та хірургії відповідно.
- Вони несуть генотип донора, тому можуть використовуватися для вивчення причин патологій конкретного пацієнта на молекулярному рівні.
- Культури клітин людини, миші, щура, кролика та інших тварин зібрані в колекціях, що зберігаються в рідкому азоті за температури $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (9). Найбільш повна колекція у США – налічує понад 4600 клітинних культур еукаріотів. Вони існують майже для кожного типу пухлини та здорової тканини та детально охарактеризовані. Це дозволяє підібрати найбільш підходящі для конкретного дослідження лінії та порівнювати результати з отриманими раніше у своїй або інших лабораторіях.



Рисунок 9 – «Біобанки». Клітинне сховище АТСС (США). Сайт www.the-scientist.com

6. Використання клітин у наукових дослідженнях

Чим сильніші клітини в культурі відрізняються від клітин в організмі, тим більша ймовірність, що механізми цих процесів теж відрізнятимуться. У клітині знаходиться дуже щільне та насичене мікрооточення (рис. 10, відео 2).

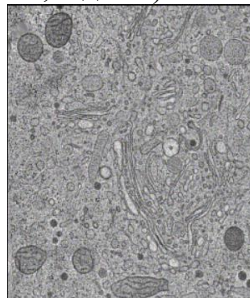
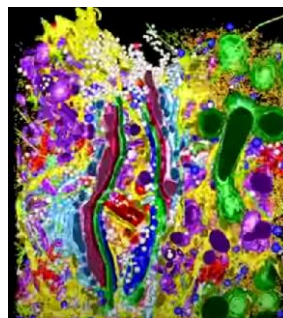


Рисунок 10. Кріоелектронна томографія тонкого (400 нм) зрізу клітин лінії НІТ-Т15. Сайт www.sciencedirect.com



Відео 2. Тривимірна реконструкція різних внутрішньоклітинних структур у зрізі з рисунка 10.

Жовтий - ендоплазматичний ретикулум, синій - мембранно-пов'язані рибосоми, помаранчевий - вільні рибосоми, світло-зелені нитки - мікротрубочки, блакитний - щільні кóрові везикули,

білий - клатрин-негативні везикули, світло-червоний – клатрін- негативні компартменти, порожнини зі світло- та темно-зеленими внутрішніми та зовнішніми поверхнями – мітохондрії. Окремі молекули та комплекси малого розміру не відображені.