АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ISSN 2077- 6055

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЮЛЛЕТЕНЬ

ВЫПУСК 27

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2011

УДК 576.3, 576.4, 576.5, 576.8.097, М-54 **ISSN 2077- 6055**

Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 27.

Отв. ред. М.С. Богданова. - СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. - 94 с.

Настоящий выпуск содержит информацию об основных направлениях фундаментальных и прикладных исследований на клеточных культурах, о новых методах, о научных совещаниях, школах и конференциях.

Сборник «Клеточные культуры» (информ. бюллетень) предназначен для широкого круга исследователей, работающих в области клеточной биологии, биотехнологии, вирусологии и медицины.

Полная электронная версия настоящего выпуска помещена на сайте Института цитологии РАН (Санкт-Петербург): http://www.cytspb.rssi.ru

Составитель и ответственный редактор: М.С. Богданова

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

© Авторы статей, указанные в тексте, 2011

© Составление. Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН, 2011

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ В УЧРЕЖДЕНИЯХ РОССИИ

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИНФИЦИРУЮЩИХ ДОЗ ВИРУСОВ ГРИППА А НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Т.Д.Смирнова, Д.М.Даниленко, Т.М.Гудкова, М.М.Писарева, Р.А.Кадырова, А.В.Слита

ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, cellcultures@influenza.spb.ru

Проведено инфицирование разными дозами вирусов гриппа A/Brisbane/10/07 (H3N2) и A/С.-Петербург/56/09 (H1N1v) 8-ми клеточных линий человека: ECV-304, T-98G, A-172, RD, CaCo-2, HeLa, L-41 и ФЛЭЧ. На третьи сутки после заражения культур вирусами отмечено дозозависимое снижение количества выросших клеток, обнаружены цитопатические изменения в виде мелкоклеточной очаговой деструкции монослоя. При инфицировании культур высокими дозами вирусов в клетках наблюдался апоптоз, причем он наступал раньше, чем проявлялись первые признаки цитопатических изменений. Только в двух клеточных линиях – ECV-304 (эндотелий) и T-98 G (глиобластома) после заражения низкими дозами вирусов было отмечено усиление пролиферации клеток, которое не сопровождалось индукцией апоптоза. С помощью метода флуоресцирующих антител и полимеразной цепной реакции было показано, что в клетках линии ECV-304, зараженных низкими дозами вируса гриппа A/Brisbane/10/07, на протяжении трех пассажей сохранялась латентная вирусная инфекция: в клетках был выявлен нуклеопротеин вируса и вирусная РНК. Показано, что противовирусные препараты рибавирин, ремантадин и триазавирин снижали пролиферацию перевиваемых клеток эндотелия, стимулированную низкими дозами вируса, что подтверждало специфичность вирусного воздействия на клетки. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о различном ответе исследуемых клеточных культур на вирусную инфекцию в зависимости от величины заражающей дозы. Обсуждается вопрос о возможной связи инфицирования вирусами гриппа клеток эндотелия и нейроглии больного с развитием у него, впоследствии, сердечнососудистых патологий и заболеваний нервной системы.

Ключевые слова: вирусы гриппа А, перевиваемые клеточные линии человека, пролиферация, апоптоз.

Взаимоотношение вируса гриппа и клетки остается актуальной проблемой, изучением которой заняты исследователи самых различных специальностей.

Появление нового реассортантного варианта пандемического вируса гриппа А свиного происхождения, содержащего фрагменты генома гриппа свиней, птиц и человека, заставляет вновь обратиться к изучению вопросов тропизма и чувствительности клеток к вирусу гриппа и к его способности репродуцироваться в клетках человека. В настоящее время самой чувствительной клеточной линией к вирусам гриппа А различного происхождения остается клеточная линия MDCK, полученная из почки собаки. Клеточные линии, полученные из клеток различных органов человека, которые, за исключением линии диплоидных фибробластов, имеют опухолевое происхождение, как правило, слабо поддерживают репродукцию эпидемических вирусов гриппа А, демонстрируя не ярко выраженную деструкцию клеток, и, практически, нечувствительны к пандемическим вирусам гриппа А свиного происхождения (1, 2).

Невысокая чувствительность этих линий к вирусу гриппа А, помимо биологических особенностей самих вирусов, может быть отражением морфофункциональных особенностей клеток. Прежде всего, это наличие на клеточной мембране соответствующих рецепторов, позволяющих вирусу адсорбироваться на клетке (3), а, также, наличие эндогенных протеаз, расщепляющих гемагглютинин (ГА) вируса, что облегчает слияние мембран вируса и клетки и проникновение вируса внутрь клетки (4, 5); наличие в клетке условий, неблагоприятных для нормальной репродукции вируса и процессинга всех вирусных белков, к которым относятся функционирование системы интерферона (6, 7), аппарата Гольджи (8), особенности организации сети цитоскелета (9); уровень глутатиона и функционирование белков из семейства bcl-2 (10, 11, 12).

Ранее нами было показано усиление пролиферации перевиваемых клеток гемобластозов человека и индукции апоптоза при заражении их низкими дозами вируса гриппа А (13). В задачу настоящего исследования входило изучение пролиферации и апоптоза монослойных клеточных линий человека при заражении их разными дозами вирусов гриппа А: Brisbane/10/07 (H3N2) и СПб/56/09 (H1N1v).

Материал и методы

Вирусы. Исследования проводили с двумя вирусами гриппа А: эпидемический вирус гриппа Brisbane/10/07 (H3N2) и пандемический вирус гриппа СПб/56/09 (H1N1v). В работе использовали вируссодержащую аллантоисную жидкость от инфицированных 9-дневных

куриных эмбрионов. Титр цитопатического действия (ТЦД), характеризующий инфекционную активность вируса, определяли на клетках MDCK. Титр, как правило, составлял 6-7 lg $ТЦД_{50}$. Используемое нами обозначение «доза заражения» соответствует наибольшему десятикратному разведению вируса, т.е. разведение вируса 10^{-7} соответствует 1 дозе заражения, 10^{-6} -10 дозам, 10^{-5} -100 дозам и т.д.

Клеточные линии**.** Эксперименты проводили на 7 перевиваемых клеточных линиях: клетки эндотелия (ECV-304), глиобластомы (T-98G и A-172), рабдомиосаркомы (RD), карциномы ободочной кишки (CaC0-2), карциномы шейки матки (HeLa), костного мозга (L-41) и одном штамме диплоидных клеток легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ). Для определения инфекционной активности вируса по его цитопатическому действию (lg$ТЦД_{50}$) использовали пермиссивную клеточную линию почки собаки (MDCK). Все клеточные линии получены из Коллекции клеточных культур ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития РФ.

Для пересева перевиваемых клеточных линий использовали питательную среду альфа МЕМ (без антибиотиков) с добавлением 2% фетальной сыворотки (ф.с.) и с 5% ф.с. для диплоидных клеток линии ФЛЭЧ. Питательные среды и фетальная сыворотка получены из фирмы БИОЛОТ.

Проведение экспериментов.

Для изучения чувствительности клеточных линий к вирусам гриппа применяли традиционный метод заражения клеток вирусом, используя 1-суточный монослой клеток (с посевной концентрацией 2,0 х 10^5 клеток/мл), выращенный на 96-луночных платах. Контакт вируса и клеток проходил при +37^0 С в течение 45 мин, после чего добавляли питательную среду для поддержания репродукции вируса (альфа МЕМ без сыворотки с добавлением 2 мкг/мл трипсина). Изучение состояния монослоя клеток для определения ТЦД вируса на 3 сутки проводили при просмотре плат под инвертированным микроскопом.

Для изучения влияния вируса гриппа на пролиферацию клеток использовали 24-луночные платы, посевная концентрация клеток была снижена до 1,0 х 10^4 клеток/мл. Инокулят с вирусом (0,1 мл) вносили в суспензию клеток после их рассева (по 1 мл) по лункам в среде альфа МЕМ +1% ф.с. с добавлением 2 мкг/мл трипсина. Подсчет количества выросших клеток проводили в камере Фукса-Розенталь на 3-и сутки после отторжения монослоя клеток от подложки раствором версена. Долю выросших, зараженных вирусом клеток, выражали в проценте от контрольных незараженных клеток, количество которых принимали за 100 %.

На каждую точку использовали не менее 2-х лунок. Каждый эксперимент повторяли не менее 3-х раз.

Изучение клеток ECV-304, зараженных вирусом гриппа в процессе пассирования. Клетки ECV-304, зараженные 1 и 10 дозами вируса гриппа A/Brisbane/10/07 пересевали на 6-7 сутки еще 3 пассажа. В момент каждого пассажа клетки отсевали для выращивания в пенициллиновых флаконах (для определения синтеза РНК вируса с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени - ПЦР) и в пенициллиновых флаконах с покровными стеклами (для определения нуклеопротеина вируса с помощью флуоресцирующих антител и выявления апоптоза).

Апоптоз клеток определяли по деградации ядерного хроматина, выявляемой при окрашивании красителем Hoechst-33258. Методика описана в статье Смирновой с соавторами (13).

Метод флуоресцирующих антител (МФА). Использовали непрямой МФА с моноклональными антителами (МКА) к нуклеопротеину (НП) вируса гриппа, полученными в ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития РФ. Методика описана в статье Даниленко с соавторами (2).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Иссследование проводили с использованием наборов ЦНИИ эпидемиологии серии «АмплиСенс» для детекции вирусов гриппа подтипа H3 и H1 согласно приложенной инструкции.

Противовирусные препараты. Ремантадин (Sigma, Германия) использовали в концентрации 10 мкг/мл, рибавирин (ICN, США) - в концентрации 100 мкг/мл, триазавирин (отечественный препарат, разработанный в Институте органического синтеза Уро РАН, находится на II фазе клинических испытаний) - в концентрации 50 мкг/мл. Все препараты разводили в среде альфа MEM.

