



Зачем нужны коллекции линий клеток

А.Г. Мензоров , О.Л. Серов

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Прогресс в области клеточной биологии в значительной мере связан с разработкой технологии репрограммирования геномов соматических клеток. В результате из соматических клеток человека, например клеток кожи, можно получить индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки так же, как и эмбриональные стволовые клетки, обладают плюрипотентностью. Создание индуцированных плюрипотентных стволовых клеток открыло перспективу развития пациент-специфической клеточной терапии. Многие исследователи полагают, что плюрипотентные клетки являются реальной основой будущей регенеративной медицины. Получение плюрипотентных стволовых клеток пациента, их направленная дифференцировка в соматические клетки и трансплантация пациенту позволят избежать иммунологического отторжения. Кроме того, недавно появившаяся технология направленного изменения геномов CRISPR/Cas делает возможным исправление генетических дефектов в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, т. е. генетический дефект можно исправить в клетках пациента *in vitro* и, проведя дифференцировку в желаемый клеточный тип, вновь ввести эти клетки пациенту. Система CRISPR/Cas позволяет направленно вносить практически любые мутации в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки для создания модельных линий, позволяющих изучать механизмы заболеваний и тестировать фармацевтические препараты. Можно как выключать один ген или группы генов, так и эффективно вносить генетические конструкции в выбранное место генома. Система направленного изменения генома также позволяет временно включать и выключать гены, удалять участки хромосом. Для эффективного использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в биомедицинских исследованиях необходимо иметь общедоступные коллекции линий клеток. В настоящее время в Российской Федерации нет коллекций плюрипотентных стволовых клеток. Кроме того, необходима разработка стандартов культивирования и хранения клеток этого типа. В мини-обзоре представлено обоснование необходимости создания коллекций плюрипотентных линий клеток в Российской Федерации, подробное описание характеристик линий клеток, которые вносятся в коллекцию культур клеток, и рекомендуемый оптимальный протокол депонирования и использования линий клеток.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки; плюрипотентность; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; коллекция линий клеток; клеточная терапия.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Мензоров А.Г., Серов О.Л. Зачем нужны коллекции линий клеток. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):945-948. DOI 10.18699/VJ16.215

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Menzorov A.G., Serov O.L. The necessity of cell banks. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6): 945-948. DOI 10.18699/VJ16.215

REVIEW

Received 27.10.2016

Accepted for publication 08.12.2016

© AUTHORS, 2016

The necessity of cell banks

A.G. Menzorov , O.L. Serov

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Current progress in cell biology is connected with the development of somatic cell reprogramming technology. As a result of this technology, it is possible to produce induced pluripotent stem cells (iPSCs) from human somatic cells, for instance, from skin cells. As well as embryonic stem cells, these iPSCs possess pluripotency. Production of iPSCs opened new horizons for patient-specific cell therapy. Many researchers consider iPSCs a real basis for future regenerative medicine. Production of a patient's iPSCs, their differentiation into somatic cells, and subsequent transplantation to a patient would allow them to avoid immunological rejection. In addition, a recently developed technology of directed genome modification, CRISPR/Cas, allows correction of genetic mutations in iPSCs. Thus, genetic mutations could be corrected *in vitro*, and after differentiation into a desired cell type, these cells could be transplanted to a patient. In addition, CRISPR/Cas could be used to introduce practically any mutations into iPSCs for the creation of disease-specific model cell lines that would facilitate disease mechanism studies and pharmaceutical drug testing. It is possible to turn off any gene or genes as well as to insert a genetic construct into a selected genomic region to temporarily turn on and off genes and remove chromosomal regions. Cell banks that are open to general use are necessary for efficient usage of iPSCs in biomedical research. Currently, there are no pluripotent stem cell lines in Russian Federation cell banks. Moreover, it is essential to develop standardized practice of culture and storage of that cell type. This mini-review focuses on the necessity of the creation of a pluripotent stem cell bank in the Russian Federation, a detailed description, and a recommended protocol for cell line deposition and usage.

