

АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ISSN 2077-6055

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЮЛЛЕТЕНЬ

ВЫПУСК 25

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2010

Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 25.
Отв. ред. М.С. Богданова. - СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. - 79 с.

Бюллетень содержит информацию о новых направлениях фундаментальных и прикладных исследований на клеточных культурах, о деятельности Ассоциации специалистов по клеточным культурам, о научных совещаниях, конференциях, о новых реагентах и лабораторном оборудовании для работы с клеточными культурами. В частности, введен новый раздел: «Стволовые клетки: их использование в фундаментальной клеточной биологии и медицине». Пристальное внимание мировой научной общественности к этому интенсивно развивающемуся направлению исследований объясняется огромными перспективами использования стволовых клеток эмбрионов и взрослых организмов для создания новых биомедицинских технологий.

Бюллетень предназначен для широкого круга читателей в области клеточной биологии, биотехнологии, медицины, фармакологии.

Составитель и ответственный редактор: М.С. Богданова

Редакционная коллегия: Г.П. Пинаев
М.С. Богданова
Г.Г. Полянская

© Авторы статей, указанные в тексте, 2010
© Составление. Ассоциация специалистов по
клеточным культурам, Институт цитологии РАН,
2010

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ В УЧРЕЖДЕНИЯХ РОССИИ

РОЛЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В КАРИОТИПИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ «БЕЗМАРКЕРНЫХ» КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Г.Г. Полянская

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; poljansk@mail.cytspb.rssi.ru

Показано существенное влияние иммобилизованных белков внеклеточного матрикса (ВКМ) - ламинина и фибронетина, на характер кариотипической изменчивости в «безмаркерных» клеточных линиях разного происхождения (эпителиоподобные и фибробластоподобные). Установлено, что характер количественной кариотипической изменчивости не зависит, а характер структурной изменчивости зависит от происхождения линии. Показано также, что конкретная структура кариотипа вносит определенные коррективы в характер кариотипической изменчивости, обеспечивая способ адаптации клеточной культуры к определенному субстрату. Полученные результаты существенно расширили представления о важности иммобилизованных белков ВКМ для жизнедеятельности клеток, ибо изменения кариотипической структуры неразрывно связаны с нарушением функционирования генов, что может привести к изменению разных клеточных свойств.

Ключевые слова: кариотипическая изменчивость, клеточная линия, белки внеклеточного матрикса, ламинин, фибронектин, структурный вариант кариотипа, хромосомные aberrации.

При переводе клеток в состояние *in vitro* основными типами клеточного взаимодействия становятся физический контакт между клетками и контакт клеток с субстратом, а также связь через метаболиты в ростовой среде. Эти взаимодействия объединяют клетки, составляющие клеточную популяцию, в единую автономную систему. Межклеточные контакты осуществляют как структурные, так и функциональные связи между клетками. Важным типом межклеточных соединений являются щелевые контакты, которые в активном состоянии обеспечивают

интенсивную диффузию между клетками функционально активных веществ и составляют основу «метаболической кооперации». Диффузионная связь позволяет клеткам обмениваться растворимыми в воде веществами широкого диапазона (1, 2). Щелевой контакт сформирован семейством интегральных мембранных белков – коннексинов. Локальные межклеточные взаимодействия посредством щелевых контактов вовлечены в различные клеточные процессы, включая гомеостаз, контроль пролиферации, малигнизацию, апоптоз, а также важны для организма, активно участвуя в процессах онтогенеза. Клетки *in vitro* растут на субстрате, покрытом внеклеточным матриксом, который состоит из разнообразных белков (протеогликанов, коллагенов, эластина, фибронектина, ламинина и др.), секретируемых самими клетками. Большинство клеток контактируют друг с другом и с внеклеточным матриксом в специализированных местах.

В клеточных популяциях *in vitro* одной из основных функций становится неограниченная пролиферация. В связи с этим происходит адаптация структуры кариотипа клеточной популяции, которая состоит в усилении экспрессии тех генов, которые ответственны за поддержание нормальной жизнедеятельности клеток. В процессе стабилизации постоянной клеточной линии *in vitro* в результате адаптации к измененным клеточным функциям и условиям существования устанавливается сбалансированная кариотипическая структура, обеспечивающая оптимальный генный баланс в клеточной популяции как целостной системе. Процесс адаптации выражается, в частности, в определенных количественных и структурных изменениях кариотипа.

Сбалансированная кариотипическая структура постоянной клеточной линии характеризуется: определенным набором маркерных хромосом («маркерные» линии) или соответствием кариотипу донора («безмаркерные» линии), выраженной в большей или меньшей степени частотой клеток с модальным числом хромосом, частотами клеток с другими числами хромосом, определенными пределами изменчивости по числу хромосом (3, 4). Клетки с выраженным числом хромосом имеют преобладающий структурный вариант кариотипа (СВК – число гомологичных хромосом каждого морфологического типа) и имеют дополнительные СВК. Установлено, что для выживания клеточной популяции *in vitro* необходимо существование в ней в определенном соотношении клеток с разными СВК, которое обусловлено конкретными закономерностями. Эти закономерности свидетельствуют о том, что отбор в клеточных популяциях идет не по отдельным хромосомам, а по сбалансированному кариотипу (5, 6).

Клеточные популяции *in vitro* являются динамичными системами и, лишившись многоступенчатого организменного контроля, в значительной степени подвержены влиянию внешних факторов, которые могут усиливать полиморфизм по ряду признаков и, в частности, по кариотипическим характеристикам. Первопричиной всех наблюдаемых кариотипических изменений, безусловно, являются различные изменения в клеточном метаболизме, обусловленные нарушениями в проведении сигналов с поверхности клеток в ядро. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о вполне вероятном существовании функциональной связи между взаимодействием белков внеклеточного матрикса с рецепторами клеток и кариотипической изменчивостью. Так, показано влияние смены способа культивирования клеток (статического, роллерного, суспензионного, монослойного) на структурные и количественные изменения кариотипа клеточной популяции. (7–11). Синтезируемые самими клетками белки ВКМ, взаимодействуя с локализованными на поверхности клеточной мембраны рецепторами, оказывают существенное влияние на важнейшие функции клеток – миграцию, форму, полярность, пролиферацию, дифференцировку, злокачественную трансформацию (12–22). Ряд генетических синдромов, связанных с анеуплоидией по некоторым хромосомам, способствуют нарушению синтеза белков ВКМ, часто приводя к спонтанным абортам (23–26). Известно, что белки внеклеточного матрикса различаются по своим свойствам и по тому влиянию, которое они оказывают на клетки. Взаимодействие ламинина и фибронектина с клеткой происходит через поверхностные рецепторы, среди которых, кроме общих, имеются и свои специфические. Так, ламинин связывается с рецепторами $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, а фибронектин – с рецепторами $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$. Показано, что организация цитоскелета клеток, распластанных на разных субстратах, различна; характер дифференцировки эмбриональных стволовых клеток также различен при культивировании на ламинине и фибронектине (13,14,27). Различный характер взаимодействия между клеточной поверхностью и внеклеточным матриксом связан не только с разными белками внеклеточного матрикса, но и с разным происхождением клеток. Так известно, что эпителиоподобные и фибробластоподобные клетки могут секретировать белки внеклеточного матрикса в разном количественном соотношении (28).

Перспективным подходом к выяснению возможных связей между рецепторами клеточной поверхности и кариотипическими изменениями является исследование влияния разных субстратов, на которых культивируются клетки, на кариотипическую изменчивость клеточных

линий. Мы провели ряд исследований, в которых использовали как разные белки ВКМ в качестве субстрата для культивирования клеток, так и разные по происхождению клетки. Материалы, представляемые в данной статье являются обобщением результатов цикла работ по исследованию влияния иммобилизованных белков ВКМ на кариотипическую изменчивость (29–34).

Материал и методы

Материалом для исследований были постоянные «безмаркерные» фибробластоподобные клеточные линии фибробластов кожи индийского мунджака (М, МТ, кариотипический вариант МТ^А) и эпителиоподобные клеточные линии почки кенгуровой крысы (NBL-3-11 и NBL-3-17), полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Линия М – модальное число хромосом равно 7; кариотип линии идентичен донору. Линия МТ – модальное число хромосом равно 9; кариотип отличается от кариотипа донора числом гомологичных хромосом. Кариотипический вариант МТ^А спонтанно получен из МТ; характеризуется высокой частотой встречаемости дицентриков (теломерных ассоциаций). Линия NBL-3-11 – модальное число хромосом равно 11; кариотип идентичен кариотипу донора за исключением моносомии по аутосоме 5 (гиподиплоид). Линия NBL-3-17 – модальное число хромосом равно 17; кариотип отличается от кариотипа донора числом гомологичных хромосом (гипотриплоид с дисомией по аутосоме 5). Анализ влияния иммобилизованных ламинина 2/4 (Лам) и фибронектина (ФН) на кариотипическую изменчивость указанных клеточных линий проводили в течение 1 – 14 сут. В табл. 1 приводится основная схема экспериментов. Контрольные варианты – К_{общ}, К₂, К_{общ1}, К₁.

Таблица 1. Основные варианты культивирования клеток.

Вариант опыта	Условия культивирования
Лам или ФН	Клетки, постоянно культивировавшиеся на гидрофобной поверхности, покрытой ламинином или фибронектином при предварительной инкубации на этой поверхности в бессывороточной среде 2.5 ч
К _{общ}	Клетки, постоянно культивировавшиеся на гидрофильной поверхности
К ₂	Клетки, постоянно культивировавшиеся в среде с сывороткой на гидрофильной поверхности (используемой для рутинного культивирования клеток), при предварительной инкубации на этой поверхности в бессывороточной среде 2.5 ч

K _{общ1}	Клетки, не прикрепившиеся к белковому субстрату в течение 2.5 ч в бессывороточной среде, далее культивированные в среде с сывороткой на гидрофильной поверхности
K ₁	Клетки, постоянно культивированные на гидрофобной поверхности (отличающейся от гидрофильной отсутствием заряда), при предварительной инкубации на этой поверхности в бессывороточной среде 2.5 ч

Подробное описание методов, используемых в работе, представлено ранее (29–34). Анализировали распределение клеток по числу хромосом и СВК (35). Хромосомные aberrации учитывали метафазным методом. Регистрировали количество и типы хромосомных aberrаций.

Результаты обрабатывали статистически с использованием t – критерия Стьюдента и критерия χ^2 . Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.01$.

Результаты и обсуждение

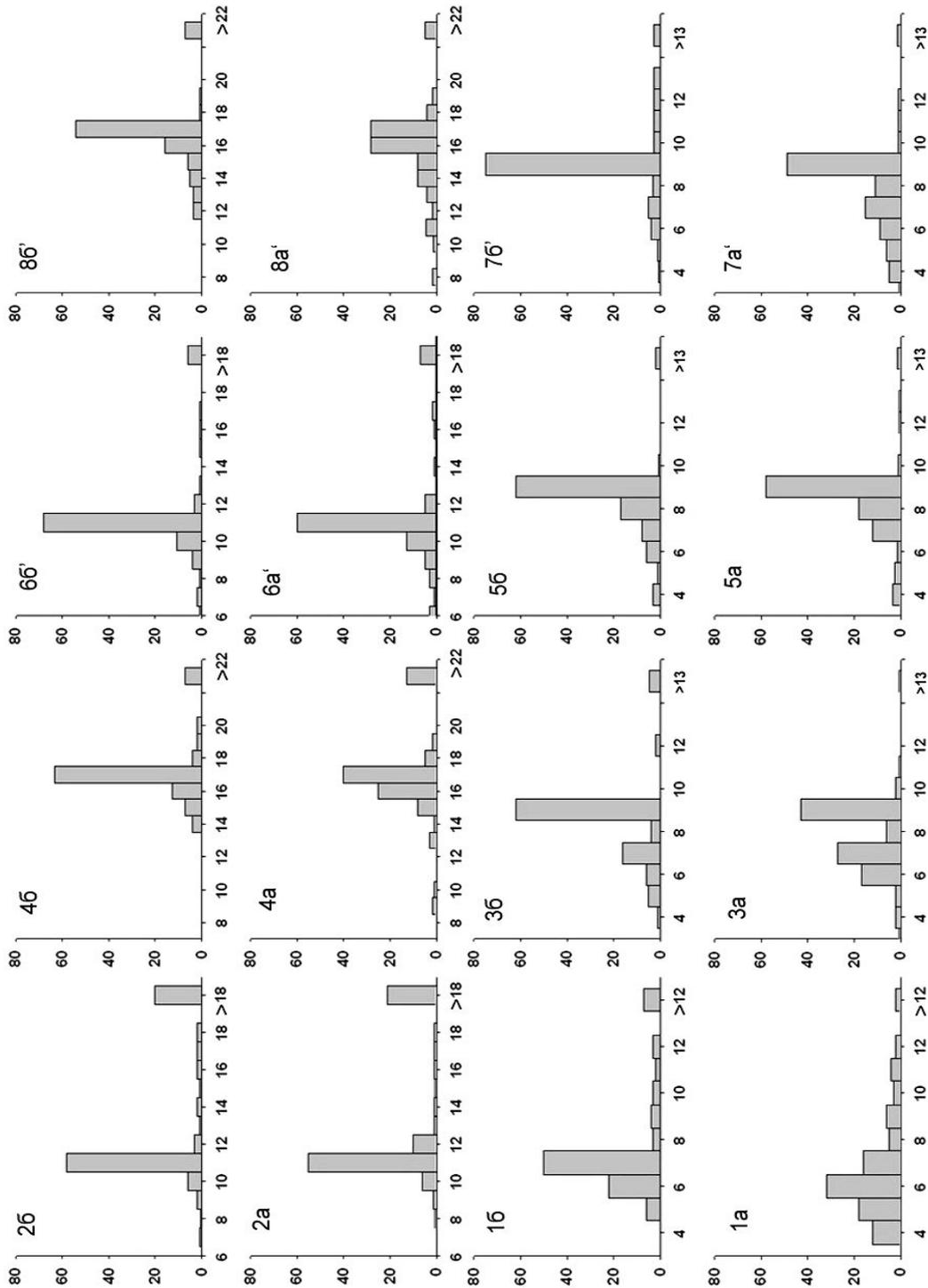
В связи с тем, что как между опытными, так и между контрольными вариантами достоверных различий не обнаружено, на рисунке приведены обобщенные данные по всем вариантам, полученным при анализе количественной кариотипической изменчивости.

Исследование количественной кариотипической изменчивости в фибробластоподобных клеточных линиях М и МТ и в эпителиоподобной линии NBL-3-17 при культивировании на ламинине 2/4 в течение 2 – 14 сут показало, что имеют место достоверные изменения в распределении клеток по числу хромосом по сравнению с контрольными вариантами. Оценка по критерию χ^2 показала, что вероятность нулевой гипотезы $P < 0.01$.

Изменение характера распределения клеток по числу хромосом происходит за счет значительного снижения количества клеток с модальным числом хромосом и увеличения с меньшими числами хромосом. При этом в линии М происходит уменьшение на единицу модального числа хромосом с 7 в контроле до 6 в опыте. Тогда как в линии МТ и NBL-3-17 снижается только количество клеток с модальным числом, равным 9 и 17, соответственно. Наблюдается увеличение гетерогенности клеточных популяций за счет увеличения количества новых типов дополнительных СВК, в основном, за счет появления клеток с малыми числами хромосом. Культивирование клеток линий МТ и NBL-3-17 на фибронектине в

тех же условиях приводит к аналогичным изменениям в характере количественной кариотипической изменчивости. Таким образом, из этих результатов можно сделать вывод, что происхождение клеток (эпителиоподобное или фибробластоподобное) не имеет значения для данной формы кариотипической изменчивости. По-видимому, полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения о запуске метаболических процессов, нарушающих сегрегацию хромосом и способствующих образованию новой адаптивной сбалансированной кариотипической структуры. Ряд данных по исследованию функционального состояния микротрубочек косвенно свидетельствует о возможной связи между взаимодействием белков внеклеточного матрикса с рецепторами и стабильностью кариотипической структуры (36–39). Известно несколько способов адаптации клеточных линий к условиям *in vitro* и к условиям, изменяющимся в процессе культивирования. Для «безмаркерных» клеточных линий способы состоят в следующем: - стабилизация определенной цитогенетической структуры в популяции (СВК) и образование дицентриков (теломерных ассоциаций). Перечисленные способы могут быть как взаимодополняющими, так и взаимозаменяемыми на разных стадиях существования клеточной популяции.

В результате, за счет генетических и эпигенетических изменений, образуется сбалансированная кариотипическая структура (4, 6). Подтверждением вывода об отсутствии зависимости между характером количественной кариотипической изменчивости и происхождением клеток являются полученные исключения. Именно, анализ распределения клеток по числу хромосом и СВК показал, что культивирование клеток линий разного происхождения: NBL-3-11 на ламинине и фибронектине и кариотипического варианта МТ^д на ламинине в тех же условиях не приводит к изменению количественных характеристик по сравнению с контролем. Известно, что кариотипическая структура разных клеточных линий различается по своей устойчивости к одним и тем же воздействиям (40). В данном случае в линии NBL-3-11 устойчивость количественных характеристик, по-видимому, обусловлена крайне редким явлением – моносомией по аутосоме. В варианте МТ^д кариотипическая структура отличается от других анализируемых линий фибробластов кожи индийского мунджака большим количеством дицентриков (теломерных ассоциаций), превышающих в 7 раз контрольный уровень. Такие дицентрики являются для «безмаркерных» линий способом адаптации к измененным условиям культивирования и в данном случае заменяют другой способ адаптации – анеуплоидию.



Распределение по числу хромосом клеток разных линий при культивировании на ламинине и фибронектине. По горизонтали – число хромосом в клетке, по вертикале – частота встречаемости клеток, %. 1 – линия М; 2 – линия NBL-3-11; 3 – линия МТ; 4 – линия NBL-3-17; 5 – кариотипический вариант МТд; 6 – линия NBL-3-11; 7 – линия МТ; 8 – линия NBL-3-17. а – клетки культивировали на ламинине; а' – клетки культивировали на фибронектине; б и б' – контроли, соответствующие вариантам а и а'.

Количественная и структурная кариотипическая изменчивость взаимосвязаны между собой, являясь составляющими одного процесса – адаптации клеточных популяций к условиям *in vitro*. Основываясь на целостности процесса адаптации клеточных культур *in vitro*, параллельно с исследованием количественной изменчивости, был проведен анализ структурной изменчивости. Обобщенные данные представлены в табл.2.

При культивировании фибробластоподобных линий М и МТ на ламинине частота хромосомных aberrаций не изменяется по сравнению с контролем. Тогда как культивирование клеток линии МТ в течение 3 и 4 сут на фибронектине приводит к достоверному ($P < 0.01$) увеличению частоты хромосомных aberrаций только за счет значительного увеличения частоты дицентриков. Через 8 сут уровень дицентриков приближается к контролю. Противоположный результат имеет место при культивировании эпителиоподобных линий NBL-3-11 и NBL-3-17 на ламинине. Именно, наблюдается достоверное увеличение частоты хромосомных aberrаций, включая дицентрики ($P < 0.01$). Напротив, при культивировании на фибронектине линии NBL-3-17 частота хромосомных aberrаций не изменяется по сравнению с контролем.

Таблица 2. Влияние белков ВКМ на частоту хромосомных aberrаций в «безмаркерных» клеточных линиях

Вариант опыта	Клеточная культура	Число проанализированных клеток	Частота хромосомных aberrаций всех типов $\bar{x} \pm s_x$, %	Частота дицентриков без двойных фрагментов, $\bar{x} \pm s_x$, %
Лам	М	150	12.0 \pm 2.6	6.7 \pm 2.0
К		425	8.2 \pm 1.3	4.4 \pm 1.0
Лам	МТ	455	3.9 \pm 0.9	1.8 \pm 0.6
К		1050	3.0 \pm 0.5	2.0 \pm 0.4
Лам	МТ ^а	200	23.8 \pm 3.0	15.4 \pm 2.6
К		280	19.1 \pm 2.3	14.1 \pm 2.1
Лам ¹	NBL-3-11	160	34.4 \pm 3.8 ^а	29.4 \pm 3.6 ^а
К ¹		190	21.6 \pm 3.0	15.3 \pm 2.6
Лам	NBL-3-17	465	51.3 \pm 2.3 ^а	5.8 \pm 1.1 ^а
К		670	29.6 \pm 1.8	1.8 \pm 0.5
Лам	NBL-3-17	733	60.0 \pm 1.7 ^а	17.2 \pm 1.4 ^а
К		831	38.5 \pm 1.7	10.0 \pm 1.0
ФН	МТ	480	12.9 \pm 1.5 ^а	5.9 \pm 1.1 ^а
К		425	3.3 \pm 0.9	1.1 \pm 0.5
ФН ²	NBL-3-11	275	9.1 \pm 1.7	3.6 \pm 1.1
К ²		410	4.9 \pm 1.1	1.6 \pm 0.6
ФН	NBL-3-11	575	46.8 \pm 2.0 ^а	5.0 \pm 0.9 ^а
К		1020	31.2 \pm 1.4	1.8 \pm 0.4
ФН	NBL-3-17	760	26.8 \pm 1.6	7.5 \pm 0.9
К		1100	20.6 \pm 1.2	4.8 \pm 0.6

Примечание: ^а Достоверно отличается от значений в контролях ($P < 0,01$); К – объединенные контрольные варианты; ¹ культивирование на ламинине 3 сут; ² культивирование на фибронектине 8 сут.

Таким образом, характер структурной кариотипической изменчивости зависит от происхождения клеточной линии. Объяснить это можно следующим образом. Эпителиоподобные клетки преимущественно секретируют ламинин, фибробластоподобные – фибронектин. В связи с этим при посеве клеток на искусственный ламинин или фибронектин специфические клеточные рецепторы связываются с соответствующим белком, а секретируемый самими клетками тот же белок не имеет возможности связаться со своими рецепторами, и, таким образом, могут возникнуть изменения в клеточном метаболизме, индуцирующие в конечном счете структурную нестабильность хромосом. Тем не менее, конкретная структура кариотипа вносит свои коррективы в характер кариотипической изменчивости, и от нее зависит способ адаптации клеточной культуры к определенному субстрату (40). В частности, при культивировании клеток гиподиплоидной линии NBL-3-11 как на ламинине, так и на фибронектине, в отличие от гипотриплоидной линии NBL-3-17, отсутствует способ адаптации, выражающийся в анеуплоидии, но появляется другой способ, выражающийся в достоверном увеличении структурных хромосомных изменений, в частности, дицентриков ($P < 0.01$). В кариотипическом варианте МТ^д, в отличие от линий М и МТ, через 3 сут культивирования на ламинине наблюдается достоверное увеличение частоты дицентриков по сравнению с контролем ($P < 0.01$) при отсутствии изменений в количественной кариотипической изменчивости.

Представленные обобщенные результаты по исследованию влияния иммобилизованных белков ВКМ на характер кариотипической изменчивости в «безмаркерных» клеточных линиях подтвердили наличие характерных черт дицентриков (теломерных ассоциаций), подробно рассмотренных в предыдущих работах, а также наличие 2-х способов адаптации – анеуплоидии и образования дицентриков, которые могут быть как взаимодополняющими, так и взаимозаменяемыми. В результате адаптации к измененным условиям существования устанавливается сбалансированная кариотипическая структура, обеспечивающая оптимальный генный баланс в клеточной популяции, как целостной системе (4,6,40). В заключение следует отметить, что проведенный впервые анализ влияния иммобилизованных белков ВКМ на характер кариотипической изменчивости в «безмаркерных» клеточных линиях существенно расширил представления о важности этих белков для жизнедеятельности клеток и клеточной популяции в целом. Ибо изменения кариотипической структуры неразрывно связаны с нарушением функционирования генов, что ведет к изменению других клеточных свойств.

Список литературы

1. Hooper M.L., Subak-Sharpe J.H. Metabolic cooperation between cells. *Int. Rev. Cytol.*, 1981, 69: 45 – 104.
2. Шаровская Ю.Ю., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Чайлахян Л.М. Исследование диффузионной связи через щелевые контакты в эмбриональных стволовых клетках человека в процессе спонтанной дифференцировки. *ДАН*, 2009, 427: 407 – 410.
3. Мамаева С.Е. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. *Цитология*, 1996, 38: 787 – 814.
4. Полянская Г.Г., Вахтин Ю.Б. The karyotypic structure of cell populations in vitro as integral system. 2003, *Цитология*, 2003, 45: 115 – 131.
5. Полянская Г.Г., Абрамян Д.С., Глебов О.К. Кариотипическая структура клоновых популяций клеток китайского хомячка при длительном культивировании. *Цитология*, 1981, 23, 7: 818 – 830.
6. Полянская Г.Г. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях. *Успехи совр. биол.* 2000, 120: 529 – 539.
7. Nielsen K. The chromosomes of an in vitro derivative of an Ehrlich ascites tumor of the mouse during its adaptation from monolayer to suspension culture. *Hereditas*, 1972, 70: 217 – 224.
8. Семенова Е. Г., Хоменко А. В., Мамаева С. Е. Изменение продолжительности клеточного цикла и кариотипа клеток L мыши при смене способа культивирования. *Цитология*, 1984, 26: 1156 – 1160.
9. Литвинчук Л. Ф., Мамаева С. Е., Ковтунович И. Г., Пинаев Г. П. Кариотип постоянных клеточных линий. Изменчивость кариотипа M HeLa при статическом и роллерном способах культивирования. *Цитология*, 1986, 28: 56 – 61.
10. Царева А.А., Исаенко А.А., Урманова М.А., Юрченко М.Д., Балзовская Е.Г., Родионова М.О. Исследование кариотипа клеток линии Vero, длительно культивируемых в монослое статическим и роллерным способами. *Цитология*, 1990, 32: 741 – 747.
11. Amadori M., Berneri C. Genotypic and phenotypic changes of BHK-21 cells grown in suspension cultures. *Cytotechnology*, 1993, 11, 1: 106 – 108.
12. Basson M.D., Turowski G., Emenaker N.J. Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Exp. Cell Res.* 1996, 225: 301 – 305.
13. Are A., Pinaev G., Burova E., Lindberg U. Attachment of A431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. *Cell Motility and Cytoskeleton*. 2001, 48: 24 – 36.
14. Xu C., Inokuma M.S., Denham J., Golds K., Kundu P., Gold J.D., Carpenter M.K. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 2001, 19: 971 – 974.
15. Mostafavi-Pour Z., Askari J A., Parkinson S.J., Parker P.J., Ng T.T.C. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J. Cell Biol.* 2003, 161: 155 – 167.
16. Ahmed N., Riley C., Rice G., Quinn M. Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. *Clin. Exp. Metastasis*. 2005, 22: 391 – 402.
17. Klimanskaya I., Chung Y., Meisner L., Johnson J., West M.D., Lanza R. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet*. 2005, 365: 1636 – 1641.
18. Maniotis A.J., Valyi-Nagy K., Karavitis J., Moses J., Boddipali V., Wang Y., Nunez R., Setty S., Arbieva Z., Bissell M., Forberg R. Chromatin organization measured by AluI restriction

enzyme changes with malignancy and is regulated by the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Am.J. Pathol.* 2005, 166: 1187 – 1203.

19. **Kato K., Shiga K., Yamaguchi K., Hata K., Kobayashi T., Miyazaki K., Saijo S., Miyagi T.** Plasma-membrane-associated sialidase (NEU3) differentially regulates integrin mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin-derived signaling. 2006, *Biochem. J.* 2006, 394 (Pt 3): 647 – 656.

20. **Koenig A., Mueller C., Hasel C., Adler G., Menke A.** Collagen Type 1 induces disruption of E-Cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 2006, 66: 4662 – 4671.

21. **Ma H.J., Zhu W., Wang D.G., Yue X.Z., Li C.R.** Endothelin-1 combined with extracellular matrix proteins promotes the adhesion and chemotaxis of amelanotic melanocytes from human hair follicles in vitro. 2006, 30: 999 – 1006.

22. **Wang J., Milner R.** Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins via MAP kinase signaling. *J. Neurochem.* 2006, 96: 148 – 159.

23. **Belkin V.M., Kukhareno V.I., Volodarskaia S.M., Grinberg K.N., Mazurov V.I.** Changes in fibronectin biosynthesis in human embryonal fibroblasts with trisomy for chromosomes 7 and 9. *Vopr. Med. Khim.* 1985, 31: 125 – 130.

24. **Risteli L., van Koskull H., Autio-Harmanen H., Risteli J.** Amniotic fluid laminin and type IV collagen in normal and pathological pregnancies. *Clin.Chim. Acta.* 1985, 147: 283 – 290.

25. **Delvig A.A., Kukhareno V.I., Belkin V.M., Mazurov V.I., Grinberg K.N., Debov S.S.** Collagen and fibronectin synthesis by trisomic fibroblasts from human spontaneous abortuses. *Mol. Gen. Genet.* 1987, 209: 592 – 595.

26. **Brand-Saberi B., Epperlein H.H., Ramonos G.E., Christ B.** Distribution of extracellular matrix components in nuchal skin from fetuses carrying trisomy 18 and trisomy 21. *Cell Tissue Res.* 1994, 277: 465 – 475.

27. **Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева И.В., Пинаев Г.П.** Анализ морфологических особенностей популяции клеток эпидермоидной карциномы A431, распластанных на иммобилизованных лигандах. *Цитология.* 2004, 46: 5 – 15.

28. **Домнина Л.В., Любимов А.В.** Выделение и характеристика внеклеточного матрикса культивируемых клеток. *Цитология.* 1988, 30: 299 – 303.

29. **Полянская Г.Г., Горячая Т.С., Пинаев Г.П.** Влияние ламинина на кариотипическую изменчивость в клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака. *Цитология,* 2002, 44: 491 – 498.

30. **Полянская Г.Г., Горячая Т.С., Пинаев Г.П.** Влияние ламинина на структурную кариотипическую изменчивость в клеточных линиях почки кенгуровой крысы. *Цитология,* 2003 а, 45: 1048 – 1053.

31. **Полянская Г.Г., Горячая Т.С., Пинаев Г.П.** Влияние ламинина на количественную кариотипическую изменчивость в клеточных линиях почки кенгуровой крысы. *Цитология,* 2003 б, 45 10: 1038 – 1047.

32. **Полянская Г.Г., Горячая Т.С., Пинаев Г.П.** Влияние иммортализованного фибронектина на кариотипическую изменчивость в клеточной сублинии фибробластов кожи индийского мунтжака. *Цитология,* 2005, 47: 925 – 932.

33. **Полянская Г.Г., Горячая Т.С., Пинаев Г.П.** Влияние иммортализованного фибронектина на кариотипическую изменчивость в клеточных линиях почки кенгуровой крысы. *Цитология,* 2007, 49: 219 – 228.

34. **Полянская Г.Г., Горячая Т.С., Пинаев Г.П.** Влияние иммортализованного ламинина на кариотипическую изменчивость в двух кариотипически различных вариантах клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 2008, 50: 988 – 998.
35. **Полянская Г.Г.** Кариотипическая характеристика клеточных сублиний почки кенгуровой крысы и фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 1988, 30 (6): 732 - 738.
36. **Домнина Л.В., Иванова О.Ю., Васильев Ю.М.** Влияние микротрубочек на морфологию монослоя фибробластов и его внеклеточный матрикс. Цитология. 1996, 38, 3: 300 – 304.
37. **Zhou B., Rabinovitch M.** Microtubule involvement in translational regulation of fibronectin expression by light chain 3 of microtubule-associated protein 1 in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 1998, 83: 481 – 489.
38. **Putnam A.J., Schultz K., Mooney D.J.** Control of microtubule assembly by extracellular matrix and externally applied strain. *Am. J. Physiol.* 2001, 280, 3: 556 – 564.
39. **Peng H., Shah W., Holland P, Carbonetto S.** Integrins and dystroglycan regulate astrocyte wound healing: the integrin beta1 subunit is necessary for process extension and orienting the microtubular network. *Dev.Neurobiol.* 2008, 68: 559 – 574.
40. **Полянская Г.Г.** Кариотипическая изменчивость в клеточных линиях и структура кариотипа. Клеточные культуры (информ. бюллетень), СПб, Изд-во Политехн. ун-та, вып. 24, 2009: 15 – 24.

ПРОДУКЦИЯ IgM И J ЦЕПИ

В-ЛИМФОБЛАСТОИДНЫМИ КЛЕТОЧНЫМИ ЛИНИЯМИ

М.П. Самойлович, А.А. Пиневич, Н.Л. Вартамян, В.Б. Климович

Российский научный центр радиологии и хирургических технологий,
Санкт-Петербург; mpsamoylovich@gmail.com

Характерной чертой В-лимфобластоидных клеточных линий является продукция связанных с мембраной или секретируемых иммуноглобулинов (Ig). Многие линии секретируют молекулы IgM, в состав которых обычно входит полипептид – J цепь. В клетках J цепь участвует в сборке пентамерных молекул IgM, при отсутствии или недостаточной экспрессии J цепи клетки синтезируют гексамеры. Гексамерные молекулы IgM, в отличие от пентамерных, не способны связываться с рецептором полимерных иммуноглобулинов (pIgR) эпителиальных клеток и формировать секреторный IgM. Обнаружение J цепи в цитоплазме или в среде культивирования позволяет судить о том, какой из вариантов полимерных молекул IgM синтезируют клетки. Задача работы состояла в изучении продукции IgM и J цепи клетками линий Namalva, NC-37, RPMI 1788 и Raji, представленных в Российской коллекции клеточных культур позвоночных. В исследовании использованы методы иммуноферментного анализа (ИФА) и проточной цитофлуориметрии, разработанные на основе созданных в лаборатории моноклональных антител против мю-цепей и против J цепи. В культурах линии RPMI 1788 обнаружена широкая вариабельность содержания внутриклеточного IgM, при этом менее одной трети клеток экспрессирует J цепь. В среде культивирования линии RPMI 1788 выявлена высокая концентрация IgM, большая часть которого не имеет J цепи. Клеточные популяции Namalva и NC-37 однородны по содержанию как IgM, так и J цепи. Для этих линий характерен низкий уровень секреции IgM. В среде культивирования клеток Namalva и NC-37 доминируют молекулы IgM, содержащие J цепь. Клетки линии Raji экспрессируют J цепь, но не секретируют IgM в среду культивирования. Полученные данные позволяют заключить, что линии Namalva и NC-37 синтезируют пентамеры IgM, а линия RPMI 1788 гетерогенна и является продуцентом преимущественно гексамерной формы IgM.

Ключевые слова: IgM, J цепь, Namalva, NC-37, RPMI 1788, Raji

Характерной чертой клеток В-лимфобластоидных линий является продукция секретируемых в среду или связанных с мембраной иммуноглобулинов (Ig). Клетки многих

линий секретируют молекулы IgM, в состав которых наряду с тяжелыми и легкими цепями входит J-цепь [1, 2]. Этот полипептид обеспечивает сборку пентамерных молекул IgM, их взаимодействие с pIgR, образование секреторного IgM и транспорт его через эпителий слизистых оболочек [3, 4, 5]. При отсутствии или недостаточной экспрессии J цепи в клетках происходит сборка гексамерных молекул IgM [6, 7]. Гексамеры не взаимодействуют с pIgR, не образуют секреторной формы IgM и не транспортируются на поверхность слизистых. Они активируют комплемент в 10–20 раз эффективнее, чем пентамерные молекулы [8]. Обнаружение J цепи в среде культивирования или в цитоплазме позволяет судить о том, какой из вариантов полимерных молекул синтезируют клетки. Сведения о продукции IgM лимфобластоидными линиями были получены с помощью реагентов и методов разной степени специфичности и чувствительности, а потому требуют уточнения и дополнения. Кроме того, эти данные относятся к оригинальным штаммам, которые в ходе длительного культивирования претерпели эволюцию и дали начало сублиниям, охарактеризованным недостаточно полно [9, 10, 11].

Задача работы состояла в исследовании продукции IgM и J цепи клетками В-лимфобластоидных линий, находящихся в фондах Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Материал и методы

Клеточные линии Namalva, NC-37, RPMI 1788 и Raji, полученные из указанной выше коллекции, культивировали в 12-луночных планшетах при +37°C в газовой среде с 5% CO₂. Использовали среду RPMI1640 без антибиотиков с добавлением 5% сыворотки крови плода коровы. Клетки рассеивали дважды в неделю. На 3 сутки после посева культур клеточные суспензии собирали, с помощью счетчика частиц Coulter Z1 (Beckman Coulter) определяли содержание клеток и затем осаждали центрифугированием 5 мин при 180g. Среду, полученную после отделения клеток, замораживали при –20°C. Осадок клеток дважды отмывали в ФСР, замораживали и хранили при –20°C. Лизаты клеток готовили инкубацией размороженных проб в 0,1% растворе тритона X100 на льду в течение 5 мин, затем центрифугировали 5 мин при 200g.

Для выявления IgM и J цепи в клетках и определения концентраций их в среде использовали полученные в лаборатории моноклональные антитела (МкАт) против мю- и J

цепей Ig человека [12, 13]. Конъюгаты МкАт с пероксидазой и с ФИТЦ синтезировали в соответствии с описанными протоколами [14, 15].

Концентрацию IgM определяли с помощью разработанного в лаборатории метода двухцентрового ИФА, основанного на применении МкАт против мю-цепей [12]. Для связывания антигена на твердой фазе и для детекции его использовали адсорбированные и меченые МкАт одной и той же эпитопной специфичности, что позволяло избирательно выявлять полимерные молекулы IgM. При оценке количества секретируемого в среду IgM значения концентраций пересчитывали на 1000 клеток исходной суспензии.

Концентрацию J цепи определяли, используя двухцентровый ИФА, разработанный на основе МкАт против различных эпитопов молекулы J цепи [13]. Антигенные детерминанты J цепи, связанной с полимерным IgM, недоступны для распознавания антителами, поэтому J цепь высвобождали из молекулярного комплекса путем восстановления дисульфидных связей кипячением в течение 7 мин в 0,75% растворе 2-меркаптоэтанола и последующего алкилирования иодацетамидом [16].

Однородность клеточных популяций по содержанию IgM и J цепи оценивали с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Клетки отмывали от культуральной среды как указано выше, ресуспендировали в охлажденном до -20°C 70% этаноле и хранили при той же температуре. Пробы, содержащие 1×10^6 клеток, отмывали центрифугированием при 200g 10 мин в буфере для окраски, содержащем ФСП, сыворотку плодов коровы (3%) и азид натрия (0,1%). Далее клетки помещали в Permeabilizing Solution 2 (BD Biosciences, США) на 15 мин, затем отмывали центрифугированием (250g, 8 мин) в буфере для окраски, инкубировали 30 мин с МкАт, меченными ФИТЦ, вновь отмывали и ресуспендировали в буфере Flowsheath Fluid. Флуоресценцию регистрировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, США) с фильтром 530/30 нм. Исходя из распределения клеток по прямому и боковому светорассеянию, выделяли логический гейт. В каждой пробе анализировали 10000 событий в гейте. Для сбора и анализа данных использовали программное обеспечение CellQuest Pro (BD Biosciences, США).

Результаты

Наиболее высокие концентрации IgM были обнаружены в среде культивирования линии RPMI 1788 (рис. 1). В культурах клеток Namalva и NC-37 содержание секретируемого IgM было в 10–30 раз ниже. В среде линии Raji концентрация IgM была близка к порогу чувствительности метода.

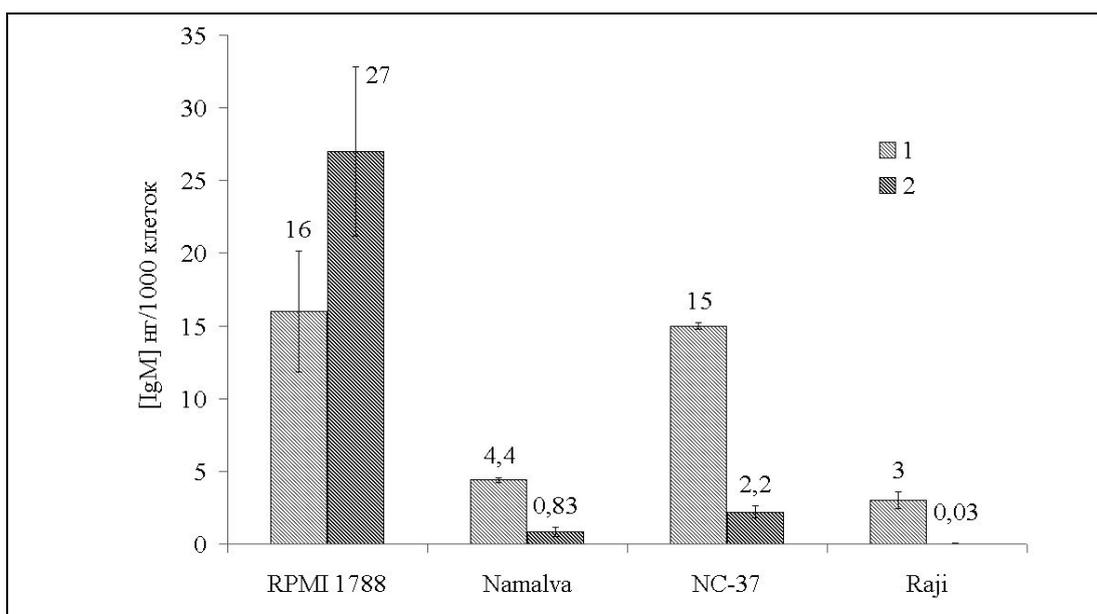


Рис. 1. Содержание секретируемого в культуральную среду (1) и внутриклеточного полимерного IgM (2) по результатам определения с помощью метода двухцентрового ИФА (пересчитано на 1000 клеток). Указаны значения средних арифметических и стандартные ошибки. По оси абсцисс – названия клеточных линий.

Выявление внутриклеточного IgM при анализе клеточных лизатов позволило получить данные о средней продуктивности клеток каждой из линий. По уровню цитоплазматического IgM клетки линии NC-37 не отличались от линии RPMI 1788, тогда как в клетках линий Namalva и Raji определялось в 3–5 раз меньше IgM (рис. 1). Таким образом, исследованные клеточные линии различаются принципиально по уровню IgM, секретируемого в среду культивирования, и значительно меньше отличаются по внутриклеточному содержанию этого Ig.

Оценка уровня IgM в клетках с помощью метода проточной цитофлуориметрии показала, что распределение сигналов от клеток линий NC-37 и Namalva близко к нормальному (рис. 2). Линия RPMI 1788 отличалась широкой вариабельностью значений флуоресцентных сигналов. Доля клеток с наиболее высоким содержанием IgM составляла около 10% общей численности. В популяции линии Raji отчетливо выделялись две фракции клеток – одна с низким, а вторая со средним уровнем IgM.

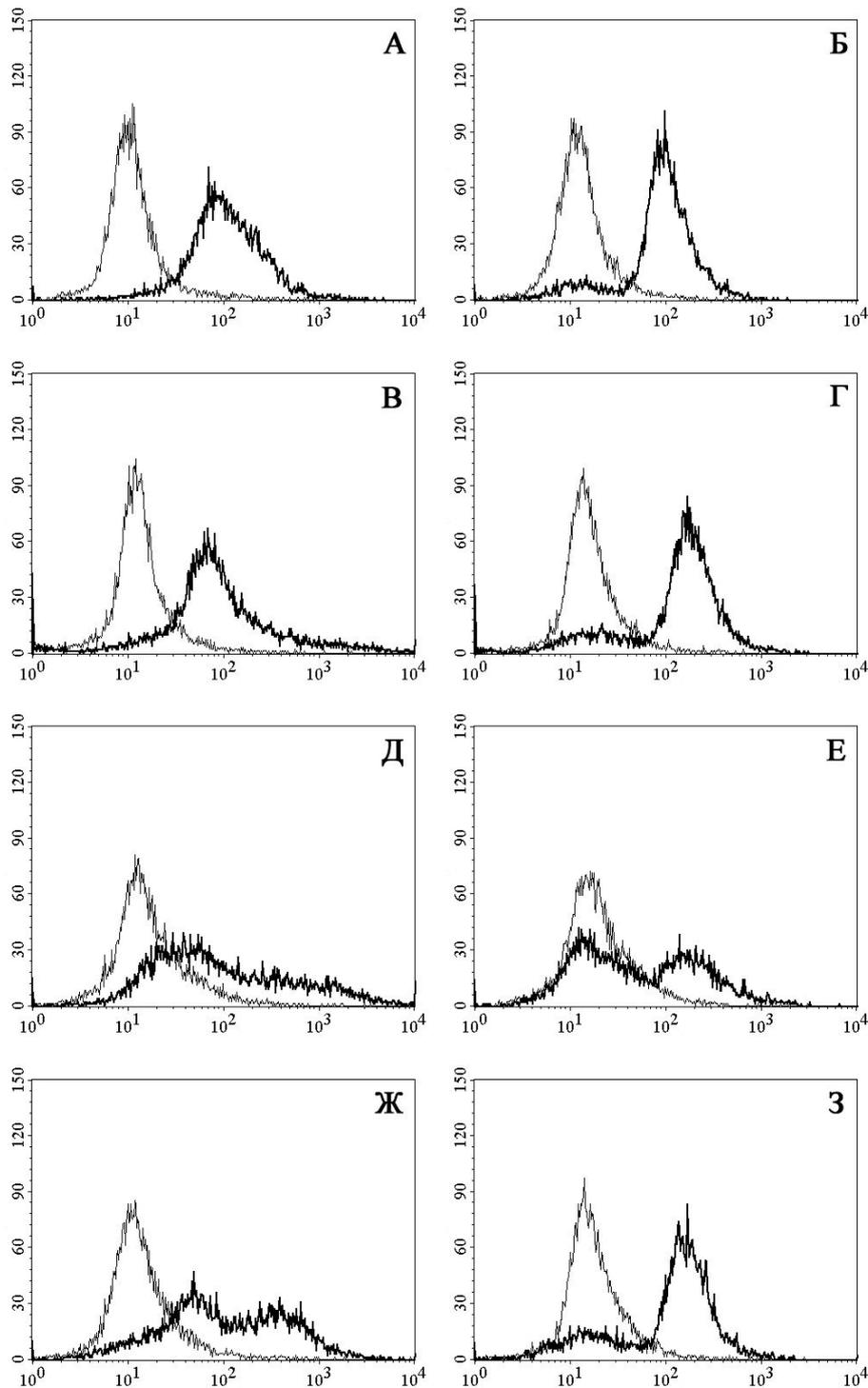


Рис. 2. Содержание IgM (А, В, Д, Ж) и J цепи (Б, Г, Е, З) в клетках линий Namalva (А, Б), NC-37 (В, Г), RPMI 1788 (Д, Е) и Raji (Ж, З), исследованное с помощью проточной цитофлуориметрии. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – число клеток. Жирная линия – опыт, тонкая линия – изотипический контроль.

Цитофлуориметрическое исследование с помощью МкАт против J цепи выявило гомогенность клеточного состава линий NC-37, Namalva и Raji. Модальное значение сигнала флуоресценции, и, соответственно, содержания антигена, было наиболее высоким в популяции клеток NC-37. При исследовании линии RPMI 1788 значимый сигнал детектировался только в небольшой части популяции.

С помощью метода двухцентрового ИФА было определено содержание J цепи в среде культивирования двух линий – RPMI 1788 и Namalva, оппозитных по уровню секреции IgM (таблица). Концентрация J цепи в среде культивирования клеток RPMI 1788 и Namalva была одинаковой.

Таблица. Концентрации J-цепи и IgM в культуральных жидкостях в пересчете на 1000 клеток и их процентное соотношение.

Клеточные линии	[IgM], пг/1000 клеток	[J-цепь], пг/1000 клеток	J/IgM, %
RPMI1788	27 000	11,2	0,04%
Namalva	830	9,9	1,2%

Для оценки степени полимерности секретируемых клетками продуктов было вычислено соотношение концентраций IgM и J цепи. Поскольку молекулярные массы IgM и J цепи составляют 970 КДа и 15 КДа соответственно, массовая доля J цепи в пентамерах близка к 1,5%. Оценивая отношение весовых количеств J цепи и IgM в образце, можно судить о наличии в нем пентамерных и гексамерных молекул IgM. В культуральной среде линии Namalva это отношение было близко к показателю, характерному для пентамерных молекул, тогда как в среде линии RPMI 1788 это соотношение было в 30 раз меньше, что указывает на преимущественную продукцию клетками RPMI 1788 молекул IgM, не содержащих J цепь, т.е. гексамеров.

