

Лекція 5  
Тема: Клітинні технології

План:

1. Доставка гену в клітину
2. Можливості клітинних технологій
3. Ембріональні стовбурові клітини та індуковані плюрипотентні стовбурові клітини
4. 3D-культури
5. Застосування клітинних технологій у медицині

**1. Доставка гену в клітину.**

Якщо молекула, що цікавить, – білок, то найпростіший спосіб помістити його в клітину і вивчити – це змусити його синтезуватися прямо «на місці», ввівши всередину клітини ген цього білка.

Методи доставки генів у клітини на основі суто фізико-хімічних принципів (трансфекція) та з використанням вірусів як носія (трансдукція) (рис. 1.):

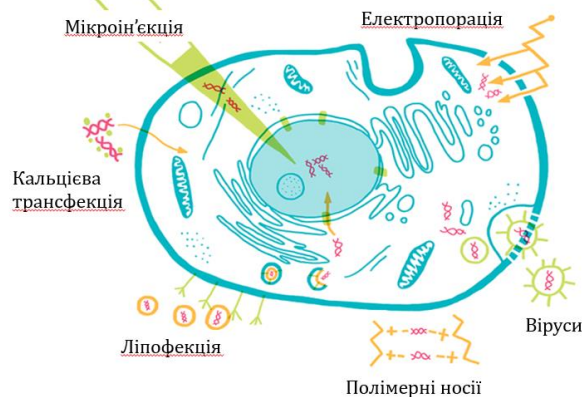


Рисунок 1 - Методи трансфекції та трансдукції. Для застосування гена в клітину необхідно подолати зовнішню мембрану. Найчастіше для цього використовують нанорозмірні комплекси ДНК із ліпідними везикулами (**ліпофекція**), полімерними носіями або кристалами кальцію, які самі поглинаються клітиною. Також можна тимчасово продірявити мембрану за допомогою електричного розряду - **електропорації**. Для випадків, коли ген потрібно ввести лише у кілька клітин (наприклад, щодо єдиних нейронів), використовують метод **мікроін'єкції**. У разі **трансдукції** використовують вірусні частинки, в які замість частини їх власного геному поміщений необхідний ген. У цьому віруси зберігають здатність проникати у клітини, ефективно доставляти ген до ядра і, у разі деяких вірусів, вбудовувати їх у ДНК клітини.

Відбір ведеться шляхом селекції таких клітин за стійкістю до антибіотика (разом з досліджуванім геном зазвичай вставляють і ген, що забезпечує таку стійкість) або за допомогою кількох циклів сортування клітин.

**2. Можливості клітинних технологій**

1. Редагування геному – вибіркове видалення певних генів із клітин (генетичний нокаут). Можна не тільки видаляти та вимикати гени, а й змінювати їх та відновлювати, що можна використовувати при лікуванні моногенних спадкових захворювань.

2. Отримувати клітини з генетично кодованими флуоресцентними білками. Вони дозволяють відстежувати окремі клітини в організмі і навіть молекули в клітинах, фарбувати певні органели, вивчати міжмолекулярні взаємодії та конформацію білків, вимірювати

концентрації вторинних посередників ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , цАМФ,  $\text{H}^+$ , АТФ/АДФ, НАДН та ін.), візуалізувати активність різних білків.

3. Оптогенетика – метод, у якому за допомогою генетично кодованих світлочутливих білків можна керувати клітинними процесами з високою тимчасовою та просторовою роздільною здатністю, буквально посвітивши в потрібну область лазером (рис. 2).



Рисунок 2. Оптогенетичні конструкції дозволяють за допомогою лазера в заданій точці клітини і в заданій час запускати різні процеси: 1 - струм іонів через мембрану та електричні імпульси, 2 - активність генів, 3 - активність білків, 4 - активність рецепторів і передачу сигналів у клітини, 5 - поглинання речовин зовні, 6 – взаємодії між білками, 7 – переміщення внутрішньоклітинних везикул, 8 – синтез та деградацію білків, 9 – дихальний ланцюг мітохондрій та загибель клітини, 10 – передачу сигналу вторинними посередниками.

4. Проточна цитометрія - поштучне дослідження клітин у потоці рідини: клітини по одній проходять через промінь лазера, а спеціальні детектори ловлять сигнал флуоресценції та світлорозсіювання від освітленої лазером клітини. На відміну від мікроскопії, вона є вихідно кількісним методом, тобто дозволяє точно виміряти інтенсивність флуоресценції і має високу продуктивність: швидкість обробки досягає мільйона клітин на хвилину. Метод хороший для ідентифікації, підрахунку та сортування рідкісних у популяції клітин, таких як стовбурові клітини або антиген-специфічні лімфоцити, яких може бути лише кілька клітин на мільйон. Найбільшого поширення цитометрія виявила імунології для аналізу субпопуляцій лейкоцитів без перекладу в культуру.

### 3. Ембріональні стовбурові клітини та індуковані плюрипотентні стовбурові клітини

#### Ембріональні стовбурові клітини

На початку ХХ століття Олександр Максимов виявив, що клітини походять від єдиного предка - стовбурової клітини (СК). З того часу вчені постійно шукали СК, сподіваючись навчитися керувати їх диференціюванням і отримувати певні тканини, а якщо пощастить, то й органи. Шукали такі клітини на ранніх стадіях розвитку організму. Так, Хейфлік використовував абортівний матеріал, у якому, проте, клітини вже придбали спеціалізацію та пішли кожна своїм шляхом розвитку. Інші ж брали ембріони тварин і людини на більш ранніх стадіях, сподіваючись отримати стовбурові клітини, які ще не визначилися з напрямком розвитку.

70-і роки:

Отримані клітини, що підтримувалися в культурі мінімум рік. Але вони відрізнялися від вихідних клітин зародка, не мали бажане диференціювання і мали хромосомні аномалії.

1998 р.:

Отримані перші лінії ембріональних стовбурових клітин людини, які могли підтримувати у недиференційованому стані. Для цього їх вирощували на фідері – шар з ембріональних фіброblastів, убитих радіацією. На фідері ЕСК утворюють характерні колонії,

які називаються ембріодними тільцями (рис. 3), а за його відсутності — починають спонтанно диференціюватися, причому цей процес важко піддається контролю.



Рисунок 3 - Схема отримання та мікрофотографія колонії ЕСК. *Ембріональні клітини (~100 шт) отримують на 5-9 день після екстракорпорального запліднення із внутрішньої клітинної маси бластоцисти. Ці клітини висаджують на фідер із умертвлених фібробластів. Приблизно через тиждень можна виявити утворені ними колонії - ембріодні тільця (праворуч).*

Основною метою отримання диференційованих клітин із ЕСК є їх використання для репарації ушкоджених тканин. ЕСК також знайшли широке застосування у фармакології як джерело нормальних людських клітин різних типів для тестування ліків. Ще одна важлива місія ЕСК – внесок у розуміння процесів диференціювання, регенерації та репарації, що може бути використане для активації власного регенеративного потенціалу організму.

#### **Проблеми:**

- Введення недиференційованих ЕСК в організм викликає утворення тератом (пухлин із усіх типів тканини).
- Ембріональні стовбурові клітини імунологічно не ідентичні реципієнту, а значить, їхнє підсаджування викликає імунну відповідь.
- У культурі ЕСК часто присутні недодиференційовані клітини, які при виведенні можуть спричинити утворення пухлин.
- Просте введення клітин не забезпечує їх правильної локалізації у тканині, формування повноцінного позаклітинного матриксу та набуття потрібної активності.
- Терапевтичний ефект від введення, безумовно, є, але повного відновлення пошкодженої тканини або втраченої функції досягти поки що не вдається.

#### **Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини**

Грандіозним проривом у галузі клітинних технологій після відкриття ЕСК стала можливість перепрограмування зрілих диференційованих клітин організму в плюрипотентні стовбурові клітини, названі **індукованими плюрипотентними стовбуровими клітинами** (ІПСК, або іPSC, рис. 4).

Основні особливості:

- 1) ІПСК отримують без використання ембріонів, що знімає безліч етичних обмежень.
- 2) ІПСК можна отримати від самого пацієнта, що дозволяє забезпечити повну імуносумісність.
- 3) Існують протоколи отримання ІПСК, у яких фактори перепрограмування експресуються тимчасово (не вбудовуючись у геном), що знижує ризик виникнення онкогенних мутацій.

4) ПСК генетично ідентичні донору і можуть бути використані як *in vitro* моделі для вивчення індивідуальних молекулярних механізмів патології та для персоналізованого підбору ліків.

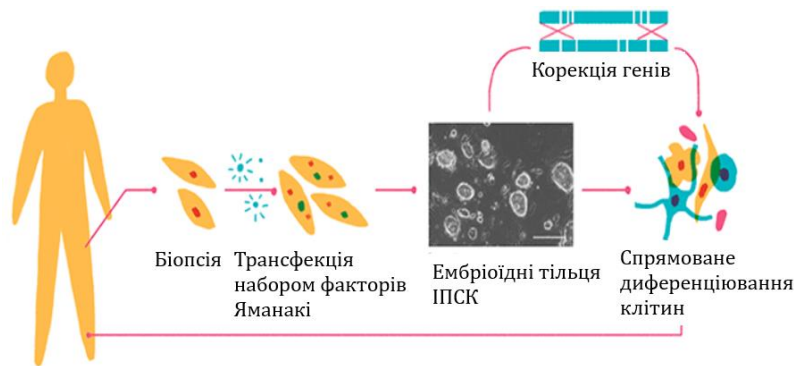


Рисунок 4 - Схема отримання та зображення ембріодних тілець ПСК. Клітини дорослого організму одержують шляхом біопсії, після чого їх трансфецирують набором транскрипційних факторів (факторів Яманаки) та висаджують на фідер. Для репрограмування клітин та формування ембріодних тілець необхідно 16 днів. Після цього ПСК можна отримувати клітини заданого типу шляхом спрямованої диференціювання і при необхідності коригувати несправні гени. Отримані клітини можуть бути використані для введення пацієнту для відновлення функцій тканини.

#### 4. 3D-культури

Для культивування використовується скло з виїмкою та двох покривних стекол (рис. 5).

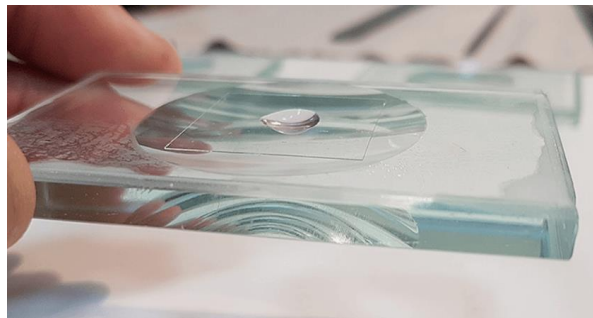


Рисунок 5 - Культивування клітин у камері Максимова. У ній крапля зі шматочком тканини або клітинами міститься на мале покривне скло. За допомогою крапельки води та капілярних сил мале покривне скло адгезується до великого, яке, своєю чергою, кладеться на основу та герметизується парафіном.

Для запуску диференціювання ембріодних тілець задані тканини використовують певні набори морфогенів і ростових факторів, що додаються за чіткою програмою, після чого клітини укладають у спеціальний гель, що імітує позаклітинний матрикс (Matrigel). Стимульовані таким чином тільца мають здатність відтворювати характерну для цільової тканини тривимірну структуру (рис. 6), формуючи органоїди.

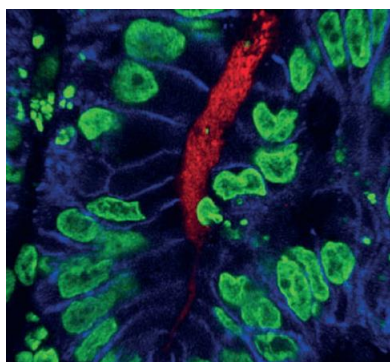


Рисунок 6 - Імунофлуоресцентне фарбування різних типів клітин на гістологічному зрізі органноїду кишечника.

## 5. Застосування клітинних технологій у медицині

### 5.1 Виробництво вакцин

Перша вакцина, вироблена в лінії клітин людини проти краснухи (1970 рік). Для її створення Стенлі Плоткін заражав клітини WI-38 вірусом і вирощував їх за 30 °С, що дозволило відібрати штам вірусу, пристосований саме до цієї температури, а не до фізіологічних 37 °С, при яких вірус гине. Виробництво вірусних частинок у клітинних лініях здійснюється у біореакторах, які ще називають ферментерами (рис. 7).

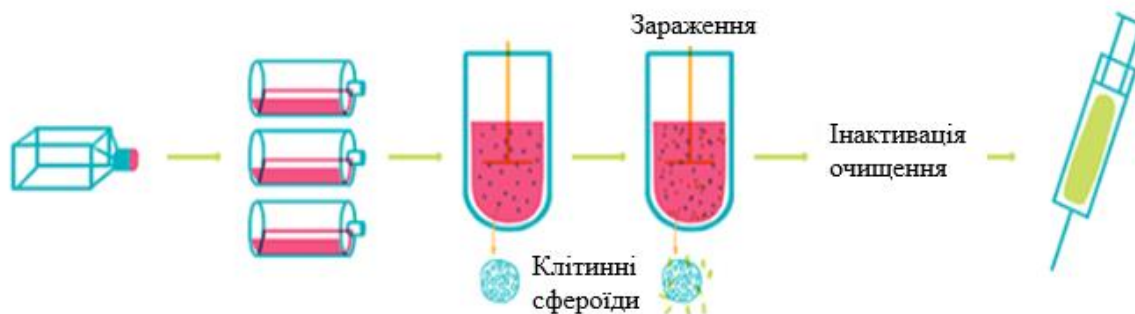


Рисунок 7 - Схема технологічного процесу виробництва вакцин.

Для біореактора клітини з флакона спочатку розмножують у ролерних бутлях. З поверхні пляшок клітини у вигляді суспензії переносять у біореактор, де постійно перемішують, внаслідок чого вони формують клітинні сфероїди. При досягненні максимальної густини клітини заражають вірусом, після чого вони починають його виробляти у великій кількості. Вірус збирають із культурального середовища, інактивують, очищують і в результаті отримують готову вакцину.

### 5.2 Біотехнологічне виробництво білків

Щоб клітина почала виробляти потрібний білок, у неї необхідно впровадити ген цього білка. Отримані в такий спосіб білки називають рекомбінантними.

Для рекомбінантних білків використовують **клітини бактерій**, а саме кишкова паличка *Escherichia coli* (рис. 8).

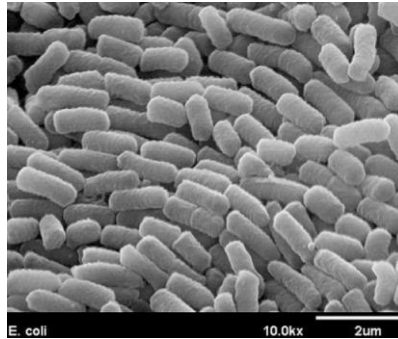


Рисунок 8 – Кишкова паличка Escherichia coli

У неї швидка швидкість розмноження (близько 30 хв), висока щільність культури, простий склад живильного середовища та велика питома кількість білка, що виробляється на клітину. Бактерії відтворюють не всякі білки.

*Причини:*

1. Для згортання довгої поліпептидної нитки у правильну тривимірну форму в клітині присутні шаперони. У бактерій цих шаперонів менше і вони відрізняються від еукаріотів.
2. У бактерій відсутня стадія післятрансляційної доробки білків, на якій видозмінюються деякі ділянки, навішуються цукру та ліпіди та видаляються допоміжні послідовності.
3. Бактерії що неспроможні об'єднувати чужорідні їм білки в четвєртинні структури.
4. Висока щільність білка, що напрацьовується в бактеріях, є згубною для багатьох білків, і вони випадають в осад.

В результаті бактерії використовуються для виробництва простих білків.

Для виробництва складних білків використовують клітини, найбільш схожі на ті, які виробляють їх у природних умовах. Наприклад, для виробництва антитіл використовують **гібриди В-клітин** (рис. 9, 10).

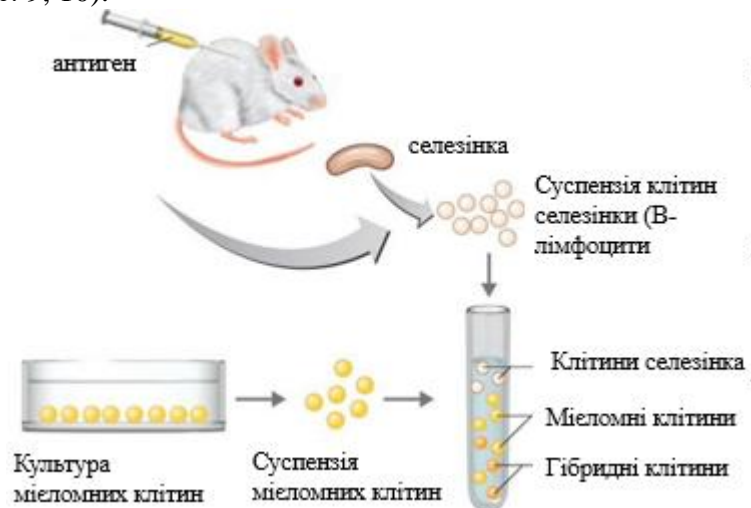
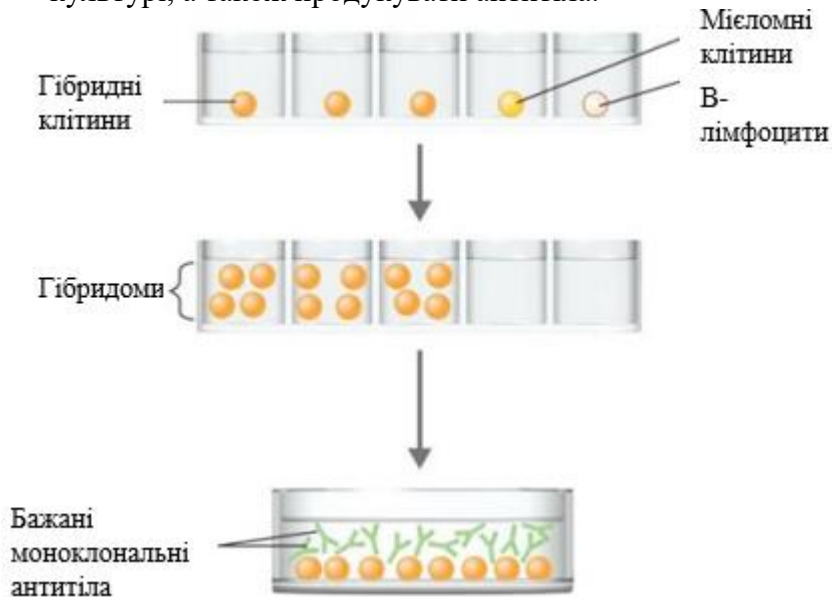


Рисунок 9 - Основні етапи отримання гібридоми

1. Миші вводять специфічний антиген, який викликає продукцію антитіл проти цього антигену.
2. Селезінка мишей видаляється і гомогенізується для отримання суспензії клітин. Ця суспензія містить В клітини, які продукують антитіла проти введеного антигену.

- Клітини селезінки потім змішують з клітинами мієломи, які здатні безперервно рости в культурі, а також відсутній резервний шлях синтезу нуклеотидів.
- Деякі з антитіло-продукуючих клітин селезінки та клітини мієломи зливаються, утворюючи гібридні клітини. Ці гібридні клітини тепер здатні безперервно рости в культурі, а також продукувати антитіла.



Продовження рисунку 9 - Основні етапи отримання гібридоми

- Суміш клітин поміщають у селективне середовище, яке дозволяє рости тільки гібридним клітинам. Гинуть мієломні клітини, що не злилися та В-лімфоцити.
- Гібридні клітини проліферують, утворюючи клон гібридом. Гібридоми перевіряються на продукцію потрібних антитіл.
- Вибрані гібридоми потім культивують для отримання великих кількостей моноклональних антитіл.

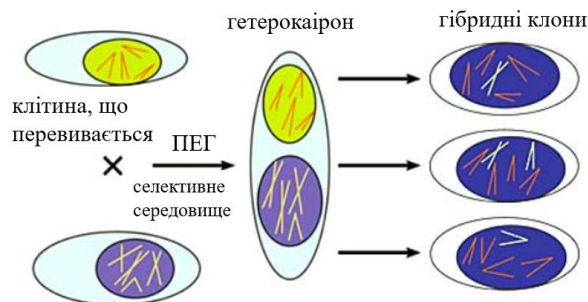


Рисунок 10 - Схема отримання гібридних клонів «людина-миша»

В-клітини, що виробляють антитіла, отримують із селезінки імунізованих мишей. Далі для напрацювання антитіл ці В-клітини необхідно розмножити, але оскільки вони мають обмежену здатність до поділу, їх іморталізують шляхом злиття з лінією ракових клітин (мієломою). Клітини гібридом розсаджують по лунках планшета з сильним розведенням для забезпечення попадання не більше однієї клітини в лунку. Далі вирощують нащадків однієї клітини - клітинний клон. Антитіла, що виробляються клоном клітин, ідентичні і називаються моноклональними.

Для виробництва людських рекомбінантних білків зараз використовують кілька клітинних ліній, умови культивування та живильні середовища для яких підбрані так, щоб забезпечити максимальний вихід продукту. Найбільш поширеною лінією є **лінія клітин яєчника китайського хом'ячка CHO** (рис. 11), яка може рости як прикріпившись до поверхні, так і в суспензії.

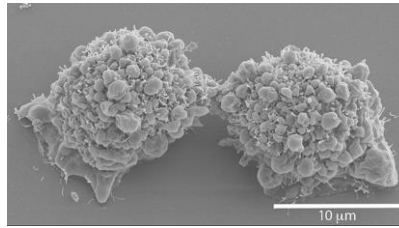


Рисунок 11 - Клітини яєчника китайського хом'ячка CHO

Кількість білка, що отримується з літра середовища клітин ссавців, приблизно в 10 разів нижче, ніж з літра бактерій.

**Використання дріжджів** (рис. 12):

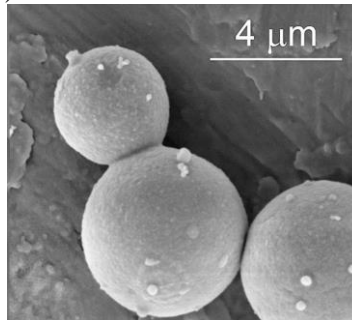


Рисунок 12 - Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*

- майже так само швидко діляться, як і бактерії (2 години);
- не дуже вимогливі до живильного середовища.

Дріжджі, як і людські клітини, — еукаріоти, проте численні дрібні відмінності цього апарату дріжджів та ссавців потребують оптимізації процесу для кожного окремого білка.

Інші альтернативи клітинам ссавців - **клітини комах та рослин**.

Найбільша частина терапевтичних препаратів, що розробляються сьогодні, - це рекомбінантні білки, і близько 60% з них виробляється саме в клітинах ссавців.

## 6. Напрями клітинної терапії

Широке застосування знайшли мезенхімальні ствовлі клітини (МСК). МСК - це клітини сполучної тканини, здатні диференціюватися в клітини кісткової, хрящової та жирової тканин. Регенеративний ефект МСК обумовлений не стільки приживленням самих клітин, що трансплантуються, скільки виділяються ними речовинами і мікрочастинками, які стимулюють регенеративну активність власних стовбурових клітин.

Клітини пуповинної крові містять велику кількість клітин на ранніх стадіях диференціювання і не встигли накопичити генетичних помилок. Ці клітини можна



використовувати замість кісткового мозку, не завдаючи травми при виділенні. Також ведеться багато клінічних досліджень для лікування за допомогою стовбурових клітин неврологічних, аутоімунних, серцево-судинних та спадкових захворювань.

Адаптивна клітинна імунотерапія, за якої імунні клітини програмуються на розпізнавання та знищення пухлин. При цьому у власні імунні клітини пацієнта *in vitro* вводять ген, що забезпечує розпізнавання ракового антигену (молекули, якої багато на ракових клітинах, але майже немає на нормальних). Після генетичної модифікації клітини назад вводять пацієнту.