Статистическая обработка**.** Статистическую обработку количественных данных проводили с использованием пакета программ MS Office Excel 2007 и Statistica 6.0.

Результаты

Результаты опытов показали, что клеточные линии человеческого происхождения обладали невысокой чувствительностью к исследуемым вирусам гриппа А. Цитопатические изменения в виде мелкоклеточной очаговой деструкции клеток, хотя и в невысоких титрах (3-4 lg ТЦД $_{50}$), вызывались эпидемическим вирусом гриппа A/Brisbane/10/07 во всех исследуемых клеточных линиях, тогда как деструкция клеток, вызванная пандемическим вирусом

А/СПб/56/09, отмечена только в клеточных линиях ECV-304, T-98G, RD, A-172 и титры составляли 1-2 lgТЦД$_{50}$. Плотность монослоя, выращенного с использованием разных посевных концентраций клеток, не влияла на усиление их чувствительности к вирусам. Цитопатические изменения, вызванные эпидемическим вирусом гриппа A/Brisbane/10/07 и пандемическим вирусом А/СПб/56/09, как при высокой посевной концентрации клеток, так и при низкой, были на том же уровне и в тех же клеточных линиях.

Изучение влияния вирусов на пролиферацию клеток на 3-и сутки после заражения показало, что во всех исследуемых клеточных линиях , независимо от проявления в них ЦПД, отмечалось дозозависимое снижение количества выросших клеток, что указывает на наличие, хотя и невысокой, чувствительности всех исследуемых клеточных линий к цитодеструктивному действию вирусов, как A/Brisbane/10/07 (H3N2), так и А/СПб/56/09 (H1N1v) (табл.). Визуально это выражалось в постепенном разрежении монослоя клеток и напоминало вид стареющих культур.

Таблица. Влияние заражающих доз вирусов гриппа A Brisbane/10/07 (H3N2) и СПб/56/09 (H1N1v) на пролиферацию клеточных линий человека

Клеточная линия	Вирус гриппа A/Brisbane/10/07 (H3N2)				Вирус гриппа А/СПб/56/09 (H1N1v)			
	Доля выросших клеток, % от контроля							
	Дозы заражения вирусом				Дозы заражения вирусом			
	1	10	100	1000	1	10	100	1000
ECV-304	**132,6±10,6**	**120,6±5,8**	79,2±4,7	20,3±2,1	**142,3±10,1**	**139,5±10,3**	100±6,7	76±6,2
T-98G	**125,4±6,3**	98±4,1	82±4,2	42,9±1,7	**125,6±11,0**	**114,8±10,6**	84±4,8	68±3,8
A-172	98±3,6	75,4±2,9	52,7±2,0	18,4±1,3	100±4,8	80,4±5,8	70±3,7	65±2,8
RD	100±4,9	75±3,8	68±3,9	45±1,4	98±5,3	75±3,6	67±4,5	59±4,7
CaCo-2	89±3,4	60±2,4	45±1,1	32±1,9	91,2±5,6	83,8±4,9	68,5±4,1	53±3,1
HeLa	92±6,9	84±7,8	56±3,6	45±3,5	98±6,3	80±3,7	62±4,2	56,8±4,6
L-41	89±6,8	78±5,9	67±3,1	42±3,6	95,5±8,4	86,3±6,9	71,4±5,7	65,2±6,1
ФЛЭЧ	100±7,3	89±4,9	75±4,7	54±3,9	100±4,8	89±5,7	80±4,8	75±5,6

Апоптоз клеток во всех исследуемых линиях обнаруживался только после заражения монослоя клеток высокими дозами вируса и по времени предшествовал появлению цитопатических или других изменений (в виде разрежения монослоя клеток).

Из 8 исследуемых клеточных линий только две (клетки эндотелия ECV-304 и глиобластомы человека T-98G) ответили усилением пролиферации на заражение самыми низкими дозами вирусов гриппа A/Brisbane/10/07 (H3N2) и A/СПб/56/09 (H1N1v). Доля выросших клеток (% от контроля) на 3-и сутки эндотелиальной клеточной линии ECV-304 была 132,6±10,6 - 120,6±5,8 при 1 и 10 дозах заражения вирусом гриппа A/Brisbane/10/07 и 142,3±10,1 - 139,5±10,3 при 1 и 10 дозах заражения вирусом гриппа A/СПб/56/09 соответственно. Для клеток глиобластомы T-98G эти показатели были 125,4±6,3 и 125,6±11,0 при заражении 1 дозой вируса гриппа A/Brisbane/10/07 и A/СПб/56/09 соответственно. При окрашивании клеток этих линий флуоресцентным красителем Hoechst-33258 на 3-и сутки после заражения вирусом не были обнаружены ядра с признаками деградации хроматина. Это свидетельствует о том, что стимуляция пролиферации этих клеток под воздействием низких доз вируса не сопровождалась индукцией апоптоза, в отличие от того, что наблюдалось нами ранее при исследовании лимфобластоидных клеток (13).

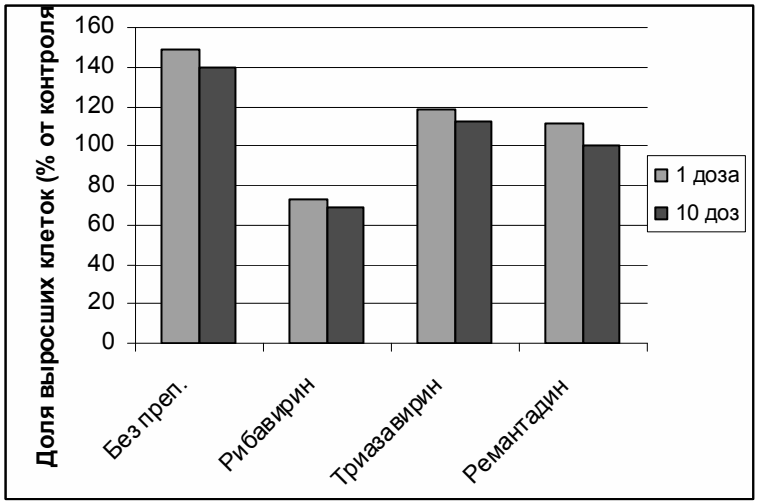
Попытки выделить вирус из культуральной жидкости клеток ECV-304, зараженных низкими дозами вируса, на клетках МДСК были отрицательны. Инфекционный вирус обнаруживался только в гомогенате клеток, зараженных максимальными дозами вируса и разрушенных с помощью замораживания-оттаивания, что свидетельствует о преимущественно внутриклеточной локализации вируса.

В эндотелиальных клетках ECV-304, зараженных низкими дозами (1 и 10 доз) вируса A/СПб/56/09 на протяжении трех последующих пассажей не обнаружено каких-либо цитопатических изменений. При исследовании на апоптоз инфицированных вирусом клеток, выращенных на покровных стеклах после 1-го и 2-го пассажа, было выявлено в 1-суточных культурах небольшое количество клеток с апоптозом (в контрольных клетках признаки апоптоза отсутствовали). Это свидетельствует о сохранении в клетках эндотелия, зараженных очень низкими дозами вируса гриппа, инфекционного процесса. Это подтверждается, также, обнаружением в этих клетках положительной флуоресценции нуклеопротеина (NP) вируса гриппа, выявленного с помощью МКА. Исследования ПЦР в реальном времени показали, что на 3-м пассаже в 3-х суточных культурах клеток ECV-304 происходит синтез вирусной РНК, однако, количество ее невелико (циклы 27 и 30 при заражении дозами 10 и 1 соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на протяжении, по меньшей мере, одного месяца в клетках эндотелия человека, зараженных очень низкими дозами вируса гриппа А, сохраняется внутриклеточный инфекционный процесс.

Применение противовирусных препаратов (рибавирин, триазавирин и ремантадин) снижало стимулированную низкими дозами вируса пролиферацию клеток, что подтверждает специфичность вирусного участия в этом процессе. Наибольший ингибирующий эффект на стимуляцию пролиферации клеток ECV-304 под воздействием низких доз вируса гриппа А обнаружил антивирусный препарат рибавирин. Доля выросших клеток при 1 и 10 дозах заражения вирусом были соответственно 142,3±10,1 и 139,5±10,3 (без добавления препаратов), 73±4,8 и 69±5,7 (в присутствии рибавирина), 118±9,6 и 112±8,9 (в присутствии триазавирина), 111±7,1 и 100±8,4 (в присутствии ремантадина) (рис.1).

Рис. 1. Влияние антивирусных препаратов на пролиферацию клеток эндотелия человека линии ECV-304, зараженных низкими дозами вируса гриппа А/СПб/56/09 (H1N1)



Обсуждение

В вирусологической практике при изучении поведения вируса гриппа в клетках, как правило, используются достаточно высокие дозы заражения вирусом, что может представлять собой модель острой гриппозной инфекции. Однако на пути вируса после проникновения в верхние дыхательные пути встает защита в виде врожденного клеточного иммунитета, а позже, и гуморального. Преодолевшие этот барьер вирусные частицы могут разноситься либо с током крови, либо инфицированными лимфоцитами и лейкоцитами, во всяком случае,

количество вирусных частиц в клетках крови очень невелико. Эту сторону латентного инфекционного процесса может моделировать заражение клеток *in vitro* очень низкими дозами вируса.

Ранее нами было обнаружено, что низкие дозы вируса способны стимулировать пролиферацию и апоптоз практически во всех перевиваемых клеточных линиях, имеющих происхождение из клеток крови: Т-лимфобласты (Jurkat), В-лимфобласты (NC-37, Namalva), макрофаги (U-937) (13), а, также, клетки промиелоцитарного происхождения (Kg-1, HL-60), эритробластоидного (К-562) и миеломного (U-266, IM-9, RPMI-1788, RPMI-8226) (данные не опубликованы). Стимуляция пролиферации в этих клеточных линиях всегда сопровождалась увеличением количества клеток в состоянии апоптоза. Влияние низких доз вируса гриппа на лимфоциты человека является подтверждением отдаленных последствий гриппозной инфекции, которая может вызвать вспышку лимфолейкозов или обострение после ремиссии, поскольку всегда существует вероятность присутствия в организме трансформированных клеток крови.