Обсуждение

В Российской коллекции клеточных культур представлены лимфобластоидные линии Namalva и RPMI 1788, которые известны как продуценты IgM, а также линия Raji, которая синтезирует IgM, но не секретирует его. Сведения о синтезе Ig клетками NC-37 в доступной литературе не обнаружены. В настоящей работе получены количественные данные о внутриклеточном содержании и секреции полимерных форм IgM клетками перечисленных

линий. Данные легко воспроизводимы, поскольку получены с помощью современных методов, основанных на применении МкАт.

Для определения концентраций внутриклеточного и секретируемого IgM была использована система ИФА на основе МкАт, которая позволяла исключать из пула определяемых мономерные молекулы IgM. С помощью проточной цитофлуориметрии оценена гетерогенность клеточных популяций по суммарному содержанию IgM, включая цитоплазматические и мембранно-связанные формы. Результаты исследования показали, что линия RPMI 1788 отличается от трех остальных высоким уровнем секреции IgM. Среди многочисленных производных сублиний Namalva описаны штаммы, не синтезирующие IgM, а также штаммы, обладающие разным уровнем продукции и секреции этого Ig [9, 10]. Полученные данные указывают на принадлежность изученной популяции к варианту со сравнительно высоким уровнем секреции IgM. Сведения о синтезе IgM клетками NC-37 приведены впервые.

Опубликованные данные о продукции J цепи клетками линий Namalva, RPMI 1788 и Raji носят качественный характер [17], а сведения о линии NC-37 отсутствуют.

В настоящей работе впервые для изучения коллекционных клеточных линий были использованы методы, основанные на применении МкАт против J цепи человека. Применение проточной цитофлуориметрии позволило оценить степень однородности популяций клеток, синтезирующих J цепь. Впервые разработанная иммунометрическая система определения J цепи, имеющая порог детекции 10 пг/мл, позволила обнаруживать антиген в клетках с низким уровнем синтеза. Поскольку каждая пентамерная молекула IgM содержит одну молекулу J цепи, а гексамерные молекулы не несут J цепь, соотношение весовых количеств IgM и J цепи позволяет выявить преобладание пентамерных или гексамерных форм среди секретируемых молекул IgM. Проведенный расчет показал, что среди молекул IgM, синтезируемых клетками Namalva и NC-37 доминируют пентамеры, тогда как в продуктах секреции клеток RPMI 1788 преобладают полимерные формы, лишенные J цепи, которые, по всей видимости, являются гексамерами.

Многие аспекты структуры и функционирования в организме антител класса IgM изучены недостаточно. Например, лишь недавно предложена новая пространственная модель пентамера IgM, которая постулирует не планарную, а грибовидную форму этой молекулы [18]. Не ясно, синтезируются ли гексамеры IgM в нормальном организме и выполняют ли они какую-либо физиологическую функцию. До недавнего времени не были известны Fc-

рецепторы, которые, подобно рецепторам других Ig [19, 20] обеспечивают взаимодействие IgM с клетками иммунной системы. В последние годы описаны два рецептора, один из которых связывает IgM и IgA (Fc μ R), а другой – только IgM (Fc μ). Первый экспрессирован преимущественно на фолликулярных дендритных клетках и В-клетках маргинальной зоны лимфатических узлов, второй представлен на Т- и В- лимфоцитах [21, 22]. Из этого следует, что участие IgM в целом ряде иммунологических процессов обеспечивается механизмами, которые еще предстоит изучить. Показано также, что представления о преходящем характере продукции IgM при иммунном ответе и об отсутствии IgM-памяти подлежат ревизии [23, 24]. Наконец, получены данные об участии естественных IgM-антител в поддержании иммунологической толерантности [25, 26] и в реализации некоторых форм противоопухолевого иммунитета [27].

Перечисленные сведения позволяют ожидать развития исследований механизмов продукции и функционирования IgM. Постоянные клеточные линии, продуцирующие молекулы IgM, могут служить объектами исследований в этой области, а в перспективе – основой создания линий-продуцентов препаратов IgM с полезными свойствами. Преимущество линий, изученных в настоящей работе, состоит еще и в том, что они детально охарактеризованы кариотипически [28] и, судя по имеющимся данным, не контаминированы клетками посторонних штаммов.

Авторы выражают благодарность за помощь в исследовании клеток на проточном цитофлуориметре Мамай И.Н. и Киселевой Л.Н., а также Смирновой Т.Д. за ценные советы и содействие в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 08-04-00513.

Список литературы

1. **Woof J.M., Mestecky J.** Mucosal immunoglobulins. *Immunol. Revs.* 2005, 206: 64–82.
2. **Koshland, M.E.** The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Ann. Rev. Immunol.* 1985, 3: 425–453.
3. **Morrison S.L., Koshland M.E.** Characterization of the J chain from polymeric immunoglobulins (IgA-IgM immunological specificity-primary structure). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972, 69: 124–128.
4. **Randall T.D., Brewer J.W., Corley R.B.** Direct evidence that J chain regulates the polymeric structure of IgM in antibody-secreting B cells. *J. Biol.Chem.* 1992, 267: 18002–18007.
5. **Климович В.Б., Самойлович М.П., Климович Б.В.** Проблема J-цепи иммуноглобулинов (обзор литературы). *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* 2008, 44: 131–143.

6. **Niles M.J., Matsuuch L., Koshland M.E.** Polymer IgM assembly and secretion in lymphoid and nonlymphoid cell lines: evidence that J chain is required for pentamer synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1995, 92: 2884–2888.

7. **Randall T.D., Parkhouse R.M.E., Corley R.B.** J chain synthesis and secretion of hexameric IgM is differentially regulated by lipopolysaccharide and interleukin 5. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1992, 89: 962–966.

8. **Braathen R., Hohman V.S., Brandzaeg P., Johansen F.E.** Secretory antibody formation: conserved binding interactions between J chain and polymeric Ig receptor from humans and amphibians. *J. Immunol.* 2007, 178: 1589–1597.

9. **Gui K., Middleton P. G., Docherty L. J. M., De Angeli C. L., Steel C.** MHC class II antigen and immunoglobulin expression in spontaneous phenotypic variants of the Burkitt's lymphoma cell line Namalwa. *Immunology.* 1986, 59: 603–610.

10. **Middleton P.G., Steel C.M.** Variant sublines of the human B-lymphoma cells Namalwa are at different stages of differentiation. *Immunology.* 1987, 61: 383–386.

11. **Dospkei C. L., Livingston G. K., Schumaran B. L., Srivastava A. K.** Structural and numerical chromosomal aberrations in a metabolically competent human lymphoblast cell line (MCL-5). *Mutagenesis.* 1998, 13: 275–280.

12. **Климович В.Б., Самойлович М.П., Крутецкая И.Ю., Грязева И.В., Шмидт Е.Н., Котова Т.С.** Получение и иммунохимическая характеристика моноклональных антител против IgM человека. *Биотехнология.* 1997, 4: 40–46.

13. **Самойлович М.П., Грязева И.В., Климович В.Б., Артемьева А.К., Писарева М.Н., Климович В.Б.** Моноклональные антитела против J-цепи полимерных иммуноглобулинов. *Российский иммунологический журнал.* 2008, 2(11): 398–404.

14. **Nakane P.K., Pierce G.B.** Enzyme-labelled antibodies. Preparation and application for localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 1966, 14: 929–931.

15. **Джонсон Дж.** Методы иммунофлуоресценции. В кн.: *Антитела.* М., Мир, 1991, 2: 268–300.

16. **Kobayashi K., Vaerman J. P., Bazin H., Le Bacq-Verheyden A. M., Heremans J. F.** Identification of J-chain in polymeric immunoglobulins from a variety of species by cross-reaction with rabbit antisera to human J-chain. *J. Immunol.* 1973, 111: 1590–1594.

17. **Benjamin D., Magrath I., Maguire R., Janus C., Todd H.D., Parsons R.G.** Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type. *J. Immunol.* 1982, 129: 1336–1342.

18. **Czajkowsky DM, Shao Z.** The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009, 106: 14960–14965.

19. **Nimmerjahn F., Ravetch J.V.** Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* 2007, 96: 179–204.

20. **Климович В.Б., Самойлович М.П.** Иммуноглобулин А (IgA) и его рецепторы (обзор литературы). *Медицинская иммунология.* 2006, 8: 483–500.

21. **Kikuno K., Kang D-W., Tahara K., Torii I., Kubagawa H.M., Ho K., Baudino L., Nishizaki N. Shibuya A., Kubagawa H.** Unusual biochemical features and follicular dendritic cell expression of human Fc α / μ receptor. *Eur. J. Immunol.* 2007, 37: 3540–3550.

22. **Kubagawa H., Oka S., Kubagawa Y., Torii I., Takayama E., Kang D-W., Gartland G.L., Bertoli L.F., Mori H., Takatsu H., Kitamura T., Ohno H., Wang J-Y.** Identity of the elusive IgM Fc receptor (Fc μ R) in humans. *J. Exp. Med.* 2009, 206: 2779–2793.

23. **Dogan I., Bertocci B., Vilmont V., Delbos F., Mégret J., Storck S., Reynaud C-A., Weill J-C.** Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature immunology*. 2009, 10: 1292–1300.
24. **Racine R., Winslow G.M.** IgM in microbial infections: Taken for granted? *Immunol. Letters*. 2009, 125: 79–85.
25. **Boes M.** Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* 2000, 37: 1141–1149.
26. **Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette B.C, Marshak-Rothstein A, Chen J.** Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000, 97: 1184–1189.
27. **Vollmers H., Brandlein S.** Natural antibodies and cancer. *New Biotechnology*. 2009, 25: 294–298.
28. **Мамаева С.Е.** Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М., Мир, 2002. 236 с.

ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ ПОСТОЯННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ІСО ЯИЧНИКОВ НЕПОЛОВОЗРЕЛОГО КАРПА, *CYPRINUS CARPIO*

Т.И. Щелкунова, И.С. Щелкунов

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии
и микробиологии Россельхозакадемии, г. Покров, Владимирская обл.,
shchelkun@yahoo.com

Приводятся данные о получении, морфологической и кариологической характеристиках, параметрах культивирования, видовой принадлежности, использовании для выявления вируснейтрализующих антител у рыб и спектра чувствительности к ихтиовирусам постоянной линии клеток ІСО яичников неполовозрелого карпа.

Ключевые слова: постоянная линия клеток, карп, характеристика

Развитие отечественной аквакультуры осложняется распространением имеющих и появлением новых вирусных болезней рыб. Установление этиологии, разработка методов их диагностики и профилактики невозможны без наличия культур клеток, чувствительных к широкому кругу вирусов.

Основным объектом выращивания в аквакультуре в России традиционно является карп. По нашим данным, за рубежом получено около 90 постоянных клеточных линий от 16 видов рыб семейства карповых (*Cyprinidae*). Первые линии клеток рыб этого семейства были получены

из хвостового стебля черного толстоголова, *Pimephales promelas*, (FHM) [1] и плавника золотой рыбки, *Carassius auratus*, (CAR) [2]. От карпа, *Cyprinus carpio*, получено 22 клеточные линии из 10 видов донорского материала. Чаще всего в качестве источника тканей использовали плавники. Из них получено 6 клеточных линий. Из жабр – три, по две из гонад, гипофиза, мозга, эмбрионов и мальков и по одной - из папилломы, лейкоцитов и хвостового стебля. Одной из наиболее популярных и широко используемых в мире клеточных линий рыб является линия клеток EPC, полученная из папилломы карпа [3].

Настоящая работа посвящена описанию первой отечественной постоянной линии клеток рыб, полученной из яичников неполовозрелого карпа, названной ICO (immature carp ovaries) и предназначенной для вирусологических исследований рыб.

Материал и методы

Культуры клеток. Чувствительность клеточной линии ICO к вирусам рыб определяли по сравнению с референсными линиями клеток, полученными из разных источников от зарубежных коллег: эпидермальных новообразований большого оспой карпа, *Cyprinus carpio* (EPC) [3]; хвостового стебля черного толстоголова, *Pimephales promelas* (FHM) [1]; хвостового стебля синезаберного солнечника, *Lepomis macrochirus* (BF-2) [4]; сердца кеты, *Oncorhynchus keta* (СНН-1) [5]; кожи белого осетра, *Acipenser transmontanus* (WSSK-1) [6]. Клетки выращивали в питательной среде Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (Игла 2MEM) и 10% фетальной сыворотки КРС при температуре 25°C (EPC, FHM, BF-2), 21,5°C (WSSK-1) и 19°C (СНН-1).

В качестве доноров ткани яичников для получения первичной культуры клеток ICO использовали четырехгодовалых самок карпа с гонадами второй стадии зрелости по шкале Киселевича [13].

Вирусы. Чувствительность референсных клеточных линий и линии ICO определяли к следующим вирусам: SVCV - вирус весенней виремии карпа, штамм М2 [7]; IHNV - вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых, штамм FU/0204 [8]; VHSV - вирус вирусной геморрагической септицемии, штамм ЧФ 1,2 [8]; EVEK - вирус европейского угря, *Rhabdovirus anguilla*, изолят УФ [9]; PFRV - рабдовирус мальков щуки, ELTV - вирус европейской озерной кумжи и "Necht"- везикуловиром IV геногруппы [10]; IPNV - бирнавирус инфекционного некроза поджелудочной железы (получен от д-ра E. Neuvonen, Ветеринарный

институт, Хельсинки); CCIV - иридовирус карпа, штамм 4БЖ [11]; SbSHV - герпесвирус сибирского осетра, штамм SK1/0406 [12].

Сыворотки крови. Свежеотобранная нормальная сыворотка крови карпа (комплемент), карповая антисыворотка к вирусу SVC.

Приготовление препаратов для исследования морфологических и кариологических характеристик клеток. Для изучения морфологических особенностей клеток проводили регулярное, в течение всего срока инкубации, микроскопирование нативных и окрашенных по Паппенгейму препаратов [13] под инвертированным микроскопом при разном увеличении. Для кариологических исследований использовали культуру через 3-5 суток после посева. После добавления колхицина в ростовую среду (10 мкг/см³) культуру инкубировали 4-6 ч при 25°C. В качестве гипотонического раствора использовали среду Игла 2MEM, разведенную дистиллированной водой 1:7. Через 25-30 мин суспензию центрифугировали (60g, 5 мин). Осадок клеток фиксировали 20-30 мин при 4°C фиксатором ледяная уксусная кислота: метиловый спирт в соотношении 1:3. Препараты окрашивали в течение 8 мин 1%-ным красителем Гимза на фосфатном буфере (pH 6,8). Фотографировали по 100 метафазных пластинок и подсчитывали в каждой число хромосом, используя компьютерную программу ACD Photo Editor 3.1.

Криоконсервация. Клетки через 7-10 суток инкубации в оптимальных условиях диспергировали стандартным способом, ресуспендировали в ростовой питательной среде с 10% сыворотки крови плода коровы (СПК), подсчитывали концентрацию живых клеток, центрифугировали в рефрижераторной центрифуге (60g, 10 мин). Осадок клеток ресуспендировали в таком объеме ростовой питательной среды (с 20% СПК), чтобы их концентрация была не ниже 10⁶ кл./см³. Затем медленно, по каплям, тщательно перемешивая суспензию, добавляли диметилсульфоксид (10% от объема клеточной суспензии). Разливали суспензию клеток по 1,8 см³ в криопробирки и ставили на 1 час в холодильник при 4°C. После этого пробирки помещали в толстостенную пенопластовую коробку и переносили в низкотемпературный морозильник (-70°C), а через сутки - в жидкий азот (-196°C).

Размораживание клеток проводили быстро, помещая пробирку с культурой в водяную баню с температурой 20°C и интенсивно встряхивая её. Клетки ресуспендировали в ростовой питательной среде, подсчитывали концентрацию живых клеток, разводили до посевной концентрации, разливали в культуральные флаконы и инкубировали при оптимальной температуре. Через сутки питательную среду заменяли свежей и продолжали инкубацию.

Контроль на контаминанты. Использовали микробиологический, цитологический, цитохимический методы и ПЦР-метод (14, 15).

Выявление антител к вирусу весенней виiremии карпа проводили с помощью принятого в ихтиовирусологии метода [16].

Статистическую обработку данных производили с помощью общепринятого метода [17].

Результаты и обсуждение

Получение первичных культур клеток

Дезагрегирование ткани яичника карпа вели при комнатной температуре на магнитной мешалке щадящим методом дробной дезагрегации, чередуя 10-15-минутные обработки 0,5% раствором трипсина с такими же обработками средой Игла MEM. В качестве ростовой среды использовали: 1) среду, состоящую из равных частей 0,5% раствора гидролизата лактальбумина и среды Игла основной с добавлением 15% СПК и антибиотиков (пенициллин 100 ЕД/см³ и стрептомицин 100 мкг/см³); 2) среду Игла основную с 15% СПК и антибиотиками; 3) среду Игла MEM с 10% СПК и антибиотиками; 4) среду Игла MEM с 20% СПК и антибиотиками; 5) среду Игла MEM с 10% СПК, 0,02М Нерес-буфером (рН 7,0) и антибиотиками; 6) среду Игла MEM с 10% СПК, 5% триптозофосфатного бульона (ТФБ) и антибиотиками.

Посевная концентрация составляла 6×10^5 – 1×10^6 кл./см³. Культуры клеток инкубировали при четырех разных температурах (21°, 24°, 28°, 33°C).

Через двое суток после посева в культурах, инкубировавшихся при 28°C в среде Игла MEM с 20% СПК, образовывался монослой, состоявший преимущественно из фибробластоподобных клеток. В других питательных средах и при других температурах рост был заметно хуже. В отдельных пробирках на 9 сутки после посева появились островки эпителиоподобных клеток.

Субкультивирование первичных культур клеток

Для субкультивирования использовали первичные культуры клеток спустя разное время после посева клеток. Диспергирование клеточного монослоя первичных культур клеток осуществляли смесью растворов трипсина (0,25) и версена (0,02%) в соотношении 4:1. В качестве ростовой среды в первом пассаже использовали среду Игла MEM с 10% СПК, 2% ТФБ и антибиотиками. Коэффициент первого субкультивирования - 1:1. Температура инкубации 28°C. Через сутки, как правило, образовывался монослой, состоявший из

фибробластоподобных клеток. Однако дальнейшее субкультивирование не приводило к формированию монослоя.

Для одной из попыток субкультивирования была взята первичная культура через 12 суток после посева, в которой отмечали островковый рост эпителиоподобных клеток. После внесения диспергирующего раствора все клетки, кроме клеток, образующих эти островки, легко снимались с поверхности. Добавление в эти пробирки свежей ростовой среды Игла МЕМ с 10% СПК и 2% ТФБ способствовало увеличению размеров островков эпителиоподобных клеток и их постепенному слиянию с образованием конфлюэнтного монослоя. Первый и второй пассажи были проведены с интервалом один месяц и коэффициентом субкультивирования 1:1 (соотношение трипсин:версен 4:1). Монослой формировался за 10 суток. В дальнейшем пересев проводили с интервалом 8-14 дней. Коэффициент субкультивирования постепенно увеличивали, и к 6-му пассажиру он достиг значения 1:4.

С увеличением количества пассажей соотношение трипсин:версен в составе диспергирующего раствора изменяли в сторону уменьшения доли трипсина и к 20-му пассажиру оно равнялось 5:7. Таким образом, была получена постоянная линия клеток яичников неполовозрелого карпа, получившая название ICO (immature carp ovaries).

К настоящему времени клеточная линия прошла более 700 пассажей и культивируется в среде Игла 2МЕМ с 10% СПК без антибиотиков.

Характеристика и применение постоянной линии клеток ICO

Морфология. После посева клетки культуры группируются по 5-10 клеток, спустя 3-4 часа расплываются на поверхности субстрата, образуя островки, являющиеся очагами роста. Островки затем сливаются с образованием ровного монослоя. Клетки эпителиоподобные, преимущественно однородные, их форма близка к кубической. Ядра крупные округлые, число ядрышек от 1 до 3, чаще 1. Ядрышки крупные, при окраске по Паппенгейму окружены зоной просветления. Цитоплазма гомогенная.

Кариологическая характеристика. Кариологические исследования клеточной линии проведены на 59-м и 690-м пассажах. Было установлено, что модальный класс клеточной линии 59-го пассажа представлен клетками, содержащими 100 хромосом, при достаточно узком интервале варьирования - от 95 до 104 (рис. 1А). Доля клеток модального класса равнялась 56%. Хромосомный набор донорского вида – $2n = 100$ [18].

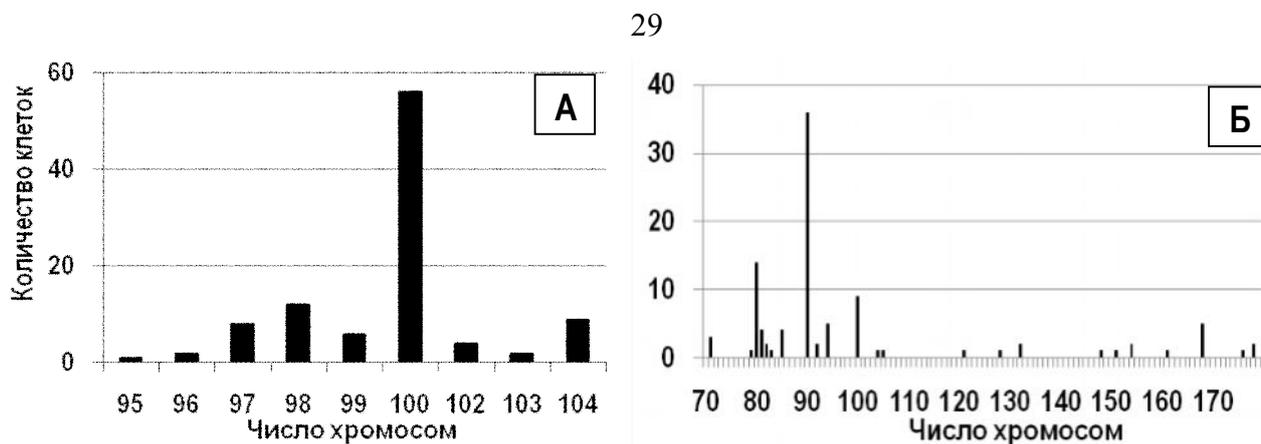


Рис. 1. Гистограмма распределения числа хромосом в 100 клетках постоянной линии ICO 59-го (А) и 690-го (Б) пассажей

На 690-м пассаже клеточной линии ICO её модальный класс был представлен клетками, содержащими 90 хромосом, доля таких клеток снизилась до 36%. При этом интервал варьирования числа хромосом резко возрос - от 71 до 178 (рис. 1Б).

Влияние посевной плотности на рост клеток. Посевная плотность влияет как на время формирования монослоя, так и на индекс пролиферации клеток (ИП). При культивировании клеток линии ICO при температуре 25°C в среде 2MEM с 10% СПК с разными посевными плотностями были получены следующие результаты (табл. 1).

Таблица 1. Влияние посевной плотности клеток на показатели роста клеточной линии ICO

Показатели	Посевная плотность, $\times 10^3$ кл./см ²						
	758±2	505±2	303±1	190±1	95±1	47±1	24±1
Время формирования монослоя, сут.	1/6	1	1	2	6	12	н.с.
ИП	1,5±0,1	2,0±0,1	5,0±0,2	3,9±0,1	3,0±0,1	1,8±0,2	0,3±0,1*

Примечание: н.с. – монослой полностью не сформировался в течение всего срока наблюдения (16 сут.); ИП – индекс пролиферации; *подсчитан через 14 сут после посева.

Высокая посевная плотность (758×10^3 кл./см²) приводила к формированию очень плотного монослоя уже через 4 часа после посева. Спустя 3 суток появлялось большое количество округлых клеток, как на поверхности монослоя, так и во взвешенном состоянии, а на 5 сутки монослой начинал отделяться от субстрата. Количество клеток при этом увеличивалась всего в 1,5 раза. При снижении посевной плотности примерно в 16 раз (до 47×10^3 кл./см²) монослой формировался очень медленно и не уплотнялся. Клетки были очень крупными, распластанными, а их количество увеличивалось всего в 1,8 раза. Наибольший ИП был достигнут при посевной плотности 303×10^3 кл./см², при этом монослой формировался за сутки.

Таким образом, посевную концентрацию необходимо выбирать в зависимости от поставленной задачи. Если требуется быстрое формирование монослоя, посевную плотность клеток можно увеличить, но не выше 3×10^5 кл./см². Эту величину следует считать оптимальной для данной линии клеток. Установлено, что с целью увеличения интервала между пересевами, после образования монослоя дальнейшую инкубацию культуры необходимо вести при пониженной примерно до 15°C температуре.

Особенности роста клеток в средах разного состава. Суспензию клеток с посевной плотностью 3×10^5 кл./см² готовили в средах разного состава с 10% СПК, высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали при 25°C.

В среде Игла 2МЕМ уже через двое суток отмечали увеличение плотности клеток, тогда как в остальных испытанных средах даже через трое суток после посева плотность клеток была заметно ниже посевной, особенно в основной среде Игла (рис. 2). Такая разница в темпах роста клеток в первые дни после посева обусловила разные сроки формирования монослоя в разных питательных средах (табл. 2).

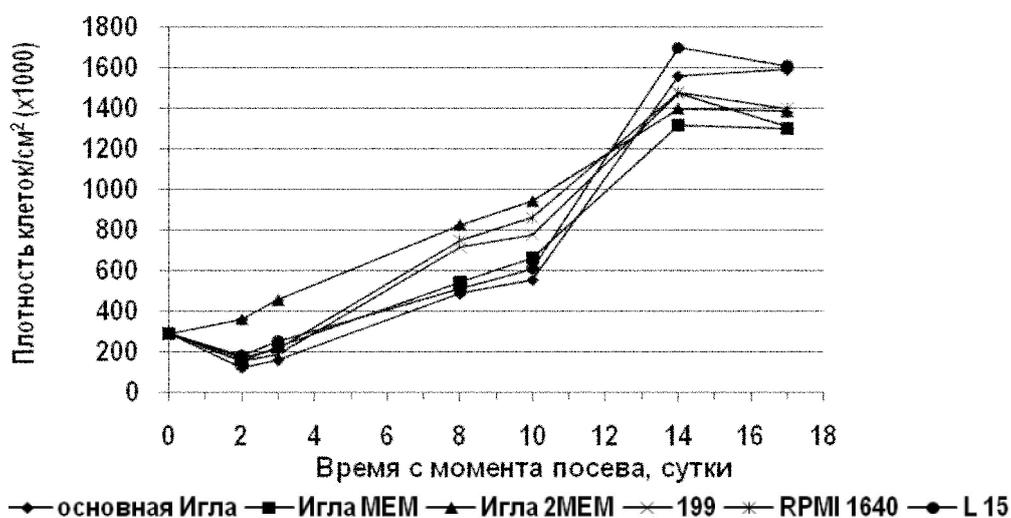


Рис. 2. Влияние состава среды на рост клеток линии ICO

Таблица 2. Влияние состава среды на показатели роста клеток линии ICO

Показатели	Питательная среда					
	Игла основная	Игла МЕМ	Игла 2МЕМ	199	RPMI 1640	L15
Время формирования монослоя, сут.	6	4	1	6	6	2
Индекс пролиферации	5,5±0,1	4,6±0,1	4,9±0,2	5,1±0,1	5,2±0,1	5,9±0,2

Ускоряющийся рост клеток на всех средах продолжался в течение 14 суток, после чего прекращался. Наивысшую плотность и ИП клеток в это время отмечали в среде L15. В то же время на 10 сутки и позднее в этой культуре клеток были выявлены признаки дегенерации монослоя - очаги темных клеток с вакуолизированной цитоплазмой, а также большое количество округлых клеток на поверхности монослоя и во взвешенном состоянии.

В среде Игла 2MEM, на которой клеточную линию ICO постоянно пассировали, максимальный ИП составил 4,9. Близкие к этому результаты были получены и на средах Игла основная и Игла MEM. При этом признаков дегенерации монослоя не отмечали: – монослой был ровным и состоял из клеток с гомогенной цитоплазмой.

В средах 199 и RPMI 1640 получены примерно одинаковые результаты, как по скорости формирования монослоя (6 сут), так и по ИП (5,1 – 5,2). Однако на них, как и при выращивании в среде L15, к 17 суткам эксперимента отмечали заметную дегенерацию монослоя.

Результаты испытаний показали, что клетки линии ICO могут расти во всех использованных средах, но среда Игла 2MEM обеспечивала наилучший стартовый рост клеток после посева, достаточно высокий ИП и хорошую сохранность клеточного монослоя. Поэтому среда Игла 2MEM рекомендована нами для культивирования этой линии клеток.

Рост клеток в среде с разным содержанием сыворотки. Суспензию клеток с посевной плотностью 2×10^5 кл./см² готовили в ростовой среде Игла 2MEM с разным содержанием СПК (от 2 до 20%), высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали при 25°C.

В результате было установлено, что пролиферация клеток происходила во всех вариантах опыта, однако концентрация сыворотки влияла на динамику роста клеток, скорость образования монослоя и ИП (рис. 3, табл. 3).

При культивировании клеток в среде с 2-15% СПК скорость роста клеток возрастала с увеличением содержания сыворотки, и плотность клеток достигала максимальных значений к 14 суткам (17 суткам для 2% СПК). Дальнейшее увеличение содержания сыворотки до 20% было избыточным и приводило к снижению темпов роста клеток (ИП $4,0 \pm 0,1$) и более ранней дегенерации культуры. Появлялись округлые клетки, количество которых с увеличением концентрации сыворотки повышалось. Они переходили во взвешенное состояние. В среде с 2% СПК пролиферация клеток продолжалась в течение всего срока наблюдения, округлые клетки отсутствовали, однако ИП оставался невысоким – $2,7 \pm 0,2$.

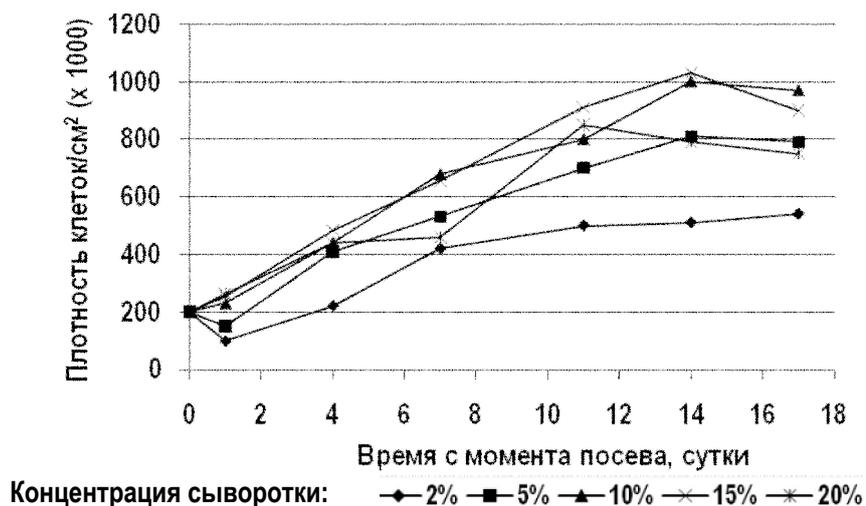


Рис. 3. Влияние концентрации сыворотки на рост клеток линии ICO

Таблица 3. Влияние концентрации сыворотки в ростовой среде на показатели роста клеток линии ICO.

Показатели	Концентрация сыворотки, %				
	2	5	10	15	20
Время формирования монослоя, сут	3	2	1	1	1
Индекс пролиферации	2,7±0,2	4,1±0,2	5,0±0,1	5,1±0,2	4,0±0,1

Таким образом, изменяя концентрацию сыворотки в ростовой среде можно в зависимости от практической потребности менять скорость образования монослоя и урожай клеток. Оптимальной концентрацией сыворотки, обеспечивающей максимальный ИП (5,0±0,1) и наибольший прирост количества клеток, является 10%.

Пролиферативная активность клеток при разных температурах инкубации. Готовили суспензию клеток с посевной плотностью 290x10³ кл./см² в среде Игла 2MEM с 10% СПК, высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали при температурах от 10° до 35°С.

Исследования показали, что клетки линии могут расти в диапазоне температур от 15° до 30°С, однако динамика роста, время формирования монослоя и ИП при этом значительно различаются (рис. 4, табл. 4).

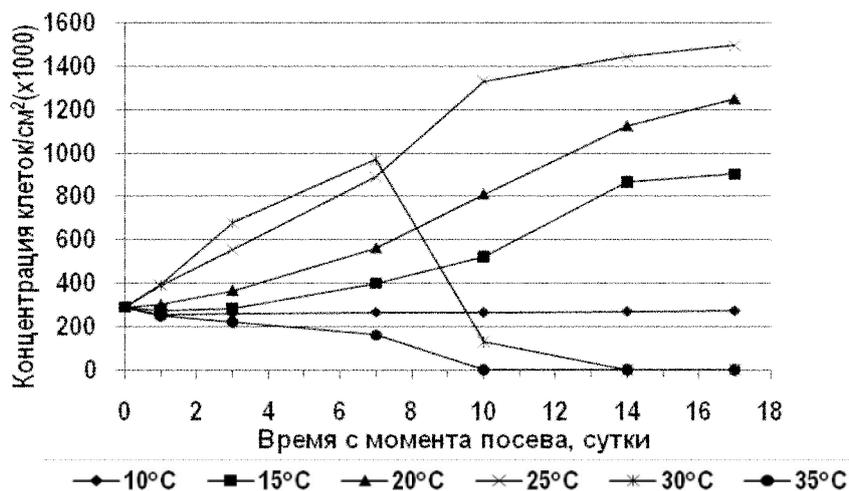


Рис. 4. Влияние температуры инкубации на рост клеток линии ICO

Инкубация при 10°C не приводила к увеличению концентрации клеток. При посеве не все клетки прикреплялись, часть их оставалась во взвешенном состоянии. Очень тонкий монослой формировался за счет того, что клетки, расплываясь, увеличивались в размерах, однако он сохранялся в течение всего срока наблюдения. При 35°C наблюдалось непродолжительное переживание клеток, монослой образовывался, но через семь суток начиналась его дегенерация, и к 10 суткам все клетки отделялись от поверхности субстрата.

Таблица 4. Влияние температуры инкубации на показатели роста клеток линии ICO.

Показатели	Температура инкубации, °C					
	10	15	20	25	30	35
Время формирования монослоя, сут.	3	2	2	1	1	2
Индекс пролиферации	0,94±0,2	3,1±0,1	4,3±0,1	5,2±0,1	3,4±0,2	0,86±0,2

В диапазоне температур 15-30°C темп роста культуры ускорялся с ростом температуры. Это происходило в течение семи суток, после чего наблюдали резкую дегенерацию культуры, инкубированной при 30°C, тогда как при остальных трех температурах (15°, 20° и 25°C) тенденции роста сохранялись до конца эксперимента.

Максимальный прирост клеток наблюдался при 25°C (ИП 5,2). При 20°C он был ниже (ИП 4,3). Инкубация культуры при 15°C приводила к увеличению количества клеток всего лишь в 3,1 раза, однако в течение всего срока наблюдения признаков дегенерации не отмечали - монослой был ровным, состоял из крупных клеток с гомогенной цитоплазмой.

Таким образом, клетки линии ICO растут в диапазоне температур более чем 15°C с

оптимумом около 25°C, близким к температурному оптимуму донорского вида.

Жизнеспособность клеток после криоконсервации. Жизнеспособность клеток по тесту витального окрашивания трипановым синим после хранения при температуре минус 70°C составила 75-80%. При оптимальных условиях культивирования клетки восстанавливают исходные ростовые и морфологические свойства в течение 2 пассажей.

Контроль клеточной линии ICO на посторонние контаминанты. При исследовании клеточной линии ICO на наличие бактерий, грибов и микоплазм по ГОСТу 28085 путем посевов на жидкие и плотные питательные среды МПБ, МПА и Сабуро и с помощью тест-системы «МИК-КОМ» для диагностики микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции получены отрицательные результаты.

Видовая идентичность подтверждена молекулярно-генетическим анализом фрагмента митохондриального гена цитохром-оксидазы длиной 172 п.н. с помощью ПЦР-амплификации, секвенирования ампликонов и определения идентичности полученных последовательностей эталонным образцам из GenBank. Установленная идентичность составила 93%.

Чувствительность к вирусам рыб. Установлено, что полученная клеточная линия высокочувствительна почти ко всем испытанным рабдовирусам рыб за исключением ELTV (табл. 5). Она также чувствительна к CCIV и не чувствительна к IPNV и SbSHV.

Таблица 5. Сравнительная чувствительность клеточной линии ICO и референсных клеточных линий к вирусам рыб

Вирус	Референсная клеточная линия	Титр вируса, Ig ТЦД ₅₀ /г ткани или см ³ культуральной жидкости			
		в референсной клеточной линии		в ICO	
<i>Рабдовирусы</i>					
SVCV	EPC	7,10±0,11*	8,10±0,12**	7,10±0,13*	9,10±0,14**
IPNV	EPC	9,10±0,11*	7,85±0,21**	8,10±0,11*	7,35±0,10**
VHSV	EPC	6,35±0,12*	9,10±0,11**	6,35±0,20*	8,60±0,15**
EVEX	FHM	7,10±0,11***	7,85±0,14**	9,10±0,12***	9,10±0,11**
PFRV	EPC	8,60±0,14***	8,35±0,12**	7,35±0,11***	9,10±0,10**
“Hecht”	EPC	8,10±0,13***	8,35±0,15**	н.и.	н.и.
ELTV	BF-2	н.и.	7,10±0,11**	-	-
<i>Бирнавирус</i>					
IPNV	CHN-1	4,35±0,12*	8,10±0,12**	-	-
<i>Иридовирус</i>					
CCIV	EPC	н.и.	6,00±0,12**	5,70±0,15*	5,70±0,13**
<i>Герпесвирус</i>					
SbSHV	WSSK-1	6,10±0,13*	5,60±0,13**	-	-

Примечание: * - титр вируса в патматериале; ** - титр вируса после 3 пассажей в культуре клеток; *** - титр вируса, накопленного в референсной линии клеток; н.и. – не исследовали; - – признаков цитопатогенного действия вируса не обнаружено.

Из таблицы видно, что по чувствительности выявления вирусов SVCV, VHSV и EVEX в патологическом материале или референсной линии клеток клеточная линия ICO не уступает референсным линиям, тогда как эффективность выявления вируса IHNV и PFRV заметно ниже. После адаптации вирусов к клеткам линии ICO путем проведения 3 пассажей такие вирусы, как вирус SVCV, EVEX и PFRV накапливаются на ней в более высоких титрах, чем на соответствующих референсных клеточных линиях.

Выявление антител к вирусу весенней виремии карпа (SVCV) в реакции комплемент-зависимой нейтрализации. При выявлении антител в сыворотке экспериментально зараженного четырехлетка карпа с использованием пяти образцов комплемента (10% в реакционной смеси), полученных от разных рыб-доноров, установлена значительно более высокая чувствительность выявления антител в культуре клеток ICO по сравнению с референсной линией клеток EPC (в 6-52 раза)(табл. 6).

Таблица 6. Титры SVCV-нейтрализующих антител в сыворотке крови зараженного четырехлетка карпа, полученные в клеточных линиях EPC и ICO.

Линия клеток	Титр антител с пятью образцами комплемента карпа				
	1	2	3	4	5
EPC	1:100	1:16	1:128	1:136	1:37
ICO	1:724	1:827	1:1575	1:813	1:215

Клеточная линия ICO запатентована в России и депонирована в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко (СХЖ РАСХН) Российской коллекции клеточных культур.

Благодарности. Авторы выражают признательность руководителю Центра молекулярно-генетической идентификации СИТЕС (ВНИРО) В.А. Барминцеву за помощь в видовой идентификации клеточной линии и сотруднику ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства О.А. Емельяновой за морфологический анализ хромосом линии клеток ICO.

Список литературы

1. **Gravell M., Malsberger R.C.** A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Ann. N.Y. Acad. Sci. 1965, 126: 555-565.
2. **Clem L.W, Sigel M.M., Friis R.R.** An orphan virus isolated in marine fish cell tissue culture. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1965, 126: 343-361.
3. **Fijan N., Sulimanovic D., Bearzotti M., Muzinic D., Zwillenberg L.O., Chilmonczyk S., Vaunterot J.F., De Kinkelin P.** Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. Ann. Virol. (Inst. Pasteur). 1983, 134 E: 207-220.
4. **Wolf K., Quimby M.C.** Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. Science. 1966, 151: 1004-1005.
5. **Lannan C.N., Winton J.R., Fryer J.L.** Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. In Vitro. 1984, 20: 671-676.
6. **Hedrick R.P., McDowell T.S., Groff J.M., Yun S., Wingfield W.F.** Characteristics of two viruses isolated from white sturgeon *Acipenser transmontanus*. In: "Proceedings Second Intern. Symp. on Virus. Lower Verteb." Corvallis: Oregon State University Press. 1991: 165-174.
7. **Щелкунов И.С., Юхименко Л.Н., Тромбицкий И.Д., Щелкунова Т.И., Манчу А.П.** Выделение вируса от белого толстолобика с синдромом краснухи. Экспресс-информ. ЦНИИТЭИРХ. 1984, 4: 3-7.
8. **Щелкунов И.С.** Эпизоотическая ситуация по вирусным болезням культивируемых рыб. Ветеринария. 2006, 4: 22-25.
9. **Щелкунов И.С., Скурат И.К., Сиволоцкая В.А., Сапотько В.А., Шимко В.В., Линник В.Я.** *Rhabdovirus anguilla* у угря в СССР и его патогенность для рыб. Вопросы вирусологии. 1989, 1: 81-84.
10. **Stone D.M., Ahne W., Denham K.L., Dixon P.F., Liu C.T., Sheppard A.M., Taylor G.R., Way K.** Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. Dis. Aquat. Org. 2003, 53: 203-210.
11. **Попкова Т.И., Щелкунов И.С.** Выделение вируса от карпов, больных жаберным некрозом. Рыбное хоз-во. 1978, 4: 4-38.
12. **Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И., Щелкунов А.И., Колбасова Ю.П., Диденко Л.В., Быковский А.Ф.** Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России. Российский ветеринарный журнал (Сельскохозяйственные животные). 2007, 1: 10-12.
13. Лабораторный практикум по болезням рыб. Под ред. В.А. Мусселиус. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983, 296 с.
14. **Михайлова Г.Р., Новохатский А.С., Родова М.А.** Методические рекомендации по способу выявления микоплазм в культурах перевиваемых клеток. М, 1983, 8 с.
15. Наставление по применению тест-системы «МИК-КОМ» для диагностики микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции: утверждена Деп. ветеринарии Минсельхозпрод России 17 августа 1998 г., 11с.
16. Методические указания по идентификации и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб. Вирусные болезни. Сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб. М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998,1: 60-113.
17. **Лакин Г.Ф.** Биометрия. М.: Высшая школа, 1990, 352 с.
18. **Васильев В.П.** Эволюционная кариология рыб. М.: Наука, 1985, 300 с.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА КЛОНАЛЬНЫЙ РОСТ И ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ

О.Н. Хныкова, О.В. Паюшина, Н.Н. Буторина, Э.И. Буеверова, В.И. Старостин

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, rayushina@mail.ru

Белки внеклеточного матрикса являются необходимым компонентом микроокружения мезенхимных стромальных клеток (МСК). Исследование адгезивных взаимодействий МСК с матриксом необходимо для понимания механизмов регуляции пролиферации и дифференцировки МСК и важно для дальнейшего развития клеточной терапии. Целью этого исследования был анализ влияния некоторых белков внеклеточного матрикса (коллаген I типа, фибронектин и ламинин) на клональный рост и остеогенные потенциалы МСК, полученных из костного мозга половозрелых крыс и печени зародышей крыс. Было обнаружено, что для обоих источников доля колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф), прикрепившихся за первые 7 дней инкубации, существенно выше на фибронектиновом и коллагеновом покрытии по сравнению с обычным пластиковым покрытием. Влияние ламинина на адгезию КОЕ-Ф выражено в меньшей степени. Анализ экспрессии щелочной фосфатазы, маркирующей ранние стадии остеогенной дифференцировки, указывает на сниженный остеогенный потенциал костномозговых КОЕ-Ф на фибронектине по сравнению с пластиком, коллагеном I типа и ламинином. Доля остеогенных клеток среди КОЕ-Ф зародышевой печени крайне низка независимо от присутствия белков внеклеточного матрикса. Анализ терминальной дифференцировки костномозговых МСК в остеогенной среде показал подавляющий эффект фибронектина на отложение кальция в остеогенных узелках. Коллаген I типа и ламинин существенного эффекта на остеогенную дифференцировку в данной экспериментальной системе не оказывали. Изучение молекулярных механизмов обнаруженных явлений представляется перспективной темой для дальнейших исследований.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, колониеобразующие единицы фибробластов, остеогенез, адгезия, белки внеклеточного матрикса, коллаген I типа, ламинин, фибронектин.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК), впервые описанные Фриденштейном (1, 2) как колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф), в настоящее время определяются как адгезивные к пластику клетки со специфическим поверхностным фенотипом (CD73⁺CD90⁺CD105⁺ при отсутствии кроветворных маркеров), способные к остео-, адипо- и хондрогенной дифференцировке *in vitro* (3). Клетки, удовлетворяющие критериям МСК, присутствуют в костном мозге, жировой ткани (4), стенке сосудов (5), надкостнице (6), пульпе зуба (7), пуповинной крови (8), синовиальной мембране (9) и некоторых фетальных органах – печени, сердце, поджелудочной железе, легком и селезенке (10). МСК из разных источников сходны по основным характеристикам, хотя могут иметь некоторые различия по потенциям к пролиферации и дифференцировке и по экспрессии некоторых маркеров. Например, показано, что при практически одинаковом иммунофенотипе МСК из фетальной селезенки имеют сниженные потенции к адипогенезу, а МСК из фетальной печени – к остеогенезу (10).

Возможность получения МСК из аутологических источников (например, костного мозга или жировой ткани), сравнительная легкость их культивирования и высокая способность к пролиферации и дифференцировке делают эти клетки перспективными для применения в регенеративной медицине. Большое значение для понимания механизмов регуляции роста и дифференцировки МСК, а также для совершенствования методов их клинического использования, имеет изучение их взаимодействий с микроокружением, одним из важных компонентов которого является внеклеточный матрикс. МСК продуцируют такие молекулы внеклеточного матрикса, как коллаген I и III типов, фибронектин, ламинин, остеоонектин и некоторые другие, и несут на своей поверхности рецепторы к этим белкам (11). Особое место среди этих рецепторов занимают интегрины - особый класс белков, состоящих из двух полипептидных цепей α и β . На мембране МСК присутствуют субъединицы интегринов $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha v, \beta 1, \beta 3, \beta 4$. Есть свидетельства того, что образование групп интегринов в местах контакта с матриксом может инициировать сборку сигнального комплекса на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны, подобно действию рецепторов факторов роста, и активировать некоторые сигнальные пути, в частности, инозитол-трифосфатный. Внутриклеточные сигналы, генерируемые при связывании белков внеклеточного

матрикса с интегринами, могут влиять как на митотическую активность клеток, так и на их потенции к дифференцировке в том или ином направлении.

К настоящему моменту данные о влиянии различных белков матрикса на МСК довольно противоречивы. Разные авторы по-разному оценивают адгезивные способности МСК по отношению к этим молекулам. Данные об изменении дифференцировочных потенций МСК при культивировании на разных субстратах также неоднозначны. Одним из наиболее изученных к настоящему времени белков внеклеточного матрикса является коллаген I типа. Известно, что МСК демонстрируют выраженную адгезивность к нему и высокую способность к пролиферации на коллагеновых носителях *in vitro* (12). При этом коллаген I типа способствует остеогенной дифференцировке МСК (13), что позволяет выращивать их на коллагеновых губках и применять для репарации костных и хрящевых дефектов (14), но делает коллагеновые носители непригодными для лечения повреждений сосудов и т.п.

В связи с вышесказанным, комплексное исследование влияния белков внеклеточного матрикса на адгезию, пролиферацию и дифференцировку МСК представляет значительный интерес как с теоретической точки зрения (для выяснения конкретных механизмов регуляторного воздействия микроокружения на функции клеток), так и с практической (для разработки оптимальных протоколов культивирования МСК и носителей для их трансплантации в разные области организма). В настоящей работе было проведено сравнительное исследование клонального роста и остеогенных потенций МСК костного мозга и зародышевой печени крысы при их культивировании на одних из основных компонентов внеклеточного матрикса - фибронектине, коллагене I типа и ламинине.

Материал и методы

Животные. В качестве источника клеток были использованы крысы Wistar неинбредного разведения (самки в возрасте 3–5 мес. и весом 220–330 г) и их плоды 16 сут развития. Первым днем эмбриогенеза считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке.

Реактивы и материалы. Для культивирования клеток использовали среду α -MEM, сыворотку плодов коровы, растворы L-глутамина, антибиотика-антимикотика, пенициллина-стрептомицина и 0,25 %-ный трипсин с ЭДТА фирмы HyClone (США), флаконы с площадью дна 25 см² и 12-луночные платы BD Bioscoat, покрытые коллагеном I типа или ламинином (BD Biosciences, США), либо аналогичные флаконы и платы без белкового покрытия (Greiner,

Германия). Фибронектин из плазмы крови человека был любезно предоставлен А.А. Мининым (Лаборатория биохимической эмбриологии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН); культуральную посуду покрывали им, нанося на дно раствор фибронектина с концентрацией 50 мкг/мл и высушивая в ламинарном боксе в течение 2 ч. В работе были использованы дексаметазон, β -глицерофосфат натрия, набор для выявления активности щелочной фосфатазы (ЩФ), ализариновый красный S, раствор гематоксилина Гилла фирмы Sigma (США) и 2-фосфо-L-аскорбат фирмы Fluka (Германия).

Выделение и культивирование клеток. Клеточную суспензию, полученную из костного мозга половозрелых крыс или печени плодов, помещали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в культуральные флаконы и инкубировали при 37 °С и 5 % CO₂ в среде α -MEM с 10% сыворотки плодов коровы с добавлением L-глутамина, антибиотика-антимикотика и пенициллина-стрептомицина. В экспериментах по оценке числа КОЕ-Ф, прикрепляющихся к субстрату в разные сроки культивирования, клетки инкубировали в течение 7 сут во флаконах, покрытых белками внеклеточного матрикса, или в пластиковых флаконах без белкового покрытия, после чего проводили смену среды и продолжали культивировать клетки костного мозга в течение 4–5 сут, а клетки зародышевой печени – в течение 1 сут. Удаляемую при смене среду с неприкрепленными клетками переносили в новые флаконы с тем же покрытием и культивировали в течение 7 сут (костный мозг) или 5 сут (зародышевая печень). Для индукции остеогенной дифференцировки клетки костного мозга культивировали в непокрытых флаконах до слияния колоний, снимали трипсином с ЭДТА и пересевали с концентрацией $1–5 \times 10^4$ клеток/мл в платы с индукционной средой (α -MEM с 10% сыворотки плодов коровы с добавлением 10^{-8} М дексаметазона, 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата и 10 мМ β -глицерофосфата натрия), покрытые изучаемыми белками. Культивирование продолжали в течение 14 сут, сменяя среду дважды в неделю.

Анализ результатов. Для подсчета колоний и анализа активности щелочной фосфатазы культуры фиксировали смесью цитрата, ацетона и формальдегида и проводили реакцию азосочетания прочного красно-фиолетового FRV с нафтолом AS-VI согласно протоколу фирмы-производителя. Численность КОЕ-Ф определяли подсчетом колоний, содержащих не менее 50 клеток. В экспериментах по индукции остеогенеза культуры фиксировали 96⁰-ным этанолом и выявляли отложения солей кальция путем окрашивания ализариновым красным S в течение 10 мин при pH 4.1 (15); ядра докрашивали гематоксилином. Величину минерализованных очагов остеогенеза оценивали, измеряя площадь окрашенных

ализариновым красным S областей на отсканированных изображениях лунок в программе ImageJ (16). Морфологию клеток и результаты цитохимических реакций анализировали с помощью микроскопа Olympus AH-3 (Япония). Результаты обрабатывали статистически с использованием таблиц Стрелкова (17).

Результаты и обсуждение

Численность и остеогенные потенции КОЕ-Ф, прикрепляющихся к субстрату в различные сроки культивирования. Было проведено сравнительное изучение динамики прикрепления КОЕ-Ф, содержащихся в костном мозге или зародышевой печени, к культуральному пластику и белкам внеклеточного матрикса. Для оценки остеогенных потенций КОЕ-Ф, прикрепившихся и не прикрепившихся к субстрату за первые 7 сут культивирования, в образованных ими колониях была проанализирована активность щелочной фосфатазы, маркирующая ранние стадии остеогенеза. Полученные данные представлены в таблицах 1 и 2.

Как показал подсчет числа колоний, после 7 сут культивирования на пластике часть КОЕ-Ф зародышевой печени и еще более высокая доля КОЕ-Ф костного мозга оставались неприкрепленными. Покрытие флаконов фибронектином или коллагеном I типа значительно повышало долю КОЕ-Ф, прикрепившихся в первые 7 сут; влияние ламинина на динамику прикрепления КОЕ-Ф было выражено слабее. В целом, судя по соотношению числа колоний, образованных прикрепившимися и не прикрепившимися за этот срок клетками, КОЕ-Ф зародышевой печени были более адгезивны к изучаемым белкам, чем КОЕ-Ф костного мозга.

Большая адгезивность МСК из зародышевой печени по сравнению с МСК из костного мозга половозрелого животного может быть объяснена особой ролью, которую играют адгезивные взаимодействия клеток в эмбриогенезе. Возможно, МСК, как и другие клетки зародыша, несут на своей поверхности больше молекул адгезии, чем клетки взрослого животного.

Наши результаты согласуются с данными некоторых авторов, показавших более эффективное прикрепление МСК к коллагену I типа и фибронектину по сравнению с коллагеном IV типа и ламинином (18,19). Эти данные были получены на пассируемых культурах путем оценки общего числа прикрепившихся клеток. Исследование же клонального роста КОЕ-Ф в первичной культуре костного мозга мыши, проведенное американскими учеными, показало, что покрытие культуральной посуды белками матрикса, в том числе коллагеном I типа и фибронектином, не приводит к усиленному прикреплению клоногенных клеток в первые 8 сут культивирования по сравнению с контролем на пластике (20). Сходные

данные получены и в нашей работе, однако они расширены исследованием популяции клеток, прикрепляющихся в более поздний срок культивирования. Именно анализ численности колоний в этой популяции и демонстрирует нам влияние белков внеклеточного матрикса на адгезивные свойства КОЕ-Ф.

Оценка активности щелочной фосфатазы показала, что среди КОЕ-Ф костного мозга, культивируемых на коллагене I типа или ламинине, доля остеогенных клеток сопоставима с таковой на пластике, тогда как на фибронектине она существенно снижена. Доля остеогенных клеток среди КОЕ-Ф из зародышевой печени была крайне низкой независимо от присутствия белков матрикса. Полученные нами данные о сниженных остеогенных потенциях клеток зародышевой печени подтверждаются и в исследованиях других авторов, о чем говорилось выше (10). Интересным является то, что, по-видимому, потенции клеток зародышевой печени к остеогенной дифференцировке настолько низки, что ни один из исследуемых белков внеклеточного матрикса не способен на них повлиять.

Таблица 1. Содержание КОЕ-Ф в культурах МСК из костного мозга и активность щелочной фосфатазы в колониях.

Вариант			Число КОЕ-Ф на 1 млн клеток	Доля колоний, %		
				ЩФ-	≤50% ЩФ ⁺ клеток	>50% ЩФ ⁺ клеток
Опыт 1	Адгезия в 1-ые 7 сут	Пл	3.83±0.91	15.13±6.48	53.55±7.99	31.32±5.93
		Фн	2.25±0.54	49.62±4.62***	35.00±3.32*	15.38±5.73
	Адгезия во 2-ые 7 сут	Пл	4.43±1.40	3.27±1.43	13.43±3.49	83.30±3.01
		Фн	1.28±0.75*	18.17±18.81	37.17±17.20	44.66±21.50

Опыт 2	Адгезия в 1-ые 7 сут	Пл	1.58±0.56	32.93±11.58	27.63±12.97	39.44±6.98
		Лам	1.98±0.41	61.87±11.34	20.42±6.38	17.21±6.03
		Кол	1.02±0.09	56.73±15.05	11.48±6.45	31.79±12.90
	Адгезия во 2-ые 7 сут	Пл	4.70±2.12	14.47±5.51	8.17±1.56	77.36±7.07
		Лам	2.44±0.75	24.87±5.77	12.50±6.14	62.63±5.38
		Кол	0.96±0.34	30.95±15.36	5.33±3.58	63.72±15.36

Примечание. Пл – пластик, Фн – фибронектин, Кол – коллаген I типа, Лам – ламинин, ЩФ – щелочная фосфатаза. Достоверность различий между контролем (пластик) и опытом (белок матрикса): * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Таблица 2. Содержание КОЕ-Ф в культурах МСК из зародышевой печени и активность щелочной фосфатазы в колониях

Вариант		Число КОЕ-Ф на 1 млн клеток	Доля колоний, %			
			ЩФ ⁻	≤50% ЩФ ⁺ клеток	>50% ЩФ ⁺ клеток	
Опыт 1	Адгезия в 1-ые 7 сут	Пл	9.20±1.85	92.05±1.11	4.48±0.66%	3.47±0.96%
		Фн	6.28±1.10	95.67±1.41*	2.51±1.13%	1.82±1.23
	Адгезия во 2-ые 7 сут	Пл	4.40±2.45	100	0	0
		Фн	0.15±0.16	100	0	0

Опыт 2	Адгезия в 1-ые 7 сут	Пл	15.38±1.18	94.42±1.86	5.58±1.86	0
		Лам	8.44±2.24**	95.34±1.83	4.66±1.83	0
		Кол	5.70±0.45***	95.52±1.59	4.48±1.59	0
	Адгезия во 2-ые 7 сут	Пл	1.23±0.57	100	0	0
		Лам	1.66±0.99	88.99±11.67	11.01±11.67	0
		Кол	0.06±0.07*	100	0	0

Примечание. Обозначения те же, что в таблице 1.

Дифференцировка МСК костного мозга в остеогенной среде. Заключение о влиянии исследуемых белков внеклеточного матрикса на остеогенные потенции МСК костного мозга, сделанное на основании оценки спонтанной экспрессии щелочной фосфатазы в первичной культуре, подтверждается анализом терминальной остеогенной дифференцировки клеток первого пассажа в индукционной среде. Очаги остеогенеза, представляющие собой плотные скопления клеток с морфологией остеобластов (кубической формы, с рыхлыми ядрами и интенсивной базофилией цитоплазмы) образовывались на всех изучаемых субстратах. Однако количество откладываемых в таких очагах солей кальция на фибронектине было значительно меньшим, чем на пластике, тогда как коллаген I типа и ламинин не оказывали достоверного влияния на минерализацию костного матрикса (см. рисунок).

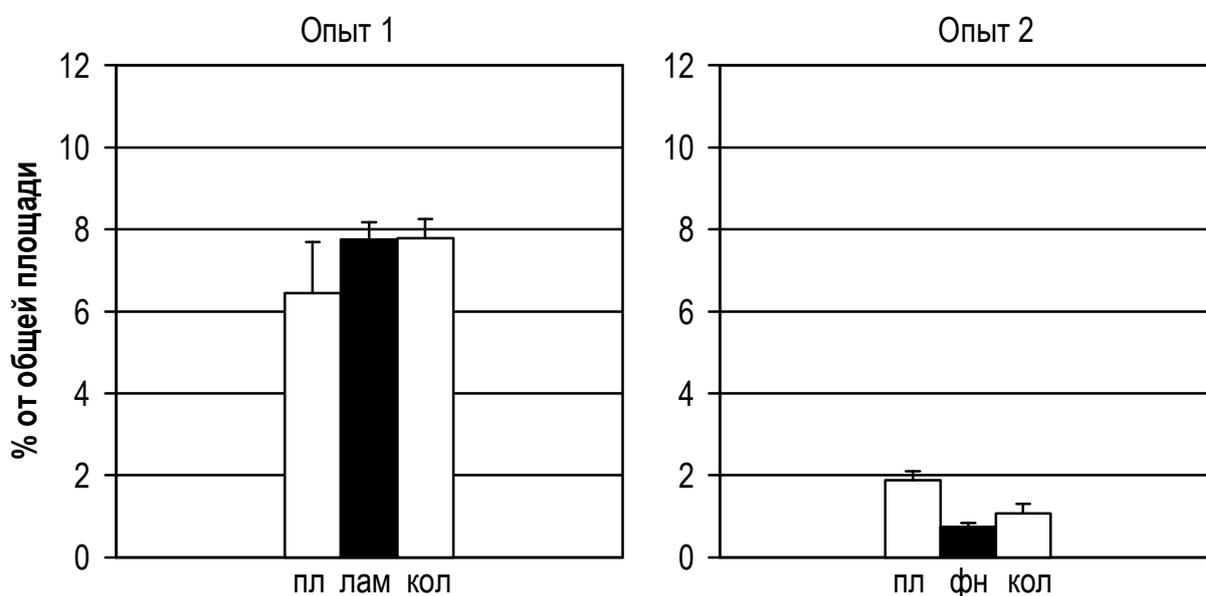


Рисунок. Площадь отложений Ca^{2+} в очагах остеогенной дифференцировки МСК костного мозга на пластике (пл), коллагене I типа (кол), ламинине (лам) и фибронектине (фн).

Наши данные об ингибирующем влиянии фибронектина на остеогенез не согласуются с литературными. Напротив, имеются сообщения, что в культуре остеобластов фибронектин стимулирует остеогенную дифференцировку (21). Мы же наблюдали на фибронектине не только уменьшенную минерализацию в процессе индукции остеогенной дифференцировки МСК, но и сниженные остеогенные потенциалы КОЕ-Ф. При этом интересно, что образование костных узелков на фибронектине происходило, но кальций не откладывался. Возможно, фибронектин замедляет остеогенную дифференцировку в культуре МСК или блокирует ее терминальные стадии. Не исключено также, что высокая способность недифференцированных МСК прикрепляться к фибронектину ведет к преимущественной адгезии к этому субстрату наименее зрелых предшественников, что также влияет на скорость дифференцировки в культуре. Все эти предположения требуют подробного рассмотрения в ходе дальнейшей работы.

Стоит отметить, что для объяснения наблюдаемых нами эффектов необходимо исследовать профиль экспрессии интегринов на поверхности МСК на разных сроках культивирования и в разных средах, поскольку, скорее всего, именно связывание клеток с белками внеклеточного матрикса через интегрины запускает внутриклеточные каскады, приводящие к изменению цитоскелета, потенциалов и митотической активности клеток.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о стимулирующем влиянии изученных белков внеклеточного матрикса на адгезию клоногенных МСК, выражающемся в более раннем прикреплении клеток к субстрату, а также о снижении остеогенных потенциалов МСК при их культивировании на фибронектине. В дальнейших исследованиях будет продолжена оценка влияния белков внеклеточного матрикса на дифференцировку МСК и проанализированы молекулярные механизмы этого влияния.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00002-а) и проекта «Ведущие научные школы» (НШ-1134.2008.4).

Список литературы

1. **Фриденштейн А. Я., Чайлахян Р. К., Лалыкина К. С.** О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворной ткани морских свинок. Цитология, 1970, 12, 9: 1147–1155.
2. **Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N.** Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.*, 1976, 4: 267–274.
3. **Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, 8: 315–317.
4. **Nathan S., Das De S., Thambyah A., Fen C., Goh J., Lee E.H.** Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng.*, 2003, 9, 4: 733-744.
5. **Abedin M., Tintut Y., Demer L.L.** Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res.*, 2004, 95, 7: 671- 676.
6. **Nakahara H., Bruder S.P., Goldberg V.M., Caplan A.I.** In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1990, 259: 223-232.
7. **Pierdomenico L., Bonsi L., Calvitti M., Rondelli D., Arpinati M., Chirumbolo G., Becchetti E., Marchionni C., Alviano F., Fossati V., Staffolani N., Franchina M., Grossi A., Bagnara G.P.** Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 2005, 80, 6: 836-842.
8. **Erices A., Conget P., Minguell J.J.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.*, 2000, 109, 1: 235-242.
9. **Fickert S., Fiedler J., Brenner R.E.** Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res. Ther.*, 2004, 6, 5: 422-432.
10. **in't Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A., Kleuburg-van der Keur G., Krusselbrink A.B., van Bezouen R.L., Beekhuizen W., Willemze R., Kanhai H.H., Fibbe W.E.** Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *J. Hematol.*, 2003, 88: 845-852.
11. **Minguell J.J., Erices A., Conget P.** Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 2001, 226, 6: 507-520.
12. **Liu G., Hu Y.Y., Zhao J.N., Wu S.J., Xiong Z., Lu R.** Effect of type I collagen on the adhesion, proliferation, and osteoblastic gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin. J. Traumatol.*, 2004, 7, 6: 358-362.
13. **Mizuno M., Kuboki Y.** Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. *J. Biochem.*, 2001, 129, 1: 133-138.
14. **Ponticello M.S., Schinagl R.M., Kadiyala S., Barry F.P.** Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, 52: 246-255.
15. **Пирс Э.** Гистохимия. Москва, 1962, 962 с.
16. **Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J.** Image processing with ImageJ. *Biophoton. Int.*, 2004, 11: 36–42.
17. **Стрелков Р.Б.** Таблицы Стрелкова и экспресс-метод статистической обработки данных. Москва, 1999, 96 с.
18. **Salasznyk R.M., Williams W.A., Boskey A., Batorsky A., Plopper G.E.** Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2004, 1: 24-34.

19. **Ogura N., Kawada M., Chang W., Zhang Q., Lee S., Kondoh T., Abiko Y.** Differentiation of the human mesenchymal stem cells derived from marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin. *J. Oral Sci.*, 2004, 46: 207-213.

20. **Phinney D.G., Kopen G., Isaacson R.L., Prockop D.J.** Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J. Cell Biochem.*, 1999, 72: 570–585.

21. **Moursi A.M., Damsky C.H., Lull J., Zimmerman D., Doty S.B., Aota S.-I., Globus R.K.** Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J. Cell Sci.*, 1996, 109: 1369–1380.

HLA–АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАТИВНЫХ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОКЛЕТОК ФЕТАЛЬНОГО И ПОСТНАТАЛЬНОГО ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Л.Д. Любич, Н.И. Лисяный, В.М. Семенова, Л.П. Стайно

ГУ «Институт нейрохирургии им.акад.А.П.Ромоданова АМН Украины», Киев,
Liubichld@mail.ru

Целью исследования было изучение экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex - МНС или human leucocyte antigens - HLA) нативными и культивируемыми нейроклетками (НК) головного мозга человека разного срока гестации (англ. gestation - период беременности) и различной степени дифференциации на протеиновом уровне и на уровне мРНК с помощью методов иммунофенотипирования и RT-PCR. От уровня экспрессии антигенов HLA на трансплантированных НК зависит способность иммунокомпетентных клеток реципиента распознавать клетки трансплантата и индуцировать специфический ответ, приводящий либо к приживлению, либо к отторжению трансплантата. Установлено, что доля HLA-A,B,C- и HLA-DR-экспрессирующих клеток была наименьшей среди нейроклеток человека 5-й недели гестации, постепенно возрастая к 8-9-й неделе гестации. Экспрессия исследованных аллелей мРНК HLA-A1, и особенно, HLA-DRa1, возрастает от полного отсутствия или незначительных количеств у НК человека 5-9-й недели гестации (нейральных стволовых клеток - НСК и нейральных прогениторных клеток – НПК) до частичной экспрессии у регионарных НСК зрелого мозга (клеток ольфакторной луковицы) и до значительной экспрессии в клетках белого вещества, и, особенно, серого вещества зрелого мозга. В процессе культивирования НК человека 5-9 недели гестации в среде DMEM+ретинола ацетат происходит снижение количества и доли клеток, экспрессирующих антигены HLA I и II класса как на протеиновом уровне, так и на уровне мРНК, тогда как

присутствие в среде факторов роста FGF и EGF способствует сохранению (FGF) или нарастанию (EGF) количества таких клеток. При культивировании в DMEM количество клеток ольфакторной луковицы, экспрессирующих антигены гистосовместимости I и II класса, снижается с 10-х по 20-е сутки.

Ключевые слова: нейроклетки, ольфакторная луковица, белое и серое вещество головного мозга, антигены HLA, иммунофенотипирование, экспрессия мРНК.

Настоящая работа является продолжением предыдущих исследований биологии нейральных стволовых клеток (НСК) и представляет результаты изучения антигенного профиля нативных и культивируемых нейроклеток, выделенных из эмбрионального и постнатального головного мозга человека. Актуальность и практическая значимость изучаемого вопроса обусловлена интенсивно развивающимся и перспективным направлением заместительной терапии при ряде нейродегенеративных заболеваний ЦНС с помощью трансплантации НСК. Несмотря на многочисленные экспериментальные разработки по трансплантации НСК при различной патологии ЦНС, фундаментальные механизмы влияния НСК на клетки мозга-реципиента и клетки иммунной системы остаются недостаточно изученными. Дискуссионным является вопрос о приживлении, длительности выживания нейроаллотрансплантатов, а также об их гистосовместимости с нейроклетками мозга-реципиента и процессах отторжения НСК. Решение этих вопросов позволит более аргументированно использовать НСК при иммунопатологии, а также определит тактику лечебных мероприятий при нейротрансплантации и показания к проведению иммуносупрессии.

Как известно, система главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex - МНС или human leucocyte antigens - HLA) организма осуществляет такие важные физиологические функции, как взаимодействие всех иммунокомпетентных клеток, распознавание собственных измененных и чужеродных клеток, а также запуск и реализацию иммунного ответа. Известно, что антигены МНС I класса в норме экспрессируются практически всеми ядерными клетками (за исключением клеток ранних стадий эмбрионального развития), но их количество колеблется в зависимости от вида ткани и достигает максимума на мембране лимфоцитов всех лимфоидных тканей, а также клеток периферической крови. Антигены МНС II класса значительно реже экспрессируются разными клетками и максимально выражены на фагоцитирующих клетках костного мозга, клетках

Лангерганса, дендритных клетках и не экспрессируются большинством эпителиальных клеток, появляясь только при определенных патологических состояниях.

В отношении экспрессии антигенов HLA I и II классов на НСК эмбрионального и зрелого мозга в настоящее время единого мнения не существует. Показано, что НСК человека *in vitro* экспрессируют только МНС II класса [1]. В клетках фетального мозга наиболее высокий уровень экспрессии молекул МНС класса II свойственен фетальным астроцитам [2, 3].

Целью данного исследования является изучение экспрессии антигенов HLA нативными и культивируемыми нейроклетками (НК), выделенными из фетального и зрелого головного мозга человека.

Материал и методы

Материалом для исследования служили нативные и отобранные из суспензионной культуры на разных этапах культивирования клетки человека: 1) НК фетального мозга 5 - 9 недель гестации, полученные после проведения аборт по медицинским показаниям; 2) НК постнатального мозга из ольфакторной луковицы (ОЛ); 3) из фрагментов коры головного мозга; 4) из фрагментов белого вещества головного мозга. Образцы ОЛ, коры и белого вещества головного мозга получены во время осуществления нейрохирургических доступов при оперативном удалении опухолей у нейроонкологических больных. Суспензионные культуры из всех видов нервной ткани получали по стандартной методике [4]. Определение количества и жизнеспособности клеток проводили с помощью окраски трипановым синим. Для поддержания пролиферации прогениторных нейроклеток (НКП) в бессывороточную культуральную среду DMEM добавляли факторы роста EGF (20 нг/мл, «Sigma») и FGF (10нг/мл, «Sigma»). Дифференцировочный потенциал НК индуцировали с помощью добавления в культуральную среду ретинола ацетата (0,2 мг/мл, «Киевский витаминный завод»). Длительность культивирования НК всех типов составляла 14-20 сут.

Экспрессию антигенов HLA на НК определяли с помощью иммунофенотипирования непрямим иммунофлуоресцентным методом [5]. Клеточные суспензии инкубировали с МКАТ HLA-A,B,C и HLA-DR, а затем с FITC (3АТ «Сорбент-сервис», Москва).

Определение экспрессии мРНК генов HLA (HLA-A1, HLA-DRa, HLA-DQb, СИТА). Экспрессию мРНК антигенов HLA (HLA-A1, HLA-DRa, HLA-DQb, СИТА) определяли с помощью метода RT-PCR (полимеразно-цепная реакция с обратной транскрипцией). Для этого готовили

суспензии НК из всех видов нервной ткани, выделяли из суспензий (5×10^6 клеток в пробе) РНК с помощью набора "Trizol RNA Prep 100" (ООО "Лаборатория Изоген", Россия), переводили РНК в кДНК в реакции обратной транскрипции с помощью наборов «GenePak RT-PCR Core» (ООО "Лаборатория Изоген", Россия). В реакционную смесь вносили 1 мкг РНК.

PCR проводили с использованием 0,2 мкМ праймеров (синтетических олигонуклеотидов) и наборов «GenePak RT-PCR Core» (ООО "Лаборатория Изоген", Россия) в течение 35 циклов с параметрами: 95°C – 15с, 58-62°C – 20с, 72°C – 15с в термоциклере "Терцик" ("ДНК-технология"). Результаты PCR анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с использованием специализированной системы для обработки видеоизображений "Biotest-A". Наличие мРНК считали доказанным в тех образцах, в которых в результате электрофореза в 1,5% геле наблюдалась светящаяся полоса заданной длины при отсутствии такой полосы в отрицательном контроле.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программ "Statistica 5,0".

Результаты и обсуждение

Исследование экспрессии антигенов HLA нативными нейроклетками человека разного срока гестации и нейроклетками из различных регионов зрелого мозга.

Результаты исследования экспрессии антигенов HLA-I и HLA-II нативными НК человека разного срока гестации на протеиновом уровне и на уровне мРНК представлены в табл.1 и 2. По данным иммунофенотипирования (табл.1) доля HLA-A,B,C и HLA-DR-экспрессирующих клеток была наименьшей среди НК человека 5-й недели гестации и постепенно возрастала в НК 8-9-й недели гестации. НК из ОЛ человека, включающие регионарные НСК и НКП мозга, содержали в среднем ($5,05 \pm 3,37$) % HLA-A,B,C+клеток и ($10,72 \pm 6,02$) % HLA-DR+клеток.

По данным RT-PCR (табл. 2) в большинстве образцов нами не зафиксировано экспрессии мРНК исследуемых антигенов HLA НК человека 6-8 недели гестации. Однако, в двух образцах НК 9 недели гестации (из 10 исследованных) выявлена слабая экспрессия HLA-A1 и HLA-DRa1 (НК 5 недели гестации). В НК из ОЛ человека зафиксирована экспрессия мРНК HLA-A1 в одном образце и HLA-Dra1 в 2-х образцах из 4-х (табл. 2).

Таблица 1. Экспрессия антигенов HLA-A,B,C и HLA-DR нативными нейроклетками человека разных сроков гестации (% +клеток)

№	Тип нейроклеток	Срок гестации	HLA-A,B,C+	HLA-DR+
1	Нативные нейроклетки человека (НСК и НКП) из ткани фетального мозга	5-7 недель (n=3)	12,90 \pm 2,30 (8,30-16,30)	12,23 \pm 0,97 (10,30-13,30)
2		8-9 недель (n=3)	18,53 \pm 3,68 (12,40-25,90)	23,17 \pm 7,07 (14,60-37,30)
3	Нативные нейроклетки из ОЛ человека	Взрослые (n=5)	5,05 \pm 3,37 (0-15,03)	10,72 \pm 6,02 (0-22,73)

Таким образом, можно сделать предварительный вывод о том, что НК человека 5-9 недели гестации (НСК и НКП) не экспрессируют мРНК исследованных аллелей HLA-A1, HLA-DRa, HLA-DQb, СИТА или же экспрессируют мРНК в малых количествах, тогда как НК постнатального мозга из ОЛ человека (регионарные НСК зрелого мозга) могут экспрессировать мРНК HLA-A1 и HLA-DRa1 значительно чаще и в больших количествах.

Таблица 2. Определение экспрессии мРНК антигенов HLA (HLA-A1, HLA-DRa, HLA-DQb, СИТА) нативными нейроклетками человека (% положительных образцов)

№	Тип нейроклеток	Срок гестации	Экспрессия мРНК HLA (% положительных образцов)			
			HLA-A1	HLA-DRa	HLA-DQb	СИТА
1	Нативные нейроклетки человека (НСК и НКП) из ткани фетального мозга	5-7 недель (n=6)	-	\pm (7,7%)	-	-
2		8-9 недель (n=4)	\pm (20,0%)	-	-	-
3	Нативные нейроклетки из ОЛ человека	Взрослые (n=4)	\pm (25,0%)	\pm (50,0%)	-	-

Наши наблюдения в целом согласуются с известными данными литературы, хотя единого мнения по этому вопросу нет. Так, по данным Draper J.S. с соавт. [6], ЭСК человека (линия Н7) экспрессируют HLA-A,B,C. По результатам Drukker M. с соавт. [7], экспрессия МНС I класса на поверхности ЭСК человека была очень низкой и возрастала при дифференцировке *in vitro* и *in vivo*, а МНС II класса не экспрессировались на поверхности недифференцированных стволовых и дифференцированных клеток. В исследовании Al Nimer F. с соавт. [1] показано,

что НСК человека *in vitro* экспрессировали только МНС II класса. Результаты фенотипического анализа НСК человека, полученных из ткани 8-12-недельных плодов, показали значительную гетерогенность эмбрионального материала [8]: в образцах, содержащих максимальную долю стволовых и мультипотентных предшественников нейрального ряда и минимум зрелых клеток, количество HLA-A,B,C+клеток составляло (6,4-13,9)%, HLA-DR+клеток – (3,0-9,8)% [9].

В наших исследованиях образцов НК из головного мозга взрослых людей (табл. 3) обнаружено, что НК из серого вещества экспрессировали мРНК HLA-A1 (1 случай из 3) и HLA-DRa1 (во всех исследованных случаях). НК из белого вещества экспрессировали мРНК HLA-A1 (2 случая из 7) и HLA-DRa1 (4 случая из 7). Кроме того, в этой серии опытов НК из серого и белого вещества головного мозга в одном образце экспрессировали мРНК СИТА, что указывает на возможность индукции повышения экспрессии антигенов HLA под влиянием провоспалительных агентов.

Сопоставление уровней экспрессии антигенов HLA в НК из фетального и зрелого мозга показало (табл.3), что экспрессия мРНК исследованных аллелей HLA-A1, и особенно, HLA-DRa1, возрастает от полного отсутствия или незначительного уровня в НК человека 5-9 недели гестации (НСК и НКП) до частичной экспрессии в регионарных НСК зрелого мозга (клетки ОЛ) и до значительно выраженной экспрессии в НК из белого вещества, и особенно из серого вещества зрелого мозга.

Таблица 3. Экспрессия мРНК антигенов HLA (HLA-A1, HLA-DRa, HLA-DQb, СИТА) нативными НК из различных регионов мозга человека

Образец	Количество	Экспрессия мРНК HLA (% положительных образцов)			
		HLA-A1	HLA-DRa	HLA-DQb	СИТА
НК человека 5-9 недель гестации	n=10	± (6,0)	± (6,0)	-	-
НК из ОЛ человека	n=4	+ (25,0)	+ (50,0)	-	-
НК из белого вещества	n=7	+ (28,6)	++ (57,1)	-	± (14,3)
НК из серого вещества	n=3	+ (33,3)	++ (100,0)	-	+ (33,3)

Полученные в наших исследованиях количественные отличия в экспрессии мРНК HLA-A1 и HLA-DRa в НК из серого и белого вещества зрелого мозга объясняются различиями в составе клеточных популяций и их способностью к экспрессии антигенов МНС, на что указывают известные данные литературы [10-15].

Следует отметить, что в литературе имеются достаточно неоднозначные сведения относительно экспрессии антигенов МНС на разных типах клеток зрелого мозга в пределах ЦНС. Микроглиальные клетки или макрофаги мозга - нейроглиальный компонент ЦНС, имеющий мезенхимное происхождение - играют важную роль как резидентные иммунокомпетентные и фагоцитирующие клетки в ЦНС при инфекциях, воспалении, травме, ишемии, нейродегенерации, и считаются наиболее квалифицированными нейральными антигенпредставляющими клетками (АПК). В состоянии покоя клетки микроглии дефицитны по МНС-детерминантам, но после цитокиновой индукции (а также при нейродегенеративных процессах) приобретают способность к экспрессии МНС-антигенов обоих классов [10, 11] и к презентации антигена специфическим Т-клеткам, а также к экспрессии костимуляторных молекул (B7-1,-2). То есть, после цитокиновой индукции микроглиальные клетки приобретают иммунологический потенциал, подобный профессиональным АПК на периферии. Индукция на клетках микроглии МНС II класса является чувствительным индикатором патологических процессов в ЦНС. Кроме того, активированная микроглия может экспрессировать высокие уровни МНС-специфических транскрипционных факторов RFX, CIITA, а также высокие уровни МНС I и II классов, тогда как астроциты и олигодендроциты не экспрессируют или слабо экспрессируют эти факторы [12].

Однако астроциты способны экспрессировать МНС II класса в ответ на действие гамма-глобулина (IFN- γ) [13]. Культивированные клетки гематоэнцефалического барьера (эндотелиоциты) и олигодендроциты экспрессируют их в меньшей степени, но в условиях провоспалительного окружения или после индукции IFN- γ эндотелиальные клетки зрелого мозга человека экспрессировали HLA-DR [14].

В культуре нейроны, выделенные из гиппокампа мышей C57BL/6, не экспрессировали МНС I класса на плазматической мембране, но обнаруживали их экспрессию при индукции IFN- γ (в течение 72 час), если нейрональная активность была заблокирована тетродотоксином; иммуногистохимически экспрессия МНС I класса определялась как на телах нейронов, так и на их отростках [15]. По данным Lampson L.A. [16], значительной экспрессии HLA-A,B,C не наблюдалось ни на одной из стадий развития нормальных нейронов. Функционально активные нейроны угнетают экспрессию МНС на окружающих астроцитах и микроглиальных клетках, а также снижается их собственная МНС-индуцибельность [13].

Исследование экспрессии антигенов HLA культивируемыми нейроклетками человека разного срока гестации и нейроклетками из ОЛ зрелого мозга.

Результаты исследования экспрессии антигенов HLA-A,B,C и HLA-DR на протеиновом уровне НК человека в динамике культивирования (рис.1а,б) показывают, что культивирование НК человека 5-9 нед гестации в присутствии ретинола ацетата способствовало уменьшению в 2,3 раза абсолютного количества и доли клеток, экспрессирующих антигены гистосовместимости I класса. Добавление в среду митогенных факторов роста (EGF, FGF) способствовало сохранению количества этих клеток (FGF) в течение культивирования или восстанавливало их количество (EGF) к 14-м сут культивирования. Культивирование НК человека 5-9 нед гестации в присутствии ретинола ацетата способствовало уменьшению в 4-5 раз абсолютного количества и доли клеток, экспрессирующих антигены гистосовместимости II класса (HLA-DR), тогда как добавление в среду факторов роста сохраняло их количество (в среде с FGF) в течение культивирования или увеличивало вдвое (в среде с EGF) к 14-м сут культивирования. Таким образом, в наших исследованиях добавление в культуральную среду факторов роста способствовало экспрессии антигенов гистосовместимости I и II класса фетальными нейроклетками человека.

При культивировании *in vitro* в среде DMEM без добавления ростовых факторов клеток из ОЛ доля HLA-A,B,C+ и HLA-DR+клеток, то-есть клеток, экспрессирующих антигены гистосовместимости I и II класса, снижалась с 10-х по 20-е сут в 2-5 раз. Таким образом, в этих условиях экспрессия антигенов гистосовместимости на уровне протеинов снижалась как в случае фетальных нейроклеток, так и в случае клеток из ОЛ.

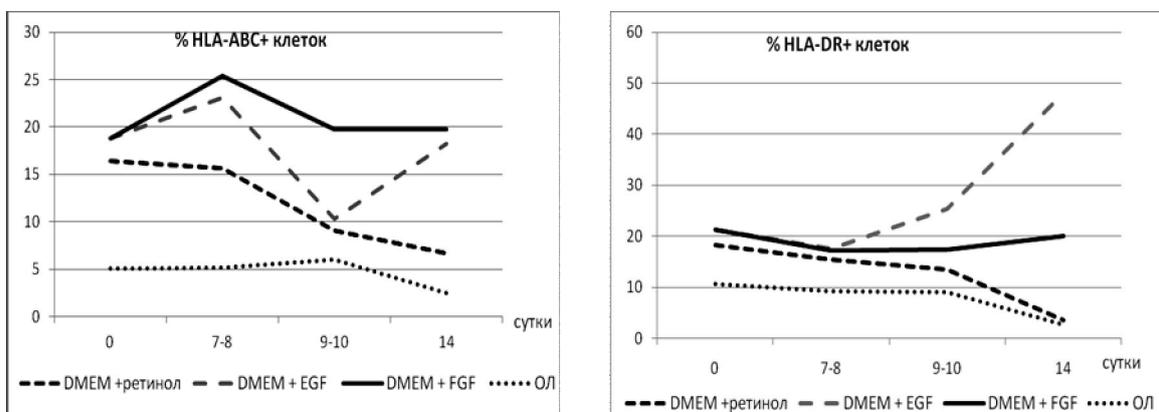


Рис.1 а, б. Влияние культивирования на экспрессию антигенов HLA-A,B,C и HLA-DR нейроклетками человека 5-9 нед гестации и нейроклетками из ОЛ (% +клеток)

Исследование на уровне мРНК (табл.4) показало, что культивирование НК в течение 14 сут в среде DMEM не влияло на экспрессию мРНК генов HLA: только в одном образце (9 нед гестации) зафиксирована слабая экспрессия мРНК HLA-DRA1 на 12-е сут культивирования в DMEM. Добавление в культивационную среду ретинола ацетата, EGF, FGF не индуцировало экспрессию мРНК антигенов HLA в НК человека. Следовательно, влияние ростовых факторов различается на протеиновом уровне и на уровне мРНК; или же нам не удалось на данном этапе исследований зафиксировать это влияние на уровне мРНК в нейроклетках человека при культивировании. Полученные данные согласуются с некоторыми известными, хотя и противоречивыми данными литературы. По данным Hassan-Zahraee M. с соавт. [2], при культивировании *in vitro* нейральных прекурсоров человека по мере роста нейросфер увеличивалась экспрессия HLA I и II класса. По данным Guerini F.R. с соавт. [17], культивирование НСК сопровождалось снижением экспрессии антигенов MHC I класса. В культурах клеток фетального мозга человека наблюдалась экспрессия HLA-DR в цитоплазме и на клеточной поверхности GFAP+астроцитов, увеличивающаяся при длительном культивировании и в пассированных культурах [7]. Добавление в среду bFGF увеличивало экспрессию HLA I класса и индуцировало низкую HLA-DR экспрессию на МСК [16].

По нашим данным, определенная часть (10-17%) НК человека 5-9 недель гестации экспрессирует на своей поверхности антигены MHC II класса. В процессе культивирования в среде DMEM+ретинола ацетат происходит снижение абсолютного количества и доли клеток, экспрессирующих антигены HLA I и II класса как на протеиновом уровне, так и на уровне мРНК, тогда как под влиянием факторов роста количество клеток, экспрессирующих антигены HLA I и II класса на протеиновом уровне, сохраняется (FGF), либо увеличивается (EGF).

Таблица 4. Экспрессия мРНК антигенов HLA нейроклетками человека в динамике культивирования

Образец	Сутки культивирования	Экспрессия мРНК HLA (% положительных образцов)	
		HLA-A1	HLA-DRA
НК человека 5-9 нед гестации DMEM+ретинол	0	± (5,6%)	± (5,6%)
	6-7	± (16,7%)	-
	9-10	-	-
	12-14	-	± (20,0%)
ОЛ	0	+ (25,0%)	+ (50,0%)
DMEM	10	+ (33,3%)	+ (33,3%)
	20	-	-

Необходимо отметить, что исследованные молекулы HLA кодируются генами, отличающимися очень высоким полиморфизмом [18, 19], но в задачи данного исследования не входило изучение частоты экспрессии разных аллелей указанных генов. В этой работе мы стремились проанализировать уровень экспрессии случайно выбранных аллелей HLA (HLA-A1, HLA-DRa1, HLA-DQb1) в зависимости от степени дифференцировки НК. По нашим данным сопоставление экспрессии антигенов HLA клетками фетального и зрелого мозга показало, что экспрессия мРНК HLA-A1, и особенно HLA-DRa1, возрастала от полного отсутствия или незначительных количеств в НК человека 5-9 недели гестации (НСК и НПК) до частичной экспрессии в регионарных НСК мозга взрослого человека (клетки ОЛ) и до значительной экспрессии в клетках белого вещества, и, особенно, серого вещества головного мозга взрослого человека.

Количественные различия, выявленные при исследовании экспрессии в НК антигенов HLA на уровне мРНК и на протеиновом уровне, могут объясняться различием в чувствительности методов RT-PCR и иммуноцитохимии. Так, использование методов молекулярно-генетического HLA-типирования позволяет определять более 2000 аллельных вариантов генов HLA, тогда как типирование на уровне продуктов генов HLA – антигенов HLA позволяет выявлять только 200 специфичностей (материалы 14-й Европейской конференции по гистосовместимости, Франция, 2000 г.). Сегодня их известно уже намного больше [18,19], для каждой молекулы HLA существует большое число разных аллелей [19]. Очевидно, что указанные методы необходимо применять в комплексе.

По нашим наблюдениям, в процессе культивирования НК в среде без ростовых факторов экспрессия антигенов гистосовместимости на уровне протеинов снижалась как в случае фетальных нейроцитов, так и в случае клеток из ОЛ. В то же время, культивирование фетальных нейроцитов в присутствии ростовых факторов FGF и EGF способствовало сохранению или даже возрастанию экспрессии антигенов гистосовместимости на уровне протеинов. Поскольку экспрессия антигенов гистосовместимости является одним из условий развития реакции отторжения трансплантированных клеток, в случае клинического применения культивируемых НСК и НПК необходимо учитывать: 1) возможность экспрессии антигенов гистосовместимости на трансплантированных клетках в условиях провоспалительного микроокружения; 2) возможность экспрессии антигенов гистосовместимости на культивированных НСК и НПК при условии применения ростовых факторов для наращивания количества НК перед предполагаемой нейротрансплантацией. В

связи с этим, с нашей точки зрения, необходимым является применение иммуносупрессии для нивелирования реакций иммунного отторжения при клинических трансплантациях НСК и НПК из фетального или зрелого мозга.

Выводы

1. На НК человека фетального и постнатального головного мозга выявляется экспрессия антигенов гистосовместимости I и II класса: НК человека 5-9 нед гестации содержат в среднем 15,7% HLA-A,B,C+ клеток и 17,0% HLA-DR+ клеток; клетки ОЛ человека содержат в среднем 5,05% HLA-A,B,C+клеток и 10,7% HLA-DR+клеток. Количество HLA-A,B,C- и HLA-DR-экспрессирующих клеток было минимальным среди нейроклеток человека 5-й нед гестации, постепенно возрастая к 8-9-й нед гестации.

2. Экспрессия антигенов HLA на уровне мПНК зависит от типа нейроклеток и их возраста: экспрессия мПНК HLA-A1, и особенно, HLA-DRa1, возрастает от полного отсутствия или незначительных количеств в НСК и НПК человека 5-9-й нед гестации до частичной экспрессии в регионарных НСК зрелого мозга (клетки ОЛ) и до значительной экспрессии в клетках белого вещества, и особенно, серого вещества головного мозга взрослого человека.

3. При культивировании НК экспрессия антигенов HLA изменяется: в процессе культивирования в среде DMEM+ретинола ацетат происходит снижение абсолютного количества и доли клеток, экспрессирующих антигены HLA I и II класса как на протеиновом уровне, так и на уровне мПНК, тогда как под влиянием факторов роста FGF и EGF количество клеток, экспрессирующих антигены HLA I и II класса на протеиновом уровне, сохраняется (FGF), либо увеличивается (EGF).

4. Особенности выявленного HLA-антигенного профиля НК человека указывают на необходимость применения иммуносупрессии при нейротрансплантации клеток эмбрионального и фетального мозга.

Список литературы

1. **Al Nimer F., Wennersten A., Holmin S., Meijer X., Wahlberg L., Mathiesen T.** MHC expression after human neural stem cell transplantation to brain contused rats. Neuroreport, 2004, 15, 2: 1871-1875.

2. **Hassan-Zahraee M., Ladiwala U., Lavoie P.M., McCrea E., Sekaly R.P., Owens T., Antel J.P.** Superantigen presenting capacity of human astrocytes. J. Neuroimmunol., 2000, 102, 2: 131-136.

3. **McLaren F.H., Svendsen C.N., Van der Meide P., Joly E.** Analysis of neural stem cells by flow cytometry: cellular differentiation modifies patterns of MHC expression. *J. Neuroimmunol.*, 2001, 112, 2: 35-46.
4. **Зозуля Ю.А., Лисяный Н.И., Любич Л.Д., Грищенко В.И., Петренко А.Ю., Бабийчук Г.А.** Длительное культивирование *in vitro* криоконсервированных и нативных нейроклеток эмбрионов человека. *Укр. Нейрохірургічний журнал*, 2003, 2: 11-14.
5. **Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В., Климова С.В., Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Бахус Г.О.** Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. *Пособие для врачей-лаборантов*. 2001, М.: 48-53.
6. **Draper J.S., Pigott C., Thomson J.A., Andrews P.W.** Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J. Anat.*, 2002, 200, 3: 249-258.
7. **Drukker M., Katz G., Urbach A., Schuldiner M., Markel G., Itskovitz-Eldor J., Reubinoff B., Mandelboim O., Benvenisty N.** Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *PNAS USA*, 2002, 99, 15: 9864-9869.
8. **Полтавцева Р.А., Марей М.В., Дубровина И.В. А.В.Ревизин, М.А.Александрова, Л.И.Корочкин, Г.Т.Сухих.** Развитие и дифференцировка мультипотентных нейральных клеток человека *in vitro*. *Доклады Академии Наук*, 2001, 379, 6: 845-849.
9. **Poltavtseva R.A., Marey M.V., Aleksandrova M.A., Revishchin A.V., Korochkin L.I., Sukhikh G.T.** Evaluation of progenitor cell cultures from human embryos for neurotransplantation. *Brain Res.Dev.Brain Res.*, 2002, 134, 1-2: 149-154.
10. **Cassiani-Ingoni R., Cabral E.S., Lünemann J.D., Garza Z., Magnus T., Gelderblom H., Munson P.J., Marques A., Martin R.** *Borrelia burgdorferi* induces TLR1 and TLR2 in human microglia and peripheral blood monocytes but differentially regulates HLA-class II expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2006, 65, 6: 540-548.
11. **Imamura K., Hishikawa N., Ono K., Suzuki H., Sawada M., Nagatsu T., Yoshida M., Hashizume Y.** Cytokine production of activated microglia and decrease in neurotrophic factors of neurons in the hippocampus of Lewy body disease brains. *Acta Neuropathol.*, 2005, 109, 2: 141-150.
12. **Nagai A., Mishima S., Ishida Y. Ishikura H., Harada T., Kobayashi S., Kim S.U.** Immortalized human microglial cell line: phenotypic expression. *J. Neurosci. Res.*, 2005, 81, 3: 342-348.
13. **Neumann H., Wekerle H.** Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurology*, 1998, 57, 1: 1-9.
14. **Van der Maesen K., Hinojoza J.R., Sobel R.A.** Endothelial cell class II major histocompatibility complex molecule expression in stereotactic brain biopsies of patients with acute inflammatory/demyelinating conditions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1999, 58, 4: 346-358.
15. **Medana I., Martinic M.A., Wekerle H., Neumann H.** Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T-lymphocytes. *American J. of Pathology*, 2001, 159, 3: 809-815.
16. **Lampson L.A.** Biological significance of HLA-A, B, C expression in neuroblastoma and related cell lines. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1988, 271: 409-420.
17. **Guerini F.R., Agliardi C., Zanzottera M., Delbue S., Pagani E., Tinelli C., Boldorini R., Car P.G., Veggiani C., Ferrante P.** Human leucocyte antigen distribution analysis in North Italian brain Glioma patients: an association with HLA-DRB1*14. *J. Neuro-Oncology*, 2006, 77: 213-217.
18. **Lafon M., Prehaud C., Megret F. Lafage M., Mouillot G., Roa M., Moreau P., Rouas-Freiss N., Carosella E.D.** Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. *J. Virol.*, 2005, 79, 2: 15226-15237.

19. Schreuder G.M., Hurley C.K., Marsh S.G., Lau M., Fernandez-Vina M.A., Noreen H.J., Setterholm M., Maiers M. HLA dictionary 2004: summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. Hum. Immunol., 2005, 66, 2: 170-210.

КЛЕТочНАЯ БИотехнология И Тканевая Инженерия

БИологическая Активность Внеклеточных Гистонов И Перспективы Их Исползования В Биотехнологии

О. А. Горюхина,^{1} Г. П. Пинаев²*

¹ Кафедра биохимии Санкт-Петербургского государственного университета,

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; * pushkeen@gmail.com

В настоящем кратком обзоре суммированы данные литературы и собственные данные о действии внеклеточных гистонов на функции различных типов клеток. Рассмотрены перспективы создания транспортных систем на основе гистонов для целенаправленной доставки лекарственных средств, которые самостоятельно не проходят через клеточные мембраны и тканевые барьеры. Исследована возможность использования гистонов, иммобилизованных на микросферах, для модификации поверхностей, предназначенных для культивирования клеток. Показано, что гистоны, иммобилизованные на микросферах и нанесенные на поверхность культуральных сосудов, способствуют адгезии культивируемых клеток разного происхождения, их пролиферации и формированию сети клеточных структур за счет образования межклеточных контактов и одновременного взаимодействия клеток с несколькими микросферами. Рассматривается возможность использования подобных микросфер в качестве компонентов при создании трехмерных пористых матриц, предназначенных для формирования в них тканеподобных клеточных структур *in vitro*.

Ключевые слова: внеклеточные гистоны, конъюгаты лекарственных средств с белками-носителями, микросферы, адгезия, пролиферация культивируемых клеток.

Гистоны - катионные (основные) белки, которые содержатся в ядрах клеток всех тканей животных и растений. Различают пять классов гистонов, которые детально охарактеризованы и изучены (1). Классы гистонов имеют следующие обозначения: гистон H1 (богатый лизином),

гистон H2B (умеренно богатый лизином), гистон H2A (богатый аргинином и лизином), гистон H3 (богатый аргинином), гистон H4 (богатый аргинином и глицином).

В настоящее время, имеется достаточное количество данных, которые позволяют предполагать, что биологическая роль гистонов не ограничена их участием в компактизации ДНК. Гистоны обнаруживаются и во внеклеточном пространстве (2–4). Они выявлены на поверхности лейкоцитов (5), Raji-клеток африканской лимфомы Беркитта (6), цитолитических лимфоцитов (7), моноцитов (8), мышинных В-клеток (9) и на плазматической мембране клеток эндотелия сосудов пупочного канатика (10). Кроме того, показано, что гистон H1, связанный с перлеканом, присутствует во внеклеточном матриксе культур мышечных клеток линии C₂C₁₂ и в регенерирующей скелетной мышце, и принимает участие в стимуляции пролиферативной активности миобластов (3). Наряду с этим, показано, что внеклеточный гистон H1, идентифицированный на поверхности культивируемых макрофагов, действует как тироглобулин-связывающий белок, который опосредует его эндоцитоз (2).

Предполагают, что гистоны высвобождаются при апоптозе и распаде клеток в очагах воспаления и экспонируются на поверхности различных типов клеток. Так обнаружено, что коровые гистоны (H2A, H2B, H3 и H4) при апоптозе части активированных Т-клеток линии NBV-ALL высвобождаются во внеклеточное пространство и связываются с клеточной поверхностью морфологически неизмененных Т-клеток (11). Кроме того, показано, что коровые гистоны высвобождаются из лимфоцитов периферической крови человека на ранних стадиях апоптоза и стимулируют синтез иммуноглобулинов нормальных лимфоцитов (12).

Имеется большее количество данных, которые показывают, что экзогенные гистоны при их добавлении к различным типам клеток оказывают выраженные эффекты. Так например, экзогенные гистоны при добавлении к клеткам лимфомы в культурах el-4 и S-49 усиливают клеточное деление (13), оказывают выраженный пролиферативный эффект на миобласты в культуре линии клеток C₂C₁₂ (3), индуцируют дифференцировку мышинных миелоидных лейкемических клеток (M1) в макрофагоподобные и гранулоцитоподобные клетки (14). Кроме того, экзогенные гистоны оказывают стимулирующий эффект на дифференцировку и созревание культивируемых антиген-представляющих дендритных клеток из костного мозга самцов крыс, синтезирующих главный комплекс гистосовместимости - гаплотип RTJ (15), а также стимулируют фагоцитоз (16-18).

Наряду с этим, в многочисленных исследованиях показано, что гистоны подавляют размножение некоторых опухолевых клеток. Анализ данных литературы по влиянию гистонов

на опухолевые клетки показал, что их эффект зависит как от типа гистоновых фракций, так и от вида ткани, из которой получены гистоны. Хотя механизм действия гистонов на опухолевые клетки изучен недостаточно, многие исследователи связывают цитотоксический эффект гистонов с их способностью воздействовать на поверхность мембран. Так показано, что цитотоксический эффект гистона Н1 на лейкемические клетки опосредован через определенные рецепторы, экспонированные на поверхности мембран только у опухолевых клеток (19). Была исследована, также, цитотоксичность гистонов Н2А и Н2В в отношении клеток шести линий, полученных из В-лимфоцитов больных злокачественной лимфомой. При этом было показано, что гистоны Н2А и Н2В не только задерживают рост злокачественных клеток лимфомы, но и полностью убивают их. Наряду с этим, гистоны Н2А и Н2В в незначительной степени задерживают рост нормальных лимфоцитов (20).

Экзогенные гистоны уже давно известны как антибактериальные и противовирусные агенты (21-23), а также как факторы, повышающие неспецифическую резистентность организма благодаря способности опсонизировать бактерии и стимулировать фагоцитарную и бактерицидную активность макрофагов (17). При этом гистоны характеризуются низкой токсичностью и не обладают анафилактической активностью. К настоящему времени установлены LD_{50} (средняя летальная доза) и переносимые дозы различных классов гистонов при однократном и многократном введении животным различными путями. Они оказались весьма значительными. Так, например, суммарные переносимые дозы при ежедневном внутрибрюшинном введении в течение месяца белым мышам для разных классов гистонов составляют от 360 до 1500 мг/кг, причем наименее токсичными оказались аргининбогатые гистоны (21).

Известно, что гистоны благодаря низкому содержанию ароматических аминокислот, низкому молекулярному весу, высокому положительному заряду и высокой чувствительности к протеолитическим ферментам являются слабыми антигенами. В наших исследованиях было проведено изучение иммуногенных свойств препаратов суммарного гистона тимуса теленка, предназначенного для многократного внутривенного введения животным в терапевтической дозе (7 мг на 1 кг массы животного). Анализ сывороток животных, иммунизированных суммарным гистоном по специальной схеме с применением полного адъюванта Фрейнда, показало отсутствие выраженного гуморального иммунного ответа в отношении продукции антител как к гистону Н1, так и к коровым гистонам (титры сывороток при использовании в качестве антигена гистона Н1 колебались в пределах 1:64-1:256, а титры этих сывороток в

отношении коровых гистонов были значительно ниже и составляли 1:20) (24). Следовательно за счет высокой устойчивости к ним животных длительное (в течение 1 мес) ежедневное введение гистонов в дозе 0,1 LD₅₀ может быть широко использовано в опытах *in vivo* как практически безвредное. Совокупность благоприятных свойств гистонов делает понятным интерес к гистонам как возможным фармакологическим агентам.

Особый интерес вызывает способность гистонов быстро проходить через клеточные мембраны посредством эндоцитоза, а также повышать проницаемость мембран для других веществ, в том числе и для полимерных соединений (25, 26). В этих исследованиях было показано, что относительная скорость поступления гистонов в опухолевые клетки линии саркомы-180 зависит от содержания в их составе аргинина. Так при культивировании клеток в присутствии различных классов гистонов в среде Игла, не содержащей сыворотку, в течение 1 ч при комнатной температуре поглощение клетками аргининбогатого гистона составляло 1.0 мкг, суммарного гистона - 0.8 мкг, а лизинбогатого гистона - 0.15 мкг на 1 мг общего белка клеток. Это указывает на то, что эффект проникновения гистонов через клеточные мембраны зависит от содержания в их молекулах основных аминокислот – лизина и аргинина.

Наряду с этим было обнаружено, что при культивировании опухолевых клеток в среде Игла, содержащей 1% сыворотку телят, в течение 2 ч при комнатной температуре, поглощение клетками добавленного [¹³¹I] альбумина увеличивается в 15 и 12 раз в присутствии аргининбогатого гистона или суммарного гистона в концентрации 30 мкг на 1 мл среды соответственно. Однако, в присутствии лизинбогатого гистона при той же концентрации белка поглощение клетками альбумина увеличивается только в 1.5 раза. Таким образом, наблюдается корреляция между поглощением клетками различных классов гистонов и их способностью стимулировать поглощение клетками альбумина. Было показано также, что при экспозиции гистонов с клетками в концентрации 30 мкг на 1 мл культуральной среды не наблюдается повреждения клеточных мембран. Более того, при субкультивировании клеток после экспозиции с гистонами их скорость роста не отличалась от скорости роста клеток в контроле. Однако, при экспозиции клеток с гистонами в концентрации более 100 мкг на 1 мл культуральной среды наблюдаются такие аномальные клеточные реакции, как их открепление от поверхности стекла, образование агрегатов клеток и повреждение клеточных мембран.

Следует отметить, что повреждающее действие высоких концентраций гистона на клетки зависит от типа клеток, которые подвергаются их обработке. Так известно, что повреждающие

концентрации лизинбогатого гистона для нормальных эукариотических клеток лежат в пределах 200-250 мкг, для опухолевых клеток – 150-200 мкг, а для бактериальных клеток менее 80 мкг на 1 мл инкубационной среды (22).

Приведенные данные позволяют считать, что при низких концентрациях гистоны могут быть использованы в качестве транспортных систем для доставки в ткани и органы ряда лекарственных средств, самостоятельно не проникающих через клеточные мембраны и тканевые барьеры. Это достигается путем ковалентного связывания транспортируемого лиганда к белку, который в норме претерпевает рецепторно-опосредованный трансцитоз через клеточные мембраны.

В наших исследованиях было показано, что экзогенный гистон проходит через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в паренхиму мозга крыс после введения его в сонную артерию анестезированных животных в опытах *in vivo* (27). Также были получены растворимые конъюгаты гистонов с лекарственными веществами (28). Было установлено, что экзогенные гистоны проходят через эндотелий капилляров мозга, т.е. через ГЭБ, и способствуют прохождению ковалентно связанных с ними веществ, не проходящих в норме через ГЭБ (29-31).

Другим важным свойством гистонов является их способность оказывать положительное действие на адгезию, пролиферацию и клональный рост клеток в культуре. Было обнаружено, что успешному размножению одиночных клеток способствует покрытие поверхности положительно заряженными белками, в частности гистонами (32). Кроме того, показано, что гистоны содержат гепарин-связывающие домены, способные взаимодействовать с протеогликанами клетки, которые могут контактировать с поверхностными рецепторами и индуцировать внутриклеточные сигналы, сопровождающиеся реорганизацией цитоскелета (33, 34).

Как правило, культивирование клеток производят в специальных культуральных сосудах, изготовленных из полистирола, поверхность которого обрабатывают различными способами, чтобы создать на ней положительный заряд. Так как общий поверхностный заряд клеток отрицательный, такая обработка поверхности культуральных сосудов способствует прикреплению к ней культивируемых клеток.

При культивировании в монослое прикрепившиеся клетки начинают синтезировать и секретировать в среду белки внеклеточного матрикса, которые позволяют им распластываться на субстрате и осуществлять разнообразные физиологические функции:

пролиферацию, миграцию, образование межклеточных контактов и многие другие. Не все клетки легко прикрепляются к поверхности культуральных сосудов, и в этих случаях поверхность предварительно покрывают такими мажорными белками внеклеточного матрикса, как коллаген, фибронектин или ламинин. Взаимодействие клеток с этими белками осуществляется с помощью поверхностных адгезионных рецепторов – интегринов (35).

Наряду с этим для увеличения адгезионной способности некоторых типов клеток требуется нанесение на поверхность пластика положительно заряженных белков или пептидов. Для этих целей используют поли-L-лизин или синтетические пептиды, содержащие в своем составе остатки основных аминокислот, которые предварительно ковалентно связывают с гиалуроновой кислотой, нанесенной на поверхность субстрата (32, 36-38). В этом плане использование гистонов для покрытия поверхности субстрата может оказаться перспективным, поскольку в отличие от пептидов в молекуле гистонов имеются различные домены для связывания с клеточной поверхностью.

В настоящее время интенсивно развиваются клеточные технологии, направленные на лечение травм и тяжелых заболеваний человека с помощью стволовых и других клеток. Для этих целей используются нормальные клетки, выделенные из организма. Эти клетки до пересадки в поврежденное место переводят в культуру, размножают и даже проводят направленную дифференцировку. Недостатком терапии с помощью клеток, культивируемых на поверхности субстрата, является предварительный перевод клеток из их исходного трехмерного существования в тканях живого организма в культуру, где они растут на плоских поверхностях. При этом они теряют естественное микроокружение, изменяют свою форму и функциональные способности, что сказывается на эффективности их дальнейшего участия в процессах регенерации при имплантации в поврежденные ткани.

В связи с этим, в последнее время интенсивно развивается новое направление, получившее название тканевой инженерии, суть которого состоит в культивировании клеток в трехмерном пространстве, образуемом специально разработанными пористыми полимерными матрицами с целью получения тканеподобных структур для их дальнейшей трансплантации в организм человека (34). Большинство из разработанных к настоящему времени полимеров имеют гидрофобную поверхность, которую необходимо модифицировать для лучшего взаимодействия с ней клеток. Для этой цели пытаются использовать компоненты внеклеточного матрикса или другие адгезивные молекулы (39-42). Однако модификация поверхности должна способствовать не только прикреплению к ней клеток, но также

стимуляции их размножения и образованию межклеточных контактов. Приведенные выше данные позволяют предположить, что экзогенные гистоны в качестве агента, модифицирующего поверхность создаваемой матрицы, могут оказывать положительное влияние на создание тканеподобных клеточных структур.

На характер прикрепления клеток к субстрату и их поведение оказывает влияние не только химический состав субстрата, но и топография его поверхности, от которой будет зависеть организация и физиологическая активность формирующихся клеточных структур (43-45). В настоящее время разработаны специальные технологии для конструирования поверхности субстрата с определенной микроконфигурацией. Для получения таких поверхностей используют технику фотолитографии с целью создания желаемой топографии поверхности, содержащей адгезивные и неадгезивные области для клеток (46, 47). Такие поверхности используются, например, при сокультивировании клеток для целей тканевой инженерии (37).

Известно исследование (48), в котором авторы оценивали судьбу эндотелиальных клеток (выживание, пролиферацию и апоптоз) на субстратах, содержащих адгезивные островки, покрытые фибронектином на неадгезивной поверхности. Для создания таких субстратов, содержащих адгезивные островки, расположенные на определенных расстояниях друг от друга и имеющие различные размеры, используют метод микроконтактного принтинга (отпечатка). В этом исследовании было показано, что когда адгезивные островки, покрытые фибронектином, отстоят друг от друга на дистанциях, достаточных для того, чтобы клетка взаимодействовала только с одним адгезивным островком, выживание клеток коррелирует с площадью поверхности данного островка. Однако иная картина наблюдается, когда адгезивные островки, покрытые фибронектином, имеют диаметр от 3 до 5 мкм и расположены друг от друга на расстоянии 10 мкм. В этом случае клетка взаимодействует со многими адгезивными островками и занимает большую площадь поверхности субстрата. Показано, что на такой поверхности субстрата скорость пролиферации и выживание клеток коррелируют с доступностью, количеством и распределением адгезивных островков, при этом клетки за счет формирующихся псевдоподий имеют возможность взаимодействовать между собой.

В качестве модели, позволяющей выявить реакцию клеток на модифицированную поверхность субстрата и его пространственную организацию, могут служить микросферы, покрытые гистонами и расположенные на поверхности культурального сосуда. В наших исследованиях для модификации поверхности субстрата и его пространственной организации были использованы микросферы с иммобилизованными на их поверхности гистонами с целью

выявления возможности их применения для топографической модификации поверхностей, предназначенных для трехмерного культивирования клеток (49). При этом микросферы должны были иметь оптимальные размеры и располагаться на субстрате на таком удалении друг от друга, чтобы клетки были способны одновременно взаимодействовать с несколькими микросферами, рассредоточенными в пространстве. Для этого получали микросферы диаметром не более 1,0 мкм из кристаллизованного декстрана. Такой диаметр микросфер соответствует размеру фокального контакта, образующегося при прикреплении клетки к субстрату (50). Кроме того, при нанесении на поверхность культурального сосуда микросферы располагались на нем на расстоянии друг от друга, не превышающем площади распластанной клетки, что способствовало одновременному взаимодействию каждой отдельной клетки с несколькими микросферами.

При использовании такого подхода был проведен сравнительный анализ взаимодействия клеток постоянной линии почки эмбриона человека, 293, трансформированной Ad5 вирусом, и спонтанно трансформированных эмбриональных фибробластов мыши линии BALB/3T3 клон A31, с гистонами разных типов, иммобилизованными на микросферах. Было показано, что все исследованные классы гистонов обладали адгезивной способностью, но их комплексы в виде суммарного гистона и коровых гистонов оказывали наилучшее действие на распластывание и морфологию клеток и способствовали их более интенсивной пролиферации. При этом клетки, посеянные на субстраты, содержащие перекрестно сшитые конъюгаты гистоновых комплексов, иммобилизованные на микросферах, в большей степени способствовали формированию сети клеточных структур за счет образования межклеточных контактов и одновременного взаимодействия клеток с несколькими микросферами. Такие субстраты аналогичны матрицам, более широко известным в литературе как скаффолды, которые используют для культивирования клеток с целью образования сложной композиции клеток для формирования тканеподобных клеточных структур, предназначенных для клеточной терапии (51, 52).

Представленные данные можно рассматривать как первые шаги, свидетельствующие о перспективности попыток практического использования гистонов:

- во-первых, в качестве транспортных средств, обеспечивающих доступ ковалентно связанных с ними лигандов к месту действия. Транспортные системы на основе гистонов могут быть потенциальным средством для транспорта традиционных лекарственных средств, самостоятельно не проходящих через клеточные мембраны и тканевые барьеры, а также

сайт-специфической доставки к мишени (органу или ткани), потенцирования и пролонгирования действия, резистентности к деградации и др.;

- во-вторых, для клеточной терапии, проводимой с помощью клеток, культивируемых в трехмерном пространстве. Положительные результаты проведенных исследований по использованию микросфер, покрытых гистонами, с целью выявления возможности культивирования клеток на модифицированной поверхности субстрата по существу показали, что микросферы, покрытые гистонами, могут быть использованы в дальнейшем в качестве компонентов при создании трехмерных пористых матриц, предназначенных для формирования в них тканеподобных клеточных структур *in vitro*. Такие матрицы могут быть использованы для имплантации клеток в поврежденные области для дальнейшего их участия в процессах регенерации ткани.

Список литературы

1. **Isenberg I.** Histones. *Ann. Rev. Biochem.* 1979, 48:159-191.
2. **Brix K., Summa W., Lottspeich F., Herzog V.** Extracellularly occurring histone H1 mediates the binding of thyroglobulin to the cell surface of mouse macrophages. *J. Clin. Invest.* 1998, 102: 283-293.
3. **Henriquez J. P., Casar J.C., Fuentealba L., Carey D.J., Brandan E.** Extracellular matrix histone H1 binds to perlecan, is present in regenerating skeletal muscle and stimulates myoblast proliferation. *J. Cell Sci.* 2002, 115: 2041-2051.
4. **Jeffery C.J.** Moonlighting proteins: complications and implications for proteomics. *DDT: Targets.* 2004, 3: 71-78.
5. **Rekvig O. P., Muller S., Briand J.P., Skogen B., Van Regenmortel M.H.** Human antinuclear autoantibodies crossreacting with the plasma membrane and the N-terminal region of histone H2B. *Immunol. Invest.* 1987, 16: 535-547.
6. **Kubota T., Kanai Y., Miyasaka N.** Interpretation of the cross-reactivity of anti-DNA antibodies with cell surface proteins: the role of cell surface histones. *Immunol. Lett.* 1990, 23:187-193.
7. **Ojcius D. M., Muller S., Hasselkus-Light C.S., Young J.D., Jiang S.** Plasma membrane-associated proteins with the ability to partially inhibit perforin-mediated lysis. *Immunol. Lett.* 1991, 28:101-108.
8. **Emlen W., Holers V.M., Arend W.P., Kotzin B.** Regulation of nuclear antigen expression on the cell surface of human monocytes. *J. Immunol.* 1992, 148: 3042-3048.
9. **Mecheri S., Dannecker G., Dennig D., Poncet P., Hoffmann M.K.** Anti-histone autoantibodies react specifically with the B cell surface. *Mol. Immunol.* 1993, 30: 549-557.
10. **Horneland M., Rekvig O.P., Jørgensen L., Hannestad K.** Cultured human endothelial cells display an antigen that is recognized by certain human anti-chromatin autoantibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 1983, 54: 373-377.
11. **Watson K., Edwards R.J., Shaunak S., Parmelee D.C., Sarraf C., Gooderham N.J., Davies D.S.** Extra-nuclear location of histones in activated human peripheral blood lymphocytes and cultured T-cells. *Biochem. Pharmacol.* 1995, 50: 299-309.

12. **Bell D.A., Morrison B.** The spontaneous apoptotic cell death of normal human lymphocytes in vitro: the release of, and immunoproliferative response to, nucleosomes in vitro. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1991, 60:13-26.
13. **Kundahl E., Richman R., Flickinger R.A.** The effect of added H1 histone and polylysine on DNA synthesis and cell division of cultured mammalian cells. *J. Cell Physiol.* 1981, 108: 291-298.
14. **Okabe-Kado J., Honma Y., Hayashi M., Hozumi M.** Effects of histone fractions on induction of differentiation of cultured mouse myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 1981, 41:1997-2002.
15. **Hsu L.W., Chen C.L., Nakano T., Lai C.Y., Chiang K.C., Lin Y.C., Kao Y.H., Chen S.H., Goto T., Sung W.C., Yang C.H., Cheng Y.F., Jawan B., Chiu K.W., Goto S.** The role of a nuclear proteins, histone H1, on signalling pathways for the maturation of dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2008, 152: 576-584.
16. **Ginsburg I.** Cationic polyelectrolytes: a new look at their possible roles as opsonins, as stimulators of respiratory burst in leukocytes, in bacteriolysis, and as modulators of immune-complex diseases (a review hypothesis). *Inflammation.* 1987, 11: 489-515.
17. **Тишкина Т. Е., Горюхина О. А.** Влияние ограниченного протеолиза гистонов на их фагоцитозстимулирующую активность. *Вестн. Ленингр. ун-та.* 1983, 3:122-124.
18. **Taylor M. B., Brown I. N.** Histone preopsonisation increases the respiratory burst response of phagocytes to *Pneumocystis carinii* FEMS Microbiol. Lett. 1991, 69: 79-82.
19. **Class R., Lindman S., Fassbender C., Leinenbach H.P., Rawer S., Emrich J.G., Brady L.W., Zeppenzauer M.** Histone H1 suppresses tumor growth of leukemia cells in vitro, ex vivo and in an animal model suggesting extracellular functions of histones. *Am. J. Clin. Oncol.* 1996, 19: 522-531.
20. **Zeppenzauer M., Reichhart R.** Use of pure histones H1 and H2A:H2B dimmers in therapeutic methods. 1993. US Patent 5, 182, 257 (<http://patft.uspto.gov>).
21. **Ашмарин И.П., Ждан-Пушкина С.М., Кокряков В.И., Самедов А.Ш., Антонова С.Н.** Антибактериальные и противовирусные функции основных белков клетки и перспективы практического их использования. *Известия Академии Наук СССР.* 1972, 4: 502-508.
22. **Class R., Zeppenzauer M.** Antimicrobial histone H1 compositions, kits, and methods of use thereof. 2005. US Patent 6, 884, 423 (<http://patft.uspto.gov>).
23. **Kawasaki H., Iwamuro S.** Potential roles of histones in host defence as antimicrobial agents. *Infect. Disord. Drug. Targets.* 2008, 8: 195-205.
24. **Горюхина О.А., Леонтьева Г.Ф., Кашкин А.П.** Некоторые антигенные свойства препарата тотального гистона тимуса теленка. *Журн. микробиол.* 1978, 11: 91-96.
25. **Ryser H. J., Hancock R.** Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture. *Science.* 1965, 150: 501-503.
26. **Ryser H. J.** Uptake of protein by mammalian cells: an underdeveloped area. *Science.* 1968, 159: 390-396.
27. **Горюхина О.А., Илюк Р.Д., Мищенко И.В.** Сравнительное исследование поступления экзогенного гистона в паренхиму головного мозга крыс. *Бюлл.экспер.биол.мед.* 2000, 130, 7: 63-66.
28. **Матюшичев В.Б., Горюхина О.А., Немцова Н.Н.** Получение и некоторые свойства ковалентных конъюгатов суммарного гистона с канамицином. *Вопр. мед. химии* 1995, 41, .2: 8-11.
29. **Горюхина О. А.** Способ получения растворимых ковалентных конъюгатов. Патент на изобретение № 2127606. РФ. *Бюл.изобр.* 1999, 8: 323.

30. **Мищенко В. А., Горюхина О. А.** Структура, проницаемость гематоэнцефалического барьера и перспективы доставки через него лекарственных средств. Журн. невропатол. и психиатр. 1996, 96, 4: 116-120.
31. **Горюхина О. А.** Перспективы применения катионных белков для транспорта лекарственных средств в ткань мозга. (Нервная система. Выпуск 37). СПб. гос. у-та. 2004: 168-175.
32. **McKeehan W. L., Ham R. G.** Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers. *J. Cell Biol.* 1976, 71: 727-734.
33. **Cardin A. D., Weintraub H. J.** Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis.* 1989, 9: 21-32.
34. **Minuth W. W., Strehl R., Schumacher K.** In: *Tissue engineering: essentials for daily laboratory work.* Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. 2005. 314 p.
35. **Olsen B. R.** Matrix molecules and their ligands. In: *Principles of tissue engineering* San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo Acad. Press. 2000: 57-72.
36. **Swiderek M. S., Mannuzza F.J., Ilsley S.R., Myles A.** Preparation of a cell culture substrate coated with poly-D-lysine. 1999. US Patent 5, 932, 473 (<http://patft.uspto.gov>).
37. **Khademhosseini A., Suh K.Y., Yang J.M., Eng G., Yeh J., Levenberg S., Langer R.** Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-L-lysine for patterned cell co-cultures. *Biomaterials.* 2004, 25: 3583-3592.
38. **Guarino R. D., Chaney B.N., Liebmann-Vinson A., Heidarani M.A.** Peptides for enhanced cell attachment and growth. 2007. US Patent 7, 157, 275 (<http://patft.uspto.gov>).
39. **Hubbell J. A.** Matrix effects. In: *Principles of tissue engineering.* San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Acad. Press. 2000: 237-250.
40. **Saltzman W.M.** Cell interaction with polymers. In: *Principles of tissue engineering* . San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Acad. Press. 2000: 221-236.
41. **Katsuen S., Ohshima K., Kawamura S., Yamamoto R., Nishino T.** Coating composition for culturing animal cells and method for culturing of the cells in serum-free condition. 1997. US Patent 5, 643, 561 (<http://patft.uspto.gov>).
42. **Clapper D. L., Hu W. S.** Cell culture support containing a cell adhesion factor and a positively- charged molecule. 1996. US Patent 5, 512, 474 (<http://patft.uspto.gov>).
43. **Ikada Y.** In: *Tissue engineering: fundamentals and applications. Interface science and technology,* 8. Japan Acad. Press. 2006. 469 p.
44. **Vitte J., Benoliel A.M., Pierres A., Bongrand P.** Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface? *Eur. Cell Mater.* 2004, 7: 52-63.
45. **Pierres A., Benoliel A.M., Bongrand P.** Cell fitting to adhesive surfaces: A prerequisite to firm attachment and subsequent events. *Eur. Cell Mater.* 2002, 3: 31-45.
46. **Suh K. Y., Seong J., Khademhosseini A., Laibinis P. E., Langer R.** A simple soft lithographic route to fabrication of poly(ethylene glycol) microstructures for protein and cell patterning. *Biomaterials.* 2004, 25: 557-563.
47. **Nakanishi J., Takarada T., Yamaguchi K., Maeda M.** Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences. *Anal. Sci.* 2008, 24: 67-72.
48. **Chen C. S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E.** Geometric control of cell life and death. *Science.* 1997, 276:1425-1428.
49. **Горюхина О. А., Мартюшин С. В., Блинова М. И., Полянская Г. Г., Черепанова О. А., Пинаев Г. П.** Культивирование клеток на микросферах, покрытых гистонами. *Цитология.* 2010, 52, 1: 12-23.

50. **Peterson L., Burrige K.** Focal adhesions and focal complexes. In: Cell adhesion. Oxford University Press. 2001: 288-299.

51. **Vunjak-Novakovic G.** The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactor. Tissue engineering of cartilage and bone. (Novartis Foundation Symposium 249). Wiley. Chichester. London. 2003: 34-51.

52. **Jaklenec A., Wan E., Murray M.E., Mathiowitz E.** Novel scaffolds fabricated from protein-loaded microspheres for tissue engineering. Biomaterials. 2008, 29:185-192.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

АДАПТАЦИЯ КЛЕТОК МДСК К РОСТУ В МАЛО- И БЕССЫВОРОТОЧНОЙ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

*Р.Я. Подчерняева.¹, Г.А. Данлыбаева.¹, Н.А. Мазуркова², О.В. Бакланова¹,
В.В. Честков³, В.Ю. Табаков*

¹ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва; ²ФГУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, пос. Кольцово, Новосибирск обл.; ³ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

После 5 пассажей в малосывороточной рисовой среде были получены адаптированные к росту в этой среде клетки линии МДСК. У этих клеток наблюдалась более низкая пролиферативная активность и изменение морфологии по сравнению с контролем. При этом сохранялась жизнеспособность клеток и активность репродукции вируса гриппа А (H1N1 и H3N2). Для адаптации клеток МДСК к полностью бессывороточной среде «Гибрис-2» потребовалось 17 серийных пассажей. У адаптированных клеток также наблюдалась пониженная пролиферативная активность и изменение морфологии. Репродукция вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2) была ниже на 0,5 lgТЦД₅₀ по сравнению с контролем, но вирус гриппа В активно размножался в адаптированных и контрольных клетках. Следовательно, как рисовая среда, так и среда «Гибрис-2» пригодны для культивирования клеток линии МДСК и могут применяться для репродукции вирусов гриппа.

Ключевые слова: клетки, адаптация, рисовая среда, бессывороточная среда, репродукция вирусов гриппа.

Известно, что применяемые для культивирования клеток стандартные питательные среды требуют обязательного добавления сыворотки крупного рогатого скота (КРС) или эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), что приводит к риску контаминации продуктами

животного происхождения. В связи с этим в последние годы особое внимание уделяется малосывороточным (1,3,4) и бессывороточным питательным средам (2,5).

Задачей данной работы являлось применение таких сред для культивирования клеток линии MDCK (почка собаки). Выбор этих клеток был обусловлен их чувствительностью к репродукции вирусов гриппа.

В 1-ой серии экспериментов нами применялась малосывороточная питательная среда на основе гидролизатов рисовой муки, разработанная в ФГУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». Оптимизированный состав этой среды представляет собой ферментативные гидролизаты рисовой муки, растворенные в определенных концентрациях в сбалансированном растворе Эрла, в которую добавлены витамины, микроэлементы и индивидуальные аминокислоты.

Клетки MDCK выращивали в питательной среде с добавлением 3,4 и 5 % ЭТС фирмы ООО «ПанЭко». В качестве контроля применяли питательную среду Игла также с добавлением 3,4 и 5% ЭТС и 10 mM –глутамин. Посевная концентрация составляла 1×10^5 кл/мл, клетки инкубировали в культуральных матрасах объемом 50 см³ в течение 3-4 суток при 37 °С. В процессе работы учитывали следующие параметры: сроки образования монослоя, морфологию культуры, пролиферативную активность (ИП-индекс пролиферации) и жизнеспособность (в %).

Исследование показало, что клетки MDCK, пассируемые на стандартной среде Игла (контроль) формировали монослой на 2-3 сутки, значение ИП были зависимы от процентного содержания ЭТС в среде культивирования. Так, при добавлении 3 и 4% ЭТС ИП составлял от 4,0 до 7,3 -9,0 к 5 пассажу, а при применении 5% ЭТС значение ИП достигали 7,0-9,6 в течение 5 последовательных пассажей. Культура представлена эпителиоподобными клетками с четкими границами и крупными ядрами разнообразной формы, ядрышки крупные, от одного до нескольких в ядре. Цитоплазма ячеистая, патологических митозов не обнаружено.

При культивировании клеток MDCK на рисовой среде меняется морфология клеток – они приобретают удлинённую форму (веретеновидную), образуют густой монослой с наложением слоев клеток. Наблюдается сильная вакуолизация цитоплазмы. При этом снижается и ростстимулирующая активность клеток, значения ИП ниже по сравнению с контролем на 1,0-4,0 единицы, что однако не влияет на жизнеспособность клеток в течение 5 пассажей (живых клеток 84-96%).

Представляло интерес изучить чувствительность этой клеточной линии к репродукции вирусов гриппа H3N2 (штамм A/Висконсин/67/05) и H1N1 (штамм A/Новая Каледония/20/99). Показано, что репродукция штамма A/Висконсин/67/05 в рисовой среде была ниже на 1,0 lg ТЦД₅₀ по сравнению с контролем, а штамм A/Новая Каледония/20/99 репродуцировался в одинаковом титре в рисовой и контрольной средах.

Следовательно, для адаптации клеток MDCK к рисовой среде достаточно добавления 3% ЭТС на протяжении 5 последовательных пассажей, и эта среда может быть использована для репродукции вирусов гриппа H1N1 и H3N2.

Во 2-ой серии экспериментов для культивирования клеток MDCK применяли полностью бессыывороточную среду «Гибрис-2» производства ООО «ПанЭко». Условия эксперимента были те же, что и с применением малосыывороточной рисовой среды. Для получения адаптированной линии клеток к среде «Гибрис-2» было проведено 4 пассажа с 3% ЭТС, 3 пассажа с 2% ЭТС, 5 пассажей с 1% ЭТС и 6 пассажей без сыыворотки (таблица).

Таблица. Адаптация клеток MDCK к росту в среде «Гибрис-2»

Пассаж	ЭТС (%)	«Гибрис-2»		ЭТС (%)	Игла	
		ИП	Ж (%)		ИП	Ж (%)
1	3	7,0	92	5	4,8	96
2	3	5,2	98	5	4,5	96
3	3	6,0	97	5	7,0	98
4	3	5,6	(98)			
1	2	6,4	98	5	7,5	98
2	2	6,0	96	5	7,0	89
3	2	6,5	98	5	6,0	99
1	1	7,0	96	5	6,0	98
2	1	8,0	87	5	6,0	96
3	1	7,0	97	5	6,0	97
4	1	6,5	96	5	6,0	98
5	1	6,0	96	5	6,5	97
1	0	3,0	97	5	6,0	97
2	0	2,5	97	5	6,0	98
3	0	2,8	96	5	6,0	97
4	0	2,2	85	5	6,0	97
5	0	2,0	85	5	6,0	97
6	0	2,0	85	5	6,0	97

Обозначения в табл.: ИП- индекс пролиферации, Ж – жизнеспособность клеток.

Из таблицы видно, что при культивировании клеток MDCK со средой «Гибрис-2» при добавлении 1% ЭТС ИП в отдельных пассажах был даже выше (до $\lg 7,0-8,0$ ТЦД₅₀) по сравнению с ИП в среде Игла ($\lg 6,0-7,0$ ТЦД₅₀). Жизнеспособность клеток была идентичной контролю. При культивировании клеток в среде «Гибрис-2» наблюдалось снижение ИП к 4 пассажиру до 2,2, а к 5 и 6 пассажирам до 2,0 при сохранении жизнеспособности клеток до 85%. Следует отметить, что клетки в этой среде росли медленнее (4-5 суток) по сравнению с контролем (2-3 суток). Морфология клеток отличалась от контрольных меньшим размером, разнообразной величиной и формой ядер. Адаптированные клетки были заморожены в жидком азоте (-196 °С) и через 2 недели разморожены. При этом 95% клеток сохранили жизнеспособность и свои культуральные свойства в среде «Гибрис-2».

Как и в 1-ой серии экспериментов, нами проведено изучение репродукции вирусов гриппа А и В в клетках MDCK, адаптированных к этой среде. Показано, что лабораторный штамм А/Аичи/1/68 (H3N2) в одинаковом титре размножается как в контрольных, так и адаптированных клетках ($\lg 8,0$ ТЦД₅₀). Другой штамм А/Брисбен/10/07 (H3N2) в адаптированных клетках репродуцируется слабее ($\lg 5,0$ ТЦД₅₀) по сравнению с контролем ($\lg 6,0$ ТЦД₅₀).

Штамм А/Соломоновы острова/3/06 вируса гриппа H1N1 тоже несколько слабее на 0,5 \lg ТЦД₅₀ репродуцируется в адаптированных клетках. Вирус гриппа В (штамм А/Огайо/01/05) размножается до 5,0 \lg ТЦД₅₀ в адаптированных и контрольных клетках.

Следовательно, бессывороточная среда «Гибрис-2» пригодна для культивирования монослойных клеток MDCK и может применяться для репродукции вирусов гриппа А и В.

Список литературы

1. **Данлыбаева Г.А., Мазуркова Н.А., Матюшина Р.О., Трошкова Г.П., Подчерняева Р.Я.** Питательная среда на основе гидролизата рисовой муки для культивирования клеток и определение чувствительности к вирусам гриппа. Клеточная технология, биология и медицина, 2009, 2: 113-116.
2. **Табак В.Ю., Щепкина Ю.В., Честков В.В.** Суспензионные культуры клеток в бессывороточной среде «Гибрис-2». Вакцинология, 2008: 115-116.
3. **Трошкова Г.П., Мартынец Л.Д., Кирова Е.В. Сумкина Т.П., Юдин А.В.** Совершенствование технологии приготовления питательных сред на основе ферментативных гидролизатов рисовой и соевой муки. Биотехнология, 2006, 4: 74-78.
4. **Онищенко Г.Г., Мазуркова Н.А., Трошкова Г.П., Радаева И.Ф., Мартынец Л.Д., Сумкина Т.П., Ким И.И., Нечаева Е.А., Дроздов И.Г.** Оптимизация технологии производства живой культуральной гриппозной вакцины с использованием питательной

среды на основе гидролизатов белков растительного происхождения, Биотехнология, 2007, 3: 31-37.

5. **Genzel Y., Olmer R., Shafer B., Reiche U.** Ware microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and Serum-free media. Vaccine, 2006,.24: 6074-6087.

Х Р О Н И К А

КОНФЕРЕНЦИИ И ШКОЛЫ, ПРОВЕДЕННЫЕ В 2009 ГОДУ

1. Традиционный **симпозиум по биологии клетки в культуре на тему «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий»** был проведен в Санкт-Петербурге в Институте цитологии РАН в октябре 2009 года. Помимо устных докладов и стендовых сообщений в рамках симпозиума прошло общее собрание членов Ассоциации специалистов по клеточным культурам. Кроме того, в рамках симпозиума состоялась демонстрация новых конфокальных микроскопов, производимых фирмой Olympus и компанией Karl Zeis.

В целом, все представленные на симпозиуме доклады продемонстрировали развитие в нашей стране последовательных этапов единой цепи создания наукоемких инновационных биомедицинских клеточных технологий, начиная от фундаментальных исследований и разработок клеточных продуктов до их практического применения в медицинской практике.

2. В декабре 2009 года в Научном центре РАН в Санкт-Петербурге состоялась **Международная конференция «Инновационный потенциал фундаментальных наук и проблемы его реализации»**. На конференции с докладом на тему «Создание клеточных технологий и их применение» выступил президент АСК, д.б.н., проф. Г.П. Пинаев.

3. В марте 2010 года в НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН в Москве состоялись **Практические курсы по культивированию клеток**. В программу курсов были включены следующие темы: культивирование перевиваемых клеточных линий человека и животных; чувствительность клеточных линий к различным родам вирусов; определение контаминаций клеток микоплазмой и др.

КОНФЕРЕНЦИИ 2010

4-й Всероссийский симпозиум с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» состоится 21-22 апреля 2010 г. в Санкт-Петербургском государственном медицинском университете. На конференции будут обсуждаться следующие проблемы: организация и деятельность тканевых и клеточных банков России, вопросы разработки и технологии изготовления биологических материалов, тканевая инженерия, клеточные технологии и их клинические аспекты.

16-й Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра» состоится 5-7 октября 2010 г. в Санкт-Петербурге в Институте цитологии РАН. На симпозиуме предполагается обсудить следующие вопросы: структура хромосом, пространственная динамика в ядре, трехмерная организация и динамика хроматина, репарация и репликация ДНК и др. Контактные телефоны Оргкомитета: (812) 297-18-59, 297-18-29.

РАЗНОЕ

Вышла из печати книга: **«Животная клетка в культуре»** (Методы и применение в биотехнологии) под общ. ред. д.б.н., проф. Дьяконова Л.П., М.: издательство «Спутник», 2009, 656 с. – издание второе, дополненное.

ИНФОРМАЦИЯ АССОЦИАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ

Решения совещания членов Ассоциации специалистов по клеточным культурам 13 октября 2009 г

13 октября 2009 г. в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург) состоялось очередное совещание членов Ассоциации специалистов по клеточным культурам (АСКК), принимавших участие в проведении симпозиума «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий». После обсуждения ряда проблем, касающихся научной и практической деятельности членов АСКК, были приняты следующие решения:

1. Установить размеры ежегодных членских взносов с 2010 года:

- для членов АСКК - 150 рублей (для студентов и аспирантов – 50 рублей),
- для членов Российского отделения Европейского общества тканевых культур (ЕОТК) – 20 долларов.

2. Просить всех членов АСКК и ЕОТК своевременно оплачивать ежегодные членские взносы, которые принимает казначей АСКК Алла Ивановна Гусева.

Взносы можно пересылать почтовыми переводами по адресу:

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр.,4. Институт цитологии РАН. Ассоциация специалистов по клеточным культурам. А.И.Гусевой.

Тел.: (812) 297-39-83; 8-921-984-69-72. E-mail: msb@mail.cytspb.rssi. ru

3. Просить всех членов АСКК активно участвовать в создании очередных выпусков Информационного бюллетеня «Клеточные культуры» - присылать в редакцию бюллетеня небольшие сообщения (не более 10 стр.) о результатах своих фундаментальных и прикладных исследований на клеточных культурах, о научных конференциях, о новых методах исследования, о новых реагентах и т.д.

Правила для авторов представлены в конце каждого выпуска бюллетеня. Их можно, также, найти на сайте Института цитологии РАН (СПб) – <http://www.cytspb.rssi.ru/> – в разделах: «Ассоциация специалистов по клеточным культурам» и «Клеточные культуры. Инф. бюлл.».

4. Просить всех членов АСКК в случае изменения реквизитов (служебных и домашних адресов, телефонов, электронной почты) своевременно сообщать об этом секретарю АСКК М.С. Богдановой.

5. Проводить совместно с Институтом цитологии РАН в Санкт-Петербурге 1 раз в 3 года Школы по методам культивирования клеток для молодых ученых.

6. Подготовить программу и наметить сроки проведения Практических курсов по методам культивирования клеток, которые предложено проводить на базах разных институтов, занимающихся исследованиями на клеточных культурах.

7. Просить Министерство науки и образования учредить целевые гранты для проведения совместных научных исследований на клеточных культурах с сотрудниками учреждений из стран СНГ.

В декабре 2009 года редакция Информационного бюллетеня «Клеточные культуры» оформила документы, необходимые для присвоения бюллетеню Международного

стандартного серийного номера (ISSN). Запрос на присвоение бюллетеню этого номера и оформленные документы были высланы в Париж в Международный центр ISSN, где Инф. бюлл. «Клеточные культуры» был зарегистрирован под номером **ISSN 2077-6055, Key title: Kletocnye kul'tury.**

С 2010 г. редакция бюллетеня будет помещать на сайте Института цитологии РАН (<http://www.cytspb.rssi.ru/>) полную электронную версию всех последующих выпусков бюллетеня, а также резюме и ключевые слова опубликованных в них статей на английском языке.

НОВЫЕ ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи принимаются редакцией в электронном варианте и в рукописи. Электронный вариант статьи высылается в редакцию по электронной почте в виде отдельного файла (вместе с рисунками и таблицами) в формате Microsoft Word для Windows. При создании файла необходимо соблюдать следующие требования:

- ❖ параметры страницы: поля: верхнее – 2,5 см, нижнее, правое и левое – по 2,1 см;
- ❖ от края колонтитула: верхнего – 1,8 см, нижнего - 1,25 см; размер бумаги: « А 4»;
- ❖ формат: шрифт - Arial Narrow, обычный, размер 13; выравнивание - по ширине;
- ❖ междустрочный интервал – полуторный, красная строка – отступ на 0,5 см.

Размер рукописи статьи не должен превышать 10 машинописных страниц. В редакцию бюллетеня высылается 2 экземпляра рукописи статьи и направление ее в бюллетень от учреждения, в котором выполнена работа. На английском языке представляются: название статьи, ф. и. о. авторов, наименования учреждений, краткое резюме и ключевые слова.

Адрес редакции: 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4. Институт цитологии РАН.

Отв. редактору Инф. бюлл. «Клеточные культуры» М.С. Богдановой.

Тел.: (812) 297-53-10, 8-911-284-28-64; факс: (812) 297-03-41, 297-42-96;

Электронный адрес: msb2051@rambler.ru

Перед основным текстом статьи приводится краткое резюме и ключевые слова. Резюме (без слова «Резюме») должно быть не более 1 стр. Статья состоит из следующих разделов:

вводная часть, материал и методы, результаты, обсуждение и список литературы. Теоретические и обзорные статьи могут иметь произвольную структуру, но обязательно должны содержать резюме и ключевые слова.

В ссылках на литературу в тексте статьи указываются в круглых скобках номера работ в порядке их цитирования. В конце статьи приводится список литературы, который должен содержать библиографическое описание всех работ, ссылки на которые имеются в тексте статьи. Необходимо выделять жирным шрифтом фамилии и инициалы всех авторов цитируемой публикации. Для книг указываются фамилии и инициалы авторов, год издания, название книги, место издания, издательство и общее число страниц.

Все присланные в редакцию статьи проходят рецензирование и только после получения положительных рецензий публикуются.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Основные направления исследований на клеточных культурах в учреждениях России

- Полянская Г.Г.* Роль иммобилизованных белков внеклеточного матрикса в кариотипической изменчивости «безмаркерных» клеточных линий.....3
- Самойлович М.П., Пиневич А.А., Вартамян Н.Л., Климович В.Б.*
Продукция IGM и J цепи В-лимфоидными клеточными линиями..... 15
- Щелкунова Т.И., Щелкунов И.С.* Получение, характеристика и применение постоянной клеточной линии ICO яичников неполовозрелого карпа *Cyprinus carpio*.....24

Стволовые клетки: их использование в фундаментальной клеточной биологии и медицине

- Хныкова О.Н., Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Буеверова Э.И., Старостин В.И.* Влияние компонентов внеклеточного матрикса на клональный рост и остеогенную дифференцировку мезенхимных стромальных клеток крысы..... 37
- Любич Л.Д., Лисяный Н.И., Семенова В.М., Стайно Л.П.*
HLA-антигенная характеристика нативных и культивируемых нейроклеток фетального и постнатального головного мозга человека.... 47

Клеточная биотехнология и тканевая инженерия

- Горюхина О.А., Пинаев Г.П.* Биологическая активность внеклеточных гистонов и перспективы их использования в биотехнологии.....59

Методы исследований

- Подчерняева Р.Я., Данлыбаева Г.А., Мазуркова Н.А., Бакланова О.В., Честков В.В., Табаков В.Ю.*
Адаптация клеток MDCK к росту в мало- и бессывороточной питательных средах.....70

Хроника

- Конференции и школы, проведенные в 2009 году.....74
- Конференции 2010.....74

Разное75

Информация Ассоциации специалистов по клеточным культурам.....75

Новые правила для авторов.....77