Key words: embryonic stem cells; pluripotency; induced pluripotent stem cells; cell bank; cell therapy.

Прошло 10 лет с появления статьи К. Takahashi и S. Yamanaka (2006), в которой авторы предложили эффективный способ получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из фибробластов с помощью экзогенной экспрессии четырех транскрипционных факторов, названных «коктейль Яманаки». ИПСК так же, как и эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), плюрипотентны. ЭСК получают из клеток внутренней клеточной массы преимплантационных эмбрионов, а затем их можно дифференцировать во все типы соматических и зародышевых клеток взрослого организма. Важным параметром технологии, предложенной S. Yamanaka, является возможность создания персонализированных ИПСК человека, тем самым снимается проблема иммунологической совместимости. Многие исследователи считают, что будущее регенеративной медицины будет основано на широком использовании ИПСК в качестве источника для дифференцировки в различные типы соматических клеток с их дальнейшей трансплантацией пациентам. Таким образом, в результате создания технологий получения ЭСК и ИПСК в клеточной биологии появилась новая категория культур клеток, отличная от прежних, традиционных, преимущественно перевиваемых «бессмертных» культур клеток или кратковременно культивируемых культур первичных соматических клеток.

Есть еще три важных аспекта, связанных с совершенствованием технологий получения персонализированных ИПСК. Во-первых, пролиферативный потенциал ИПСК человека дает реальную возможность получения ИПСК от пациентов-носителей мутантных генов или хромосомных перестроек. Такая коллекция ИПСК может служить материальной базой для изучения молекулярных механизмов эффектов мутаций в развитии патологий. Во-вторых, разработка системы направленного трансгеноза CRISPR/Cas, позволяющей осуществлять адресную модификацию отдельных генов или даже фрагментов хромосом, дает экспериментаторам инструмент для создания мутантных линий ИПСК, которые можно использовать для моделирования тех или иных наследственных патологий (Смирнов и др., 2016). Более того, система CRISPR/Cas позволяет осуществлять коррекцию мутаций в ИПСК от пациентов-носителей мутаций, тем самым получать плюрипотентные клетки с «нормальными» аллелями, что может стать первым шагом для их дальнейшего использования в клеточной терапии наследственных заболеваний. Значение таких линий ИПСК трудно переоценить, и актуальность создания коллекций таких линий очевидна. В-третьих, создание коллекции мутантных клеток обеспечивает базу для тестирования фармакологических препаратов для коррекции эффектов мутаций.

Самостоятельным компонентом современных коллекций линий клеток являются культуры специализированных соматических клеток, например, таких как кератиноциты или клетки волосных фолликулов, и нейральные клетки-предшественники, например нейроэпителиальные или нейральные стволовые клетки. Эти клетки также являются новой категорией в клеточной биологии со специфическими условиями культивирования и криоконсервации. Учитывая то, что эти типы клеток наиболее

близки к применению в клинической практике, актуальность создания коллекций таких линий также очевидна.

В связи с этим следует отметить своевременность недавнего появления Федерального закона от 23.06.2016 г. № ФЗ-180 «О биомедицинских клеточных продуктах», регламентирующего обращение биомедицинских клеточных продуктов в Российской Федерации. Одновременно повышаются и требования к исследовательской деятельности в разных областях клеточной биологии и эмбриологии, которые должны соответствовать международным стандартам «Global Standards for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2016 ISSCR Guidelines» (<http://www.isscr.org/docs/default-source/guidelines/isscr-guidelines-for-stem-cell-research-and-clinical-translation.pdf>).

При создании коллекций плюрипотентных клеток человека и животных так же, как и специализированных зрелых и дифференцированных клеток, актуальна разработка новых регламентов и стандартов их культивирования и криоконсервации. Унификация требований к депонируемым клеточным культурам – необходимый и обязательный элемент клеточной коллекции. Ниже приведены общепринятые международным сообществом критерии для характеристики клеток, депонируемых в коллекциях.

Характеристики депонируемых линий клеток

Данные о коллекции клеток. Основная информация о коллекции клеток должна включать название коллекции и контактные сведения.

Название культуры. Уникальное название культуры клеток, позволяющее найти информацию об этой культуре в других источниках данных.

Вид. Видовая принадлежность культуры – одна из базовых характеристик. Наиболее распространенные линии клеток млекопитающих принадлежат к двум видам – человек и мышь – как наиболее широко используемым экспериментальным объектам.

Каталожный номер. Каждая культура помимо уникального названия должна иметь каталожный номер в данной коллекции. Может возникнуть ситуация, когда одна и та же линия клеток получена для коллекции из разных источников, и, соответственно, названия для идентификации недостаточно. Например, перевивная линия клеток НЕК293 очень широко используется в клеточной биологии. Эти клетки получены из клеток эмбриональной почки человека, трансформированных аденовирусом, модальное число хромосом – 64, в отличие от нормального для человека – 46, кроме того, в линии присутствуют хромосомные перестройки и в целом для этих клеток характерна нестабильность кариотипа (<https://www.lgstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1573.aspx>). Популярность этой линии объясняется двумя причинами: простота культивирования и очень высокая эффективность трансфекции ДНК. Это позволяет эффективно использовать клетки НЕК293 для трансфицирования ДНК и продукции вирусов. Так, наиболее распространенный протокол получения ИПСК – трансдукция лентивирусами, произведенными клетками НЕК293. Нестабильность кариотипа этой линии при культивировании и дополнительные модификации (линия 293T содержит Т-антиген, Phoenix, производная этой

линии, — компоненты геномов вирусов и т. д.) приводят к необходимости учитывать не только название, но и происхождение культуры.

Происхождение клеток — важная характеристика. Например, ЭСК мыши получают из эмбрионов мышей на стадии 3–3.5 дней, чаще всего от мышей линии 129. ЭСК плюрипотентны, т. е. способны к неограниченному делению *in vitro* и к дифференцировке в клетки, производные трех зародышевых листков (Evans, Kaufman, 1981). ИПСК чаще всего получают из фибробластов (Takahashi, Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Мезенхимальные стволовые клетки, как правило, выделяют из костного мозга, жировой ткани и плаценты.

Морфология — одна из ключевых характеристик линии клеток. Важными являются размер клеток, ядерно-цитоплазматическое соотношение, формирование при росте монослоя или колоний определенной формы. Эти сведения позволяют при получении культуры из коллекции и культивировании следить за состоянием клеток и при необходимости менять условия культивирования.

Способ культивирования. В целом способы культивирования клеток можно разделить на монослойный и суспензионный. При монослойном способе клетки растут прикрепленными к пластику, который можно покрыть различными матриксами для лучшей адгезии, например желатином, матригелем или витронектином. В некоторых случаях матрикс необходим не только для культивирования клеток, но и для направления дифференцировки, например поли-L-орнитин и ламинин часто используют для нейральной дифференцировки плюрипотентных клеток. В экспериментах с плюрипотентными клетками мыши и человека в качестве питающих клеток используют эмбриональные фибробласты мыши, обработанные митомицином С. Такие клетки не делятся, но сохраняют способность синтезировать ростовые факторы, необходимые для плюрипотентных клеток. Суспензионный способ культивирования, при котором клетки находятся в среде без прикрепления к поверхности, применяется для клеток, которые не растут в монослой. Например, на одной из стадий дифференцировки ИПСК в нейроны можно получить нейросферы — конгломераты незрелых предшественников нейронов. Кроме того, при необходимости получения большой биомассы некоторых типов клеток можно применять биореакторы для наращивания клеток в суспензии.

Условия культивирования. Это, возможно, самый важный пункт описания культуры. Условия культивирования обычно включают в себя среду для культивирования (например, DMEM), сыворотку крови (например, эмбрионов крупного рогатого скота) и дополнительные добавки, такие как антибиотики, аминокислоты и т. д. Для культивирования практически любого типа клеток существует множество протоколов и их модификаций. Важно, чтобы описание культуры в коллекции клеток включало в себя апробированные условия культивирования, гарантирующие эффективное культивирование клеток, такие как температура, концентрация CO₂ и процедуры посева и криоконсервации.

Контроль контаминации. Культивирование клеток проводится в условиях, близких к стерильным. К сожа-

лению, иногда культуры клеток контаминированы бактериями или грибами. Для предотвращения роста бактерий в среду для культивирования добавляют антибиотики, обычно это смесь пенициллина и стрептомицина, хотя риск контаминации сохраняется даже при соблюдении всех правил безопасности. Кроме того, некоторые лаборатории даже рекомендуют постоянно вести культуры без антибиотиков, так как в некоторых случаях бактерии могут выживать в присутствии антибиотиков и постепенно приобретать устойчивость к ним. Среди особо «злостных» патогенов следует выделить микоплазму — эндосимбиотическую бактерию, не имеющую клеточной стенки. Контаминация клеточных культур микоплазмой осложняется тем, что изменяется физиологическое состояние клеток и нередко возникают перестройки хромосом. По мнению Н.Г. Drexler и С.С. Uphoff (2002), исследования, проведенные на клетках, зараженных микоплазмой, не могут быть полноценными, поскольку искажаются физиологические параметры клеток. Для обнаружения контаминации клеток оптимально использовать чувствительные молекулярно-биологические методы, например ПЦР. Культуры клеток человека необходимо дополнительно проверять на зараженность вирусами: вирус гепатита В, папилломавирусы человека, ВИЧ, цитомегаловирус, вирус Эпштейна — Барр.

Контроль видовой идентичности. При долговременном культивировании возрастает риск контаминации не только микоплазмой и другими микроорганизмами, но и клетками других линий. Один из самых известных примеров — массовая контаминация культур клетками HeLa, перевивными раковыми клетками (Lucey et al., 2009). Таким образом, необходимо проводить контроль видовой идентичности. В этом случае основной метод анализа — цитогенетический в сочетании с анализом специфических ДНК-маркеров.

Кариотип. Одна из важнейших характеристик клеточной линии — ее кариотип. В большинстве случаев ЭСК, ИПСК и нейральные стволовые клетки имеют нормальный диплоидный кариотип. Однако при культивировании клеток, особенно при длительном, в них могут возникать хромосомные перестройки и/или изменение численности хромосом. Это делает необходимым постоянный мониторинг кариотипа. Показано, например, что ЭСК мыши даже на ранних пассажах культивирования могут иметь нестабильный состав хромосом (Menzorov et al., 2016).

Пассаж криоконсервации. Продолжительное культивирование может вызывать нарушение хромосомного состава и увеличивает риск контаминации. В связи с этим для каждой культуры необходимо указывать пассаж, на котором клетки были криоконсервированы.

Дополнительные характеристики ЭСК и ИПСК. Известно, что разные клоны ЭСК или ИПСК, полученные из одного источника, могут иметь индивидуальные особенности. Для ЭСК и ИПСК наиболее важной характеристикой является их плюрипотентность. Оценка плюрипотентности включает несколько тестов: присутствие типичных маркеров, характерных для клеток внутренней клеточной массы бластоцисты, таких как Oct4, Sox2 и Nanog; способность образовывать эмбрионидные тельца, содержащие маркеры трех зародышевых листков; способность

формировать тератомы, содержащие производные трех зародышевых листков, при введении иммунодефицитным мышам (самый информативный тест для ЭСК и ИПСК человека); способность участвовать в формировании химерных мышей со вкладом в соматические и половые клетки; и, наконец, получение методом тетраплоидной комплементации мышей, полностью состоящих из клеток, потомков ЭСК или ИПСК. Данные транскриптомного анализа ЭСК и ИПСК также информативны для характеристики этих клеток.

Публикации. Дополнительная характеристика – публикации, описывающие депонируемые клетки. Оригинальные статьи позволяют получить дополнительные сведения о культуре клеток, которые по формату не могут быть указаны в базовом описании культуры клеток.

Коллекции линий клеток

Необходимость в централизованном доступе к линиям клеток привела к возникновению коллекций культур клеток. Мы рассмотрим несколько коллекций клеток с акцентом на наличие в них плюрипотентных стволовых клеток.

АТСС – один из самых больших в мире банков биологических образцов (<https://www.lgcstandards-atcc.org>). В нем содержится более 3400 линий клеток, в том числе 19 линий ИПСК человека и 14 линий ЭСК мыши.

Центр биоресурсов RIKEN Японии (<http://en.brc.riken.jp/>) содержит 11 линий ИПСК человека от здоровых доноров, а также более 400 линий от пациентов с различными наследственными заболеваниями. В этом банке представлено более 100 линий ЭСК мыши.

Специализированный европейский банк ИПСК на сегодняшний день имеет более 250 линий ИПСК, полученных из клеток здоровых людей и пациентов с наследственными заболеваниями (<https://cells.ebisc.org/>).

Российская коллекция клеточных культур содержит сотни линий позвоночных, представленных главным образом перевиваемыми или первичными соматическими клетками (www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk_ru.htm).

Рекомендуемый протокол депонирования линий клеток

Так как продолжительное культивирование клеток увеличивает риск изменения их хромосомного состава, желательно минимизировать число пассажей перед криоконсервацией. Далее описан рекомендуемый протокол депонирования линий клеток.

Этап 1 – основной сток. Следует размножить полученную линию клеток и заморозить три-пять ампул основного стока культуры клеток. На этом этапе необходимо проверить культуру на контаминацию бактериями, грибами и микоплазмой, а также подтвердить видовую принадлежность с помощью анализа кариотипа и специфических маркеров ДНК.

Этап 2 – рабочий сток. Размораживается одна ампула основного стока, клетки размножаются и криоконсервируются 10–100 ампул. В конце этого этапа также необходимо провести проверку культуры клеток.

Этап 3 – пользовательский сток. Размораживается одна ампула рабочего стока и снова после размножения

замораживается 10–100 ампул с оценкой культуры. Эти ампулы предоставляют заказчикам культур клеток.

Такой протокол депонирования дает возможность получить большое количество материала подтвержденного качества. При этом число пассажей культуры до получения пользовательского стока минимально, например для ЭСК мыши оно может составлять всего семь. Это позволяет минимизировать риск контаминации и сохранить свойства линий клеток.

Заключение

Прогресс в развитии новых клеточных технологий открыл широкие возможности как фундаментальных, так и прикладных исследований в биомедицине. Потребность в организации инфраструктуры для этих исследований очевидна и, в первую очередь, это относится к необходимости создания коллекций линий таких типов клеток, как плюрипотентные клетки, ЭСК и ИПСК и клетки-предшественники, детерминированные к дифференцировке в клетки определенной ткани. Такие коллекции существуют в Европе, США, Японии и других странах. В Российской Федерации также назрела необходимость в создании подобных коллекций для обеспечения как академических научных работ, так и активно развивающейся биомедицины, в которой предполагается внедрение достижений клеточной биологии в клиническую практику.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0005 «Collection of pluripotent cultures of human and mammalian cells for general biological and biomedical purposes».

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Drexler H.G., Uphoff C.C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 2002;39(2):75-90. DOI 10.1023/A:1022913015916.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.
- Lucey B.P., Nelson-Rees W.A., Hutchins G.M. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2009; 133(9):1463-1467. DOI 10.1043/1543-2165.133.9.1463.
- Menzorov A., Pristiyazhnyuk I., Kizilova H., Yunusova A., Battulin N., Zhelezova A., Golubitsa A., Serov O. Cytogenetic analysis and Dlk1-Dio3 locus epigenetic status of mouse embryonic stem cells during early passages. *Cytotechnology*. 2016;68(1):61-71. DOI 10.1007/s10616-014-9751-y.
- Smirnov A.V., Yunusova A.M., Lukyanchikova V.A., Battulin N.R. CRISPR/Cas9, A universal tool for genomic engineering. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175 (in Russian).
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872. DOI 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.