Обнаруженное нами стимулирующее действие низких доз вируса на пролиферацию клеток только в двух монослойных клеточных линиях, происходящих из эндотелия и глиобластомы человека, по-видимому, не случайно. Обращает на себя внимание тот факт, что вирус гриппа А в эндотелиальных клетках человека ECV-304, зараженных низкими дозами вируса, поддерживал латентную репродукцию при отсутствии внешних морфологических признаков в виде ЦПД, и не обнаруживался в культуральной жидкости. Латентное инфицирование клеток подтверждается присутствием нуклеопротеина вируса в клетках и синтезом вирусной РНК. Подобная латентная инфекция наблюдалось и при заражении низкими дозами вируса гриппа А Т-лимфобластоидных клеток линии Jurkat (13).

Антивирусные препараты рибавирин, ремантадин и триазавирин, как и в опытах на лимфобластоидных клетках, снижали пролиферацию клеток, стимулированную низкими дозами вируса гриппа.

Интересно отметить тот факт, что две клеточные линии глиобластомы человека Т-98G и А-172, хотя и имели одинаковое происхождение, но отличались как по морфологии, так и функционально. Более мелкие и распластанные клетки Т-98G отвечали усилением пролиферации в ответ на заражение низкими дозами вируса гриппа А, в отличие от более крупных и веретеновидных клеток А-172, хотя и в той и другой линии оба исследуемых вируса вызывали ЦПД. Другими авторами также отмечены отличия между этими клеточными

линиями: нечувствительность клеток А-172, в отличие от клеток Т-98, к стимулирующему действию на пролиферацию клеток инсулиноподобного фактора роста I (14) и устойчивость клеток А-172 к апоптоз-индуцирующему действию энзастаурина, ингибитора протеин киназы С-бета, который вызывал апоптоз в клетках Т-98 (15).

Хорошо известно, какую роль играют в организме клетки эндотелия, и известно особое сродство к этим клеткам вирусов птичьего гриппа (16). Давно обсуждается вопрос об участии вируса гриппа в возникновении заболеваний сердца и сосудов (17).

Существует достаточно много сообщений о роли вируса гриппа в возникновении заболеваний ЦНС, энцефалопатий, энцефалитов, как при экспериментальных, так и клинических исследованиях. Эти заболевания могут явиться результатом отдаленных последствий гриппозной инфекции или врожденных патологий (18, 19, 20). Обсуждается вопрос об участии вируса гриппа в инфицировании микроглии и возникновении болезни Паркинсона, Альцгеймера и множественного склероза (21, 22).

Список литературы

1. **Li I., Chan K., To K., Wong S., Ho P., Lau S., Woo P., Tsou H., Chan J., Cheng V., Zheng B., Chen H., Yuen K.** Differetial susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. J. Clin. Virol. 2009, 46, 4: 325-330.
2. **Даниленко Д.М.**, **Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М.. Еропкин М.Ю., Киселев О.И.** Сравнительное изучение чувствительности клеточных линий различного происхождения к вирусам пандемического гриппа H1N1v, вирусам гриппа птиц, свиней и вирусам гриппа человека. Вопр.вирусол .2010, в печати.
3 **Matrosovich M., Matrosovich T., Carr J., Roberts N., Klenk H-D.** Overexpression of the a-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increasees influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. J. Virol. 2003, 77, 15: 8418-8425.
4 **Zirnov O., Klenk HD**. Human influenza A viruses are proteolitically activated and do not induce apoptosis in CaCo-2 cells. Virology. 2003, 313, 1: 198-212.
5 **Kido H., Okumura Y., Takahashi E., Pan HY., Wang S., Chida J., Le T., Yano M.** Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensible for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. J. Mol. Genet. Med. 2009, 3, 1: 167-175.
6 **Ершов Ф.И., Киселев О.И.** Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). Москва, «ГЭОТАР-Медиа». 2005, 356 с.
7 **Goodman A., Zeng H., Proll S., Peng X., Cilloniz C., Carter V., Korth M., Tumpey T., Katze M.** The alpha/beta interferon receptor provides protection against influenza virus replication but is dispensable for inflammatory response signaling. J. of Virol. 2010, 84, 4: 2027-2037.
8 **Ueda M., Yamate M., du A., Daidoji T., Okuno Y., Ikuta K., Nakaya T.** Maturation effecirncy of viral glycoproteins in the ER impacts the prodaction of influenza A virus. Virus Res. 2008, 136, 1-2: 91-97.

9 **Arcangellitti M., De Condo F., Ferraglia F., Pinardi F., Gatti R., Orlandini G., coven S., Motta F., Rodighiero I., Dettori G., Chezzi C.** Host-cell-dependent role of actin cytoskeleton during the replication of a human strain of influenza A virus. Arch. Virol. 2008, 153: 1209-1221.

10 **Cai J., Chen Y., Seth S., Furukawa S., Compans R., Jones D**. Inhibihion of influenza infection by glutathione. Free Radic. Biol. Med. 2003, 34, 7: 928-936.

11 **Nencioni L., Iuvara A., Aquilano K., Ciriolo M., Cozzolino F., Rptilio G., Garaci E., Palamara A.** Influeza A virus replication is dependent on an antioxidant pathway that involves GSH and Bcl-2. The FASEB J. 2003, 19.

12 **Nencioni L., De Chiara G., Sgarbanti R., Amatore D., Aquilano K., Marrococci M., Serafino A., Torcia M., Cozzolino F., Ciriolo M., Garaci E., Palamara A.** Bcl-2 expression and p38MAPK activity in cells infected with influenza A virus. J. Biol. Chem. 2009, 284, 23: 16004-16015.

13 **Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М.,Кузнецова И.К., Рыжак Г.А.** Разработка модели взаимоотношения вируса гриппа А с перевиваемыми лимфобластоидными клетками человека для изучения биологических особенностей вируса и определения активности антивирусных препаратов. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2009, 24:25-34.

14 **Schlenska-Lange A., Knupfer H., Lange T., Kiess W., Knupfer M.** Cell proliferation and migraition in glioblastoma multiforme cell lines are influenced by insuline-like growth factor I in vitro. Anticancer Res. 2008, 28, 2A:1 055-1060.

15 **Rieger J., Lemke D., Maurer G., Weiler M., Frank B., Tabatabai G., Weller M., Wick W.** Enzastaurin-indused apoptosis in glioma cells is caspase-dependent and inhibited by BCL-XL. J. Neurochem. 2008, 106, 6: 2436-2448.

16 **Feldmann A., Schafer M., Garten W., Klenk HD**. Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in chicken embryons. J. Virol. 2000, 74, 17: 8018-8027.

17 **Madjid M., Aboshady I., Awan I., Litovsky S., Casscels S.** Influenza and cardiovascular disease. Tex.Heart Inst. J. 2004, 31, 1: 4-13.

18 **Зуев В.А., Тенцов Ю.Ю., Шевченко А.М., Ржаникова А.А., Нефедова Н.Б., Игнатова Н.Г., Букринская А.Г**. Персистенция вируса гриппа у детей с врожденной патологией ЦНС. Вопр.вирусол. 1990, 35, 6: 452-456.

19 **Morishima T.** Influenza-asociated encephalopathy. Rinsho Shinkeigaku. 2004, 44, 11: 965-969.

20 **Wang G., Li W., Li K.** Acute encephalopathy and encephalitis caused by influenza virus infection. Curr.Opin.Neurol. 2010, 23, 3: 305-311.

21 **Long-Smith C., Sullivan A., Nolan Y.** The influence of microglia on the pathogenesis of Parcinsons disease. Prog. Neurobiol. 2009, 89, 3: 277-287.

22 **Majde J.** Neuroinflammation resulting from covert brain invasion by common viruses – a potential role in local and global neurodegeneration. Med. Hypotheses. 2010, 75, 2: 204-213.

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ДВУХ ПОСТОЯННЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК ПЛАВНИКОВ СИБИРСКОГО ОСЕТРА, ACIPENSER BAERII

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, морфологических особенностях, параметрах культивирования, подтверждении видовой принадлежности и спектре чувствительности к ихтиовирусам постоянных линий клеток SSF-1 и SSF-2 плавников сибирского осетра.

Ключевые слова: сибирский осетр, плавник, постоянная линия клеток, характеристика.

В настоящее время в мире насчитывается около двух десятков постоянных линий клеток осетровых рыб [1], основное предназначение которых – вирусологические исследования выращиваемых осетровых. Их относительную немногочисленность можно объяснить тем, что интерес к разведению этих рыб в мировой аквакультуре возник сравнительно недавно – примерно 30 лет назад. Первые публикации о получении клеточных линий осетровых - сердца атлантического осетра, *Acipenser oxyrhynchus,* – SH [2] и плавников гибрида белуги и стерляди, *Huso huso x Acipenser ruthenus,* – SF [3] – увидели свет в 1985 г., но широкого применения эти линии не нашли. Сегодня за рубежом вирусологи наиболее часто используют линии клеток селезенки (WSS-2) и кожи (WSSK-1) белого осетра, *Acipenser transmontanus* [4], а в нашей стране - пула паренхиматозных органов (SSO-2) сибирского осетра, *Acipenser baerii* [5].

Настоящая работа посвящена получению и характеристике постоянных клеточных линий, полученных из плавников сибирского осетра, *Acipenser baerii*.

Материал и методы

Рыба. В качестве доноров ткани для получения первичной культуры клеток использовали сеголетков сибирского осетра, полученных из благополучного по инфекционным болезням рыбоводного хозяйства.

Питательные среды, сыворотки и растворы. В работе использовали питательные среды и растворы производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова (0,02% р-р версена и 0,25% р-р трипсина, среды: 199, Игла основная, Игла МЕМ,

Игла 2MEM – с двойным набором аминокислот и витаминов), ГНУ ВНИИВВиМ (RPMI 1640) и Invitrogen-Gibco (среда L15 Лейбовица и фетальная сыворотка КРС).

Линии клеток рыб. Использовали постоянные линии клеток пула почки, печени и селезенки сибирского осетра SSO-2 [5], хвостового стебля синежаберного солнечника BF-2 [6]; сердца кеты CHH-1 [7]; эпидермальных новообразований больного оспой карпа EPC [8] и хвостового стебля черного толстоголова FHM [9]. Клетки выращивали в питательной среде 199 (SSO-2) или в среде Игла 2MEM (остальные) с 10% фетальной сыворотки при температуре 25°C (EPC, FHM, BF-2) и 19°C (CHH-1, SSO-2)без добавления антибиотиков.

Вирусы рыб. Чувствительность линий клеток SSF-1 и SSF-2 определяли к следующим вирусам: SVCV - вирус весенней виремии карпа, штамм M2 [10]; IHNV - вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых, штамм FU/0204 [11]; VHSV - вирус вирусной геморрагической септицемии, штамм ЧФ 1,2 [11]; EVEX - вирус европейского угря, *Rhabdovirus anguilla*, изолят УФ [12]; PFRV - рабдовирус мальков щуки [13], ELTV - вирус европейской озерной кумжи [14], “Hecht”- везикуловирус IV геногруппы [13]; IPNV - бирнавирус инфекционного некроза поджелудочной железы (получен от д-ра E. Neuvonen, Ветеринарный институт, Хельсинки); CCIV - иридовирус карпа, штамм 4БЖ [15]; SbSHV - герпесвирус сибирского осетра, штамм SK1/0406 [16].

Приготовление препаратов для исследования морфологических характеристик клеток. Для изучения морфологических особенностей клеток проводили регулярное, в течение всего срока инкубации, микроскопирование нативных и окрашенных по Паппенгейму [17] препаратов при разном инструментальном увеличении.

Подсчет клеток вели в четырех полных камерах Горяева, используя для оценки их жизнеспособности 0,5% раствор трипанового синего [17]. Плотность клеток рассчитывали как количество клеток, приходящееся на 1 см^2 рабочей поверхности и выражали в виде среднего значения ± среднее квадратическое отклонение.

Результаты и обсуждение

Получение постоянных клеточных линий плавников сибирского осетра, *Acipenser baerii.*

Специалистам хорошо известно, что плавники рыб обладают высокой регенеративной способностью. Наиболее выделяется в этом отношении хвостовой плавник. Этот факт, а также то, что наибольшее количество известных на сегодня клеточных линий рыб получено именно из плавников [1], вселяли надежду на положительный исход работы. Выбор плавников

был обусловлен еще и тем, что значительная часть их тканей представлена кожей, которая является основной мишенью ряда опасных вирусов осетровых рыб [18, 19].

У восьми клинически здоровых сеголетков осетра отрезали хвостовой плавник, помещали в среду Игла МЕМ с антибиотиками (1000 ЕД/см^3 пенициллина, 1000 мкг/см^3 стрептомицина и 200 ЕД/см^3 нистатина) в соотношении 1:10 и выдерживали при комнатной температуре в течение 10 минут при регулярном встряхивании. Такую отмывку повторяли еще 2 раза, а затем на 5-7 сек плавники помещали в 70° этанол, после чего трехкратно отмывали в среде Игла МЕМ с 300 ЕД/см^3 пенициллина, 300 мкг/см^3 стрептомицина и 100 ЕД/см^3 нистатина.

Обработанные плавники измельчали ножницами до величины 1-2 мм и вновь трижды отмывали средой того же состава. К полученной ткани добавляли раствор трипсина в соотношении 1:10. После 15-минутной дезагрегации на магнитной мешалке при комнатной температуре надосадочную жидкость отбрасывали, трижды промывали ткань средой Игла МЕМ, добавляли свежую порцию раствора трипсина и дальнейшую дезагрегацию проводили на магнитной мешалке в течение ночи при температуре 6°С, а затем 1 час при комнатной температуре (21°С). Взвесь клеток центрифугировали при 60g в течение 15 минут, подсчитывали, готовили суспензию в ростовой среде с концентрацией около 10^6 кл./см^3, разливали в пробирки по 1 см^3 и инкубировали при 21,5^{o}С. В качестве ростовой среды использовали:

1) среду 199 с 20% фетальной сыворотки и антибиотиками (пенициллин 100 ЕД/см^3 и стрептомицин 100 мкг/см^3);

2) среду Игла МЕМ с 20% фетальной сыворотки и антибиотиками.

Через двое суток после посева наблюдали образование монослоя, состоявшего из смеси фибробласто- и эпителиоподобных клеток. За первичными культурами вели длительное (около 5 месяцев) наблюдение. По мере закисления среды производили ее смену на свежую.

В ходе инкубации культур было отмечено изменение морфологии монослоя в отдельных пробирках: в одних стали преобладать эпителиоподобные клетки, в других появлялись островки фибробластоподобных клеток.

Субкультивирование первичных культур проводили в разные сроки с момента посева (от 22 дней до 5 месяцев). Для диспергирования клеточного монослоя использовали смесь растворов трипсина и версена в соотношении 1:1,5. В качестве ростовой среды использовали среды того же состава, что и при получении первичных культур. Легко удавалось получать субкультуры и пассировать их 2-8 раз. Однако, после этого клетки погибали.

В одной из пробирок с первичной культурой клеток после четырех месяцев инкубации произошло почти полное вытеснение фибробластоподобных клеток эпителиоподобными. Многократное субкультивирование этой культуры в среде 199 с 20% фетальной сыворотки было успешным, однако монослой ее оставался неоднородным, хотя и был представлен преимущественно эпителиоподобными клетками. С 25-го пассажа культуру перевели на среду Игла 2MEM с 20% фетальной сыворотки. Последующее субкультивирование дало начало перевиваемой клеточной линии SSF-1 (Siberian sturgeon fins - 1). На протяжении примерно 100 пассажей морфология культуры не менялась. В дальнейшем стали наблюдать ее изменение в интервалах между пересевами, сохраняющееся и по настоящее время. Оно состоит в переходе от эпителиоподобных клеток, доминирующих в монослое вскоре после посева клеток, к фибробластоподобным, преобладающим в “зрелой” культуре перед очередным ее пересевом. К настоящему времени клеточная линия SSF-1 прошла более 280 пассажей.

Из пробирок с первичными культурами, в которых в процессе длительной инкубации (около 4 месяцев) появились островки фибробластоподобных клеток, диспергирующим раствором вышеуказанного состава удалось удалить все клетки кроме клеток этих островков. Добавление свежей порции среды 199 с 20% фетальной сыворотки и инкубация при 21,5^{o}C привели к формированию монослоя, состоявшего только из фибробластоподобных клеток. Дальнейшее субкультивирование оказалось успешным и дало начало клеточной линии SSF-2 (Siberian sturgeon fins - 2). Эта линия прошла уже более 280 пассажей без изменения морфологии клеток.

Содержание сыворотки в ростовой среде для обеих клеточных линий было постепенно снижено до 10%, а добавление антибиотиков прекращено.

Характеристика постоянных клеточных линий плавников сибирского осетра, *Acipenser baerii*

Морфология. Популяция клеток линии SSF-1 представлена как эпителио- так и фибробластоподобными клетками. В первые 7 суток после посева преобладают в основном эпителиоподобные клетки (рис. 1). При окраске по Паппенгейму эти клетки отросчатые, распластанные по субстрату, с размытыми краями. Контакты между клетками неплотные, с большим межклеточным пространством. Ядра средних размеров, овальной формы, с четко очерченными границами. Цитоплазма и кариоплазма гомогенны. Количество ядрышек от 1 до 7, чаще 2-3 на клетку. С увеличением возраста культуры морфология клеток постепенно

меняется на фибробластоподобную. Образующиеся фибробласты представляют собой тонкие длинные нитеподобные клетки.

Монослой линии SSF-2 состоит из рыхло лежащих фибробластоподобных клеток, расположенных пучками (рис. 1). При окраске по Паппенгейму цитоплазма клеток выглядит неоднородной, с интенсивно и слабоокрашенными участками. Ядра клеток крупные, кариоплазма гомогенная. Количество ядрышек от 1 до 6, чаще 3-4 на клетку.

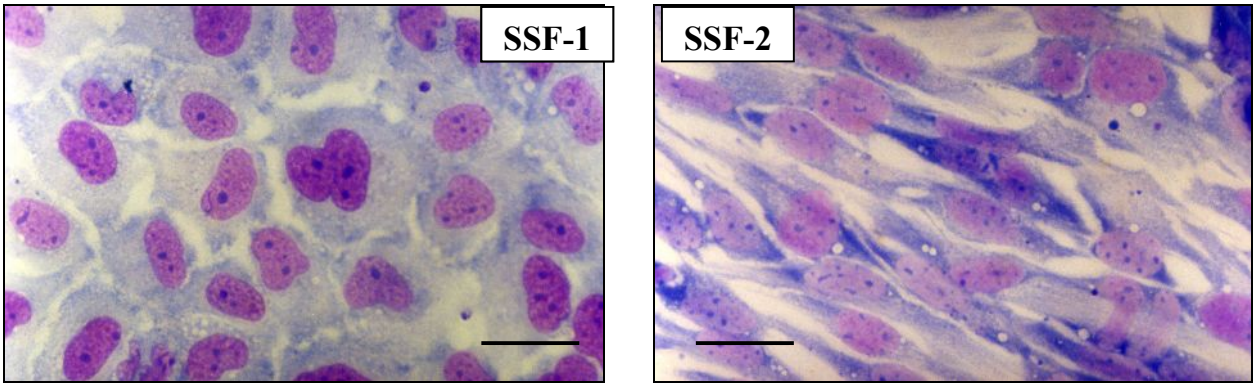


Рис. 1. Морфология клеточных линий плавников сибирского осетра
Окраска по Паппенгейму. Масштабная линейка - 20 мкм.

Влияние посевной плотности на рост клеток. Сформировавшуюся для очередного пассажа культуру клеток ресуспендировали в исходном объеме среды роста (Игла 2МЕМ для SSF-1 и среда 199 для SSF-2 с 10% фетальной сыворотки) и после приготовления двукратных разведений в ней высевали в 24-луночные планшеты (Linbro) и культивировали при температуре 20°С. При образовании плотного монослоя количество выросших клеток подсчитывали, объединяя по 5 лунок с культурой (табл. 1).

Таблица 1. Влияние посевной плотности клеток на показатели роста культур SSF-1 и SSF-2

Линия клеток	Посевная плотность, тыс.кл./см^2*	Индекс пролиферации / время образования монослоя (сутки) при разных коэффициентах субкультивирования					
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
SSF-1	340±9	1,7/0,25	2,5/0,5	4,6/1	3,5/6	3,0/22	1,2/н.с.
SSF-2	460±11	2,1/0,5	3,5/1	4,0/1	3,9/8	2,5/н.с.	1,1/н.с.

Примечание: * - приведена плотность клеток при посеве с коэффициентом субкультивирования 1:1; н.с. – конфлюэнтный монослой не сформировался в течение всего срока наблюдения (22 суток).

Установлено, что клеточные линии SSF-1 и SSF-2 одинаково реагировали на изменение посевной плотности клеток. При повышенных плотностях посева клеток монослой достигал состояния насыщения уже через 6 - 12 ч (табл. 1). При этом вступало в действие контактное

торможение, и индекс пролиферации был низким (1,7-2,1). Много клеток не прикреплялось к субстрату, и культуры быстро начинали дегенерировать. Низкие плотности посева удлиняли срок образования монослоя. Индекс пролиферации при этом также был низким, клеточный монослой оставался тонким и не достигал состояния насыщения, несмотря на продолжительный (22 суток) срок инкубации. Можно предположить, что клетки обеих линий вырабатывают какие-то ростовые факторы, и низкая посевная плотность клеток не обеспечивает той концентрации этих факторов в среде, которая необходима для их нормального роста. На основании полученных данных был сделан вывод, что оптимальными плотностями посева клеток изучаемых линий, которые обеспечивали высокий индекс пролиферации, наибольший урожай клеток и продолжительную сохранность их в культуре, были плотности 8–9 $x10^4$ кл./$см^2$ для линии SSF-1 и 11-12 $x10^4$ кл./$см^2$ для линии SSF-2.

Особенности роста клеток в средах разного состава. Суспензию клеток с посевной плотностью $8x10^4$ кл./$см^2$ для культуры SSF-1 и $14x10^4$ кл./$см^2$ для SSF-2 готовили в указанных ниже средах разного состава с 10% фетальной сыворотки, высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали при 20°C.

Пролиферация клеток линий SSF-1 и SSF-2 отмечалась во всех испытанных средах. Монослой формировался уже через сутки, однако динамика роста клеточных линий на разных средах различалась (рис. 2). Наибольший прирост клеток линии SSF-1 наблюдался в средах Игла MEM, Игла 2MEM и RPMI 1640 (индекс пролиферации соответственно 4,4, 4,6 и 4,7). В то же время в среде RPMI 1640 отмечали повышенную гибель клеток. Клетки линии SSF-2 значительно лучше росли в среде 199 (индекс пролиферации 4), чем в других питательных средах. К тому же в процессе культивирования клеток линии SSF-2 в средах Игла MEM, Игла 2MEM, RPMI 1640 и L15 происходило изменение морфологии клеток. Из фибробластоподобных они превращались в эпителиоподобные.

Анализ особенностей роста в средах разного состава показал, что наилучший рост клеток (в смысле динамики прироста, максимального урожая клеток и продолжительности сохранения монослоя) полученных клеточных линий имел место в тех средах, на которых они были получены, т.е. в среде Игла 2MEM – для SSF-1 и среде 199 – для SSF-2. Вероятно, это явилось результатом продолжительной адаптации клеточных линий к “своим” питательным средам.

Вместе с этим, адаптация клеток к росту в определенной среде вовсе не означает, что их рост в других средах будет заведомо хуже. Это прекрасно демонстрирует линия клеток SSF-

1, полученная с использованием малокомпонентной среды Игла 2МЕМ, она давала наибольший прирост клеток в многокомпонентной среде RPMI-1640. Отмеченные при этом повышенная гибель и переход клеток во взвешенное состояние, по нашему мнению, могли быть явлением временным, обусловленным адаптацией культуры к изменившимся условиям существования. Весьма вероятно, что дальнейшее пассирование клеток на этой среде могло бы привести к появлению новой перевиваемой линии клеток с иными фенотипическими признаками.

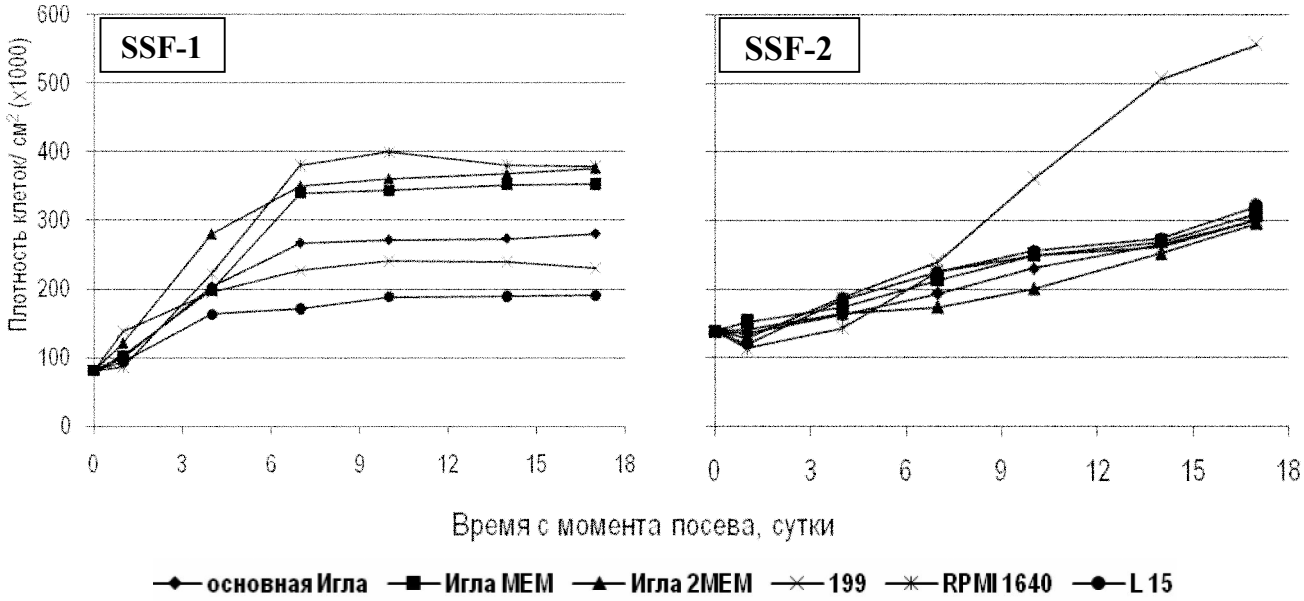


Рис. 2. Пролиферативная активность клеточных линий плавников сибирского осетра в средах разного состава

Пролиферативная активность клеток при разных температурах инкубации. Суспензию клеток линий SSF-1 и SSF-2 готовили в оптимальной для каждой линии среде (Игла 2МЕМ для SSF-1 и среда 199 для SSF-2) с 10% фетальной сыворотки, высевали в 24-луночные планшеты (посевная плотность $9x10^4$ кл./см^2 для культуры SSF-1 и $13x10^4$ кл./см^2 для SSF-2) и инкубировали при разных температурах (10° - 30^oC). В результате проведенных исследований было показано, что температурно-ростовые характеристики обеих линий существенно различались (рис. 3). Если клетки линии SSF-1 начинали активно расти сразу после посева при всех испытанных температурах, то клетки линии SSF-2 в первые сутки практически не росли ни при одной из них. В дальнейшем при двух экстремальных температурах (10° и 30^oC) роста у них также не было, хотя образование монослоя происходило. Динамика роста клеток в диапазоне $15-25^oC$ была схожей, но клетки линии SSF-1 росли активнее клеток линии

SSF-2. У обеих линий температурный оптимум находится около 20°С. При 30°С монослой клеток линии SSF-1 до окончания срока наблюдения (14 сут) оставался полным, хотя на его поверхности и в культуральной среде появлялось большое количество округлых клеток. Инкубация клеток линии SSF-2 при 30°С не приводила к увеличению концентрации клеток, однако монослой также сохранялся в течение всего срока наблюдения.

Проведенные исследования показали, что обе линии обладают уникальными температурными характеристиками роста. При этом установленная оптимальная температура роста клеток линий (20°С) была близка к температурным оптимумам рыб-доноров, от которых эти клеточные линии были получены: 20-26°С [20]. Температуры, не сильно превышавшие оптимальную, стимулировали бурный рост клеток, вскоре сменявшийся дегенерацией культур, вероятно, вследствие истощения физиологических ресурсов клеток. При дальнейшем повышении температуры инкубации культуры либо не росли вообще, либо наблюдали краткосрочный умеренный рост, сопровождавшийся скорой гибелью клеток.

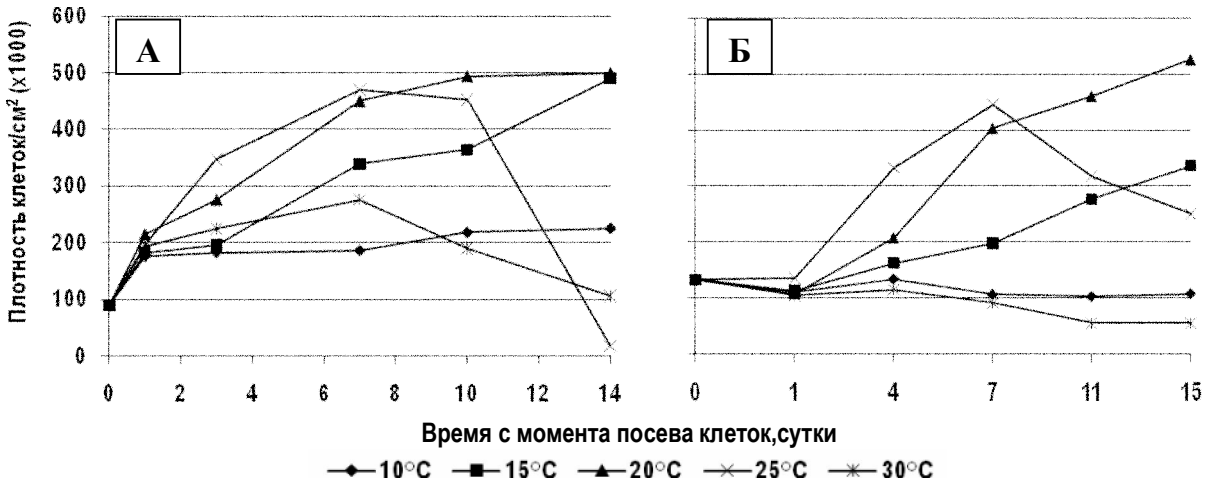


Рис. 3. Пролиферативная активность клеток постоянных линий SSF-1 (А) и SSF-2 (Б) при разных температурах инкубации

Гораздо лучше клетки переносили понижение температуры инкубации: при 10°С все клеточные линии демонстрировали либо замедленный рост, либо переживали на протяжении всего срока наблюдения. Толерантность клеточных линий рыб к пониженным температурам с успехом используют для продолжительного (месяцы и годы) хранения их в лабораторных условиях [21].

Данные по определению температурных особенностей роста клеточных линий рыб как пойкилотермных животных имеют не просто описательное значение, позволяющее

охарактеризовать их еще с одной стороны. Они могут быть использованы для управления ростом клеток в рамках решения конкретных экспериментальных задач.

Контроль клеточных линий на контаминацию микроорганизмами. При исследовании клеточных линий 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 [22] получены отрицательные результаты.

Чувствительность к вирусам рыб. Спектры чувствительности клеточных линий SSF-1 и SSF-2 к вирусам рыб схожи, но в то же время индивидуальны. Обе клеточные линии чувствительны к герпесвирусу сибирского осетра и почти ко всем испытанным рабдовирусам рыб, за исключением вируса IHN (табл. 2). Они не чувствительны также к бирнавирусу IPNV и иридовирусу карпа CCIV.

Таблица 2. Результаты определения чувствительности клеточных линий SSF-1, SSF-2 и референсных к вирусам рыб

Вирусы	Референсная линия клеток	Титр вируса					
		Референсная линия клеток		SSF-1		SSF-2	
Рабдовирусы							
SVCV	EPC	7,10±0,11*	8,10±0,12**	7,35±0,10*	6,10±0,12**	7,35±0,13*	8,60±0,12**
IHNV	EPC	9,10±0,11*	7,85±0,21**	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
VHSV	EPC	6,35±0,12*	9,10±0,11**	5,10±0,10*	н.о.	н.о.	5,10±0,11**
EVEX	FHM	7,10±0,11▪	7,85±0,14**	7,35±0,11▪	6,85±0,12**	7,85±0,11▪	7,35±0,10**
PFRV	EPC	8,60±0,14▪	8,35±0,12**	7,85±0,12▪	8,35±0,10**	7,35±0,11▪	8,85±0,12**
“Hecht”	EPC	8,10±0,13▪	8,35±0,15**	7,10±0,13▪	7,35±0,12**	7,10±0,12▪	7,35±0,12**
ELTV	BF-2	7,00±0,15▪	7,10±0,11**	5,10±0,11▪	4,35±0,11**	7,35±0,11▪	6,10±0,11**
Бирнавирус							
IPNV	CHH-1	4,40±0,12*	8,10±0,12**	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Иридовирус							
CCIV	EPC	н.и.	6,00±0,12**	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Герпесвирус							
SbSHV	SSO-2	6,10±0,13*	6,10±0,13**	5,85±0,12*	5,85±0,13**	5,35±0,12*	5,35±0,13**

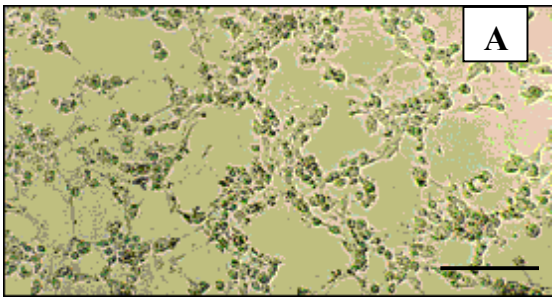
Примечание: * - титр вируса в патматериале, lg $ТЦД_{50}$/г ткани; ** - титр вируса после 3-х пассажей на культуре клеток, lg $ТЦД_{50}/см^3$ культуральной жидкости; ▪ - титр вируса, накопленного на референсной линии клеток, lg $ТЦД_{50}/см^3$ культуральной жидкости; н.и. – не исследовали; н.о. – признаков ЦПД не обнаружено.

Примечательно, что линия клеток SSF-1 выявляла вирус VHS при заражении её патологическим материалом от больных рыб, однако к третьему пассажу *in vitro* цитопатогенное действие (ЦПД) вируса утрачивалось. Линия клеток SSF-2 вела себя прямо противоположным образом. При инокуляции её патологическим материалом ЦПД не

наблюдали, однако дальнейшее пассирование приводило к адаптации вируса, и после 3-х пассажей его титр достигал 5,1 lg ТЦД$_{50}$/см^3.

Наиболее чувствительной линия SSF-2 оказалась к антигенно-родственным между собой вирусам SVCV и PFRV. Титры, в которых эти вирусы в ней накапливались (8,60 и 8,85 lg ТЦД$_{50}$/см^3, соответственно), превосходили таковые для референсной линии (8,10 и 8,35 lg ТЦД$_{50}$/см^3, соответственно). Клеточная линия SSF-1 эффективно выявляла вирус SVCV в патологическом материале, превосходя по чувствительности референсную линию клеток (7,35 и 7,10 lg ТЦД$_{50}$/г ткани, соответственно). Однако дальнейшее пассирование на ней приводило не к увеличению титра, как это отмечалось для референсной линии, а к снижению с 7,35 до 6,10 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Вирусрепродуцирующая активность этой линии к вирусу PFRV не отличалась от таковой для референсной линии клеток. Время появления и характер ЦПД вирусов SVCV и PFRV в этих и референсной клеточных линиях в целом не различались. ЦПД проявлялось в виде округления клеток, разрежения монослоя и появления клеток с длинными тонкими отростками, придающими пораженной культуре клеток вид сеточки (рис. 4А).

Первые признаки ЦПД герпесвируса сибирского осетра в SSF-1 и SSF-2 появлялись в те же сроки, что и на SSO-2, однако полная деструкция монослоя наступала позже – на 11-14 сутки и только при заражении высокими дозами вируса. Отличительной особенностью герпесвирусного ЦПД в культуре клеток SSF-2 было слияние клеток и образование многоядерных симпластов. Количество ядер в симпластах нередко исчислялось несколькими десятками. На поздних стадиях инфекции симпласты постепенно округлялись, приобретая форму шара, который крепился к субстрату длинными отростками (рис. 4Б). Постепенно симпласты утрачивали связь с субстратом и переходили во взвешенное состояние.



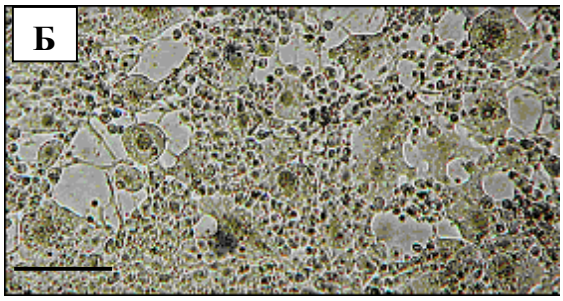


Рис. 4. ЦПД в культуре клеток SSF-2 рабдовируса весенней виремии карпа (А) и герпесвируса сибирского осетра (Б)
Неокрашенные препараты. Масштабная линейка - 80 мкм.

Видовая идентичность полученных клеточных линий подтверждена полимеразной цепной реакцией с праймерами ABRM (TGTCTGTCTAGAACATATG) и AHR (TATACACCATTATCTCTATGT), специфически связывающимися с определенными локусами D-петли митохондриальной ДНК сибирского осетра [23]. Наличие двух ПЦР-продуктов длиной 138 и 215 п.н. указывало на видовую принадлежность исследованных образцов клеточных линий сибирскому осетру (A. baerii).

Таким образом, из одного образца донорской ткани получены две различных по свойствам линии клеток, которые могут стать полезным инструментом в работе с ихтиовирусами.

Благодарности. Авторы выражают признательность руководителю Центра молекулярно-генетической идентификации СИТЕС В.А. Барминцеву (ВНИРО) за помощь в видовой идентификации клеточных линий и заведующей лабораторией бактериологии ГНУ ВНИИВВиМ И.Ю. Егоровой за контроль контаминации линий микоплазмой.

Список литературы

1. **Щелкунова Т.И.** Перевиваемые линии карпа (*Cyprinus carpio*) и сибирского осетра (*Acipenser baeri*), их использование в ихтиовирусологии. Диссертация канд. биол. наук. Покров. 2007, 154 с.

2. **Li M.F, Marragatt V., Annand C., Obense P.** Fish cell culture: two newly developed cell lines from atlantic sturgeon, (*Acipenser oxyrhynchus*) and guppy (*Poecilia reticulata*). Canad. J. Zool. 1985, 63: 2867-2874.

3. **Sano T.** Herpesvirus cyprini: biological and oncogenic properties/ T. Sano, H. Fukuda, M. Furukawa. Fish Pathology. 1985, 20(2/3): 381-388.

4. **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: Fryer J.L. (Ed.) “Proceedings of the Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates”. Corvallis, OR: Oregon State University Press. 1991: 165-174.

5. **Щелкунова Т.И., Купинская О.А., Мащенко Н.А., Щелкунов И.С.** Клеточные линии из тканей сибирского осетра. Первый конгресс ихтиологов России: тез. докл. - Астрахань, сентябрь 1997: 302-303.

6. **Wolf K., Quimby M.C.** Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. Science. 1966, 151: 1004-1005.

7. **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.

8. **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.

9. **Gravell M., Malsberger R.C.** A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas)*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1965, 126: 555-565.

10. **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.

11. **Щелкунов И.С.** Эпизоотическая ситуация по вирусным болезням культивируемых рыб. Ветеринария. 2006, 4: 22-25.

12. **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.

13. **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.

14. **Koski P., Hill B.J., Way K., Neuvonen E., Rintamäki P.** A rhabdovirus isolated from brown trout (*Salmo trutta* m. *lacustris* L.) with lesions in parenchymatous organs. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 1992, 12: 177-180.

15. **Попкова Т.И., Щелкунов И.С.** Выделение вируса от карпов, больных жаберным некрозом. Рыбное хоз-во. 1978, 4: 4-38.

16. **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.

17. Лабораторный практикум по болезням рыб/ под ред. В.А. Мусселиус. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983, 296 с.

18. **Hedrick R.P., McDowellT.S., Rosenmark R., Aronstein D., Lannan C.N.** Characteristics of two viruses isolated from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Proceedings Second Intern. Symp. Virus. Lower Verteb. Ed.: J.L. Fryer -Corvallis, OR: Oregon State Univer. Press, 1991: 165-174.

19. **Watson L.R., Yun S.C., Groff J.M., Hedrick R.P.** Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and sub adult white sturgeon *Acipenser transmontanus*. Dis. Aquat. Org. 1995, 22: 199 -210.

20. **Щербина М.А. Гамыгин Е.А.** Кормление рыб в пресноводной аквакультуре. М. ВНИРО. 2006, 360 с.

21. **Wolf K., Quimby M.C.** Fish cell and tissue culture. Fish Physiology Eds.: W.S. Hoar and D.J. Randall. N.Y. Acad. Press. 1969, 3: 253-305.

22. Наставление по применению тест-системы «МИК-КОМ» для диагностики микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции: утверждена Деп. ветеринарии Минсельхозпрода России 17 августа 1998 г., 11с.

23. **Н.С.Мюге, А.Е. Барминцева.** Набор олигонуклеотидных праймеров для определения видовой принадлежности осетровых рыб и продукции из них. Патент № 2 332 463, Россия; заявлено 25.01.2007; опубл. 27.08.2008, Бюл. № 24, 11с.

ОРГАНОТИПИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСЫ

Е. Я. Адоева

Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова, кафедра биологии, Санкт-Петербург,

adoeva@mail.ru

Проведено длительное органотипическое культивирование эмбриональной поджелудочной железы крысы. В органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы происходит перестройка ацинусов в эпителиальные трубки. Эпителиоциты выводных протоков и эпителиальных трубок активно делятся и претерпевают процесс вторичной секреторной дифференцировки. Можно считать, что образование инсулоцитов в органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы происходит в результате следующих процессов: 1) дифференцировки отдельных эпителиоцитов в составе эпителиальных трубок; 2) пролиферации эндокринных клеток; 3) ацино-инсулярной трансформации эпителия.

Ключевые слова: органные культуры, ацинус, инсулоцит, пролиферация клеток, вторичная дифференцировка, выводные протоки, эпителиальные трубки, ацино-инсулярная трансформация.

В работах отечественных и зарубежных авторов описаны методики получения и культивирования экзокринных и эндокринных клеток, а также изолированных островков поджелудочной железы млекопитающих и человека (1, 2, 3, 4). Из имеющихся в настоящее время методических приемов органные культуры лучше всего удовлетворяют требованиям по длительному поддержанию дифференцировки клеток in vitro (5, 6, 7, 8). Они являются чрезвычайно удобными моделями для изучения экзогенных и эндогенных факторов, определяющих ход и направление этого процесса (9, 10, 11, 12, 13). Органотипическое культивирование занимает промежуточное положение между экспериментами на животных и культурах клеток. С одной стороны, органные культуры представляют собой относительно простую систему по сравнению с организмом. Это позволяет исключить опосредованные нейрогуморальные влияния, которые имеют место в целом организме. С другой стороны, в органных культурах осуществляются ограниченное размножение и дифференцировка, аналогичные имеющим место в организме. В качестве источников органных культур чаще всего используются эмбриональные ткани, малодифференцированные клетки которых

быстрее адаптируются к условиям культивирования и обладают большей потенцией роста и развития по сравнению с высокодифференцированными клетками взрослого организма.

Целью нашего исследования было изучение структурно-функциональных изменений экзокринных и эндокринных клеток поджелудочной железы крысы в процессе органотипического культивирования.

Материал и методы

В стерильных условиях извлекали поджелудочную железу 20-дневных эмбрионов крыс, промывали ее в растворе Хэнкса с антибиотиками (по 300 ЕД/мл пенициллина и 300 мкг/мл стрептомицина) и разрезали на кусочки с размером сторон 1–2 мм. Культивирование проводили по методу множественных органных культур (5). В стеклянную чашку Петри помещали пластмассовую платформу с отверстиями для фильтров. Мембранные фильтры с размером пор 40 мкм (фирма «Synpor», ЧССР) разрезали на кусочки и помещали в отверстия платформы таким образом, чтобы они своей нижней поверхностью соприкасались с питательной средой, а между ней и фильтром не скапливались пузырьки воздуха. Фрагменты эксплантированного материала помещали на мембранные фильтры. Питательная среда имела следующий состав: среда 199 — 70%; сыворотка крупного рогатого скота (фирма «Биолот») — 20%; куриный эмбриональный экстракт — 10%; аскорбиновая кислота — 0,07 мг/мл; глюкоза — 4 мг/мл; пенициллин — 50 ЕД/мл; стрептомицин — 50 мкг/мл. Культивирование проводили при 36,5–37 ^{o}C в термостате с автоматической подачей CO_2 (5%). Для гистологического и гистохимического исследования эксплантаты поджелудочной железы фиксировали по общепринятым методикам в 10-процентном забуференном нейтральном формалине. Срезы получали на ротационном микротоме и окрашивали гематоксилином Карачи с подкраской эозином.

Для исследования динамики синтеза ДНК в клетках эксплантаты инкубировали с ^{3}H-тимидином (отечественного производства, удельная активность 730 ГБк/ммоль). В культуральную среду за час до фиксации эксплантатов вводили радиоактивный тимидин в дозе $3{,}7 \times 10^{4}$ Бк/мл. Автографы получали общепринятым способом. На автографах определяли индекс первично меченых ядер (ИПМЯ) — количество меченых ядер на 100 клеток. На этих же срезах подсчитывали митотический индекс (МИ) — количество митозов на 1000 клеток. Статистическую обработку количественных данных проводили с учетом индивидуальной изменчивости признака (14).

Для электронно-микроскопического исследования органные культуры фиксировали в 2,5-процентном растворе глутарового альдегида по общепринятым методикам и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III и изучали с помощью электронного микроскопа JFM-7A° при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты и обсуждение

На 20-й день эмбриогенеза экзокринный отдел поджелудочной железы крысы представлен почти полностью сформированными концевыми отделами - ацинусами. Ядра ацинозных клеток располагаются в базальных отделах цитоплазмы. В цитоплазме клеток отмечается увеличение содержания гранул зимогена, которые локализуются не только в апикальных, но и в базальных отделах цитоплазмы. На субмикроскопическом уровне в цитоплазме клеток выявляется хорошо развитая шероховатая эндоплазматическая сеть. Комплекс Гольджи в ацинозных клетках, завершивших дифференцировку, выражен, как правило, слабо.

Эпителиоциты выводных протоков находятся в состоянии высокой функциональной активности. В них отмечается расширение канальцев шероховатой эндоплазматической сети, гипертрофия комплекса Гольджи, просветление матрикса митохондрий.

В эндокринных островках преобладают В-клетки, в цитоплазме которых содержатся многочисленные гранулы инсулина. Тесный контакт гранул с плазмалеммой указывает на выведение секрета. Особенно интенсивно развивается эндокринный аппарат в последние три дня эмбриогенеза (с 20-го по 23-й день): увеличиваются размеры островков, возрастает количество гранулированных В-клеток. На 20–22-й день на периферии островков появляются А-клетки. К моменту рождения эндокринный аппарат развит у крысы хорошо, но еще не достигает своего дефинитивного состояния.

Из литературы известно, что в развитии органных культур выделяют, как правило, три периода: 1) адаптации, 2) пролиферации и дифференцировки, 3) дегенерации (5). В органных культурах сохраняются межклеточные взаимодействия, и в течение долгого периода времени поддерживается гистологическая и биохимическая дифференцировка. После начальной травмы, связанной с эксплантацией, образуются центральные некрозы. В периферической части эксплантатов сохраняются жизнеспособные ткани, и в дальнейшем органные культуры остаются, как правило, в нерастущем равновесном состоянии в течение нескольких дней и даже недель.

В органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы на протяжении 9-10 суток культивирования длится *период адаптации*. Он сопровождается дистрофическими и

некротическими процессами, гибелью клеток и фагоцитозом продуктов распада. К этому времени выживают 66,7 ± 13,6% эксплантатов (см. табл. 1). Затем следует период *пролиферации* и *дифференцировки*, который длится с 11 суток по 17-е сутки культивирования, сопровождается интенсивным размножением клеток, продукцией секреторных белков и формированием секреторных гранул, а также характеризуется относительным постоянством доли развивающихся эксплантатов (см. табл. 1). Полученное снижение этого показателя с 66,7% через 11 суток до 44,4% через 15 суток культивирования недостоверно ($p > 0,05$). Только на 17-е сутки отмечается снижение выживаемости эксплантатов в два раза (22,2 ± 9,8%; $p < 0,05$). *Период дегенерации* или старения культур начинается через 17–18 суток культивирования и заканчивается гибелью эксплантатов. Однако и через 30 суток культивирования 16,7 ± 8,8 % эксплантатов остаются жизнеспособными.

Таблица 1.

Выживаемость эксплантатов поджелудочной железы эмбрионов крысы в процессе органотипического культивирования

(X ± x; n = 12-18)

Сроки культивирования, сутки	Развивающиеся эксплантаты, %
9	66,7 ± 13,6
11	66,7 ± 13,6
12	58,3 ± 14,2
13	50,0 ±14,4
15	44,4 ± 11,7
17	22,2 ± 9,8
30	16,7 ± 8,8

Морфология развивающихся культур характеризуется следующими особенностями. Во время *периода адаптации* наблюдаются дистрофические и некротические изменения эпителия. В этой стадии культивирования центральные участки большинства эксплантатов некротизированы. Жизнеспособный эпителий сохраняется в периферической части эксплантатов, а по самому краю кусочков формируется однослойная соединительнотканная или соединительнотканно-эпителиальная капсула, которая сохраняется до конца культивирования. Между центральной и периферической зонами эксплантатов располагается

переходная зона, в которой концевые отделы и выводные протоки находятся на разных этапах дистрофических изменений. Происходит вакуолизация цитоплазмы, фрагментация и пикноз ядер клеток. Часть концевых отделов подвергается некрозу и декомплексации. Во время *периода адаптации* в ацинозных клетках отмечается набухание митохондрий и просветление их матрикса. Кристы митохондрий укорочены, часть из них фрагментируется. В некоторых клетках расширяются канальца шероховатой эндоплазматической сети и образуются крупные вакуоли. В ядрах происходит расширение перинуклеарного пространства; хроматин располагается в виде глыбок у ядерной оболочки. Дистрофические и дегенеративные изменения в равной степени определяются в клетках экзокринного и эндокринного эпителия, а также в стромальных фибробластах. В центральной части эксплантатов и среди некротизирующихся ацинусов встречаются многочисленные макрофаги и лейкоциты, участвующие в фагоцитозе продуктов клеточного распада.

В периферической зоне эксплантатов часть ацинусов подвергается структурно-функциональной перестройке, результатом которой является образование эпителиальных трубок, сходных с первичными эпителиальными трубками раннего этапа эмбрионального гистогенеза поджелудочной железы. В их образовании участвует не только эпителий ацинусов, но и эпителий протоков. Отмечается уплощение ацинозных клеток, в них редуцируется шероховатая эндоплазматическая сеть, исчезают гранулы зимогена. Трубки выстланы кубическими или низкопризматическими эпителиальными клетками, просветы их расширены. В цитоплазме эпителиоцитов отсутствует зимогенная зернистость, присутствует небольшое количество органоидов, которые представлены единичными канальцами шероховатой эндоплазматической сети, свободными рибосомами и полисомами, мелкими митохондриями. Местами среди эпителиальных трубок встречаются дистрофически измененные ацинусы и скопления эндокринных клеток, а также соединительнотканные клетки, образующие «тяжи» между эпителиальными структурами. Структурно-функциональная перестройка эпителия сопровождается усилением его пролиферативной активности.

Период пролиферации и дифференцировки в эксплантатах поджелудочной железы характеризуется следующими особенностями. Через 11 суток культивирования экзокринная паренхима представлена в основном эпителиальными трубками, образованными в результате структурно-функциональной перестройки ацинусов и пролиферации эпителия выводных протоков. Отмечается интенсивный рост трубок. Эпителиоциты приобретают полярное строение. Крупные, овальной формы ядра располагаются в базальной части цитоплазмы.

Цитоплазма бедна органоидами. Шероховатая эндоплазматическая сеть представлена одиночными канальцами и пузырьками. Митохондрии мелкие, овальной или округлой формы, содержат редко расположенные кристы, матрикс умеренной электронной плотности. Комплекс Гольджи часто слабо развит, много свободных рибосом и полисом.

Результаты изучения некоторых показателей пролиферативной активности эпителиоцитов эмбриональной поджелудочной железы в процессе органотипического культивирования приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Изменение показателей пролиферативной активности эпителиоцитов эмбриональной поджелудочной железы крысы в органных культурах

(X ± x; n = 12-18)

Сроки исследования, сутки	Показатель	
	ИПМЯ,%	МИ, ‰
9	4,8±0,9	1,9±0,4
11	8,0±0,5	3,3±0,7
12	7,6±0,6	2,0±0,7
13	5,3±0,2	0,3±0,1
15	3,2±0,1	0

Примечание: ИПМЯ (индекс первично меченых ядер) — количество меченых ядер на 100 клеток; МИ (митотический индекс) — количество митозов на 1000 клеток.

Эпителиоциты эмбриональной поджелудочной железы крысы на протяжении 15 суток культивирования активно включают радиоактивный ^{3}Н-тимидин и синтезируют ДНК (табл. 2). Через 9 суток культивирования индекс первично меченых ядер (ИПМЯ) составляет 4,8 ± 0,9%. В дальнейшем этот показатель увеличивается через 11 суток культивирования до 8,0 ± 0,5% ($p < 0,05$) и постепенно уменьшается к 15-ым суткам культивирования до 3,2 ± 0,1%. Наибольшее значение ИПМЯ эпителиоцитов определяется в *период пролиферации и диференцировки* на 11-е сутки культивирования (табл. 2).

На протяжении 13 суток культивирования в клетках эпителиальных трубок и выводных протоков поджелудочной железы обнаруживаются митозы. Митотический индекс (МИ) через 9 суток культивирования составляет 1,9 ± 0,4‰; наибольшее его значение также отмечается

через 11 суток культивирования — 3,3 ± 0.7‰ (табл. 2). Через 15 суток культивирования митозы в эпителиоцитах трубок и выводных протоков не обнаруживаются. На протяжении всего *периода пролиферации и дифференцировки* активно включают радиоактивный тимидин и делятся фибробласты стромы.

Через 12 суток культивирования местами на периферии эксплантатов можно видеть первые признаки перестройки эпителиальных трубок в ацинусы, то есть начало вторичной дифференцировки секреторного экзокринного эпителия. В цитоплазме эпителиоцитов трубок увеличивается количество органоидов. Клетки приобретают полярное строение. В базальной части таких клеток появляются канальцы шероховатой эндоплазматической сети, увеличивается количество свободных и связанных рибосом. Появляются большие вакуоли комплекса Гольджи. Ядра клеток имеют обычное строение, содержат одно или два крупных ядрышка. В апикальной части клеток образуются одиночные гранулы прозимогена. Вторичная дифференцировка происходит вначале лишь в отдельных клетках, входящих в состав эпителиальных трубок. Через 13 суток культивирования в апикальных частях цитоплазмы отдельных эпителиоцитов выявляются гранулы зимогена. К этому времени большая часть эпителиоцитов трубок претерпевает секреторную дифференцировку и находится на различных стадиях этого процесса, который в конечном итоге приводит к образованию секреторных структур — ацинусов.

Вблизи эпителиальных трубок через 12 суток культивирования отмечаются скопления эндокринных клеток. Цитоплазма В-клеток характеризуется хорошо развитой шероховатой эндоплазматической сетью. Она образована короткими канальцами и небольшими вакуолями. Элементы эндоплазматической сети рассеяны равномерно по всей цитоплазме. Имеется также значительное число свободных рибосом, расположенных поодиночке или в виде полисом. В клетках выявляются многочисленные секреторные гранулы различной степени зрелости. Отмечается гипертрофия и гиперплазия комплекса Гольджи, представленного большим числом цистерн, крупных и мелких вакуолей, в которых происходит интенсивное формирование и созревание гранул секрета. Тесный контакт гранул с плазмалеммой свидетельствует об активном выведении секрета. Отмечается появление В-клеток в составе эпителиальных трубок. В некоторых В-клетках встречаются митозы.

Через 15 суток культивирования в клетках вторично дифференцированных ацинусов появляются признаки дистрофических и некротических изменений (вакуолизация цитоплазмы, пикноз ядер). А через 17 суток в эксплантатах появляются одиночные периферические

некрозы, что указывает на начало *периода дегенерации*. В участках некроза в большом количестве встречаются лейкоциты, лимфоциты, макрофаги. Цитоплазма последних часто имеет «пенистый» вид, что говорит о высокой активности фагоцитоза. Менее подвержены дистрофическим изменениям малодифференцированные клетки эпителиальных трубок и выводных протоков. В их цитоплазме наблюдается незначительное расширение канальцев шероховатой эндоплазматической сети, набухание митохондрий. Большинство эпителиоцитов содержит умеренное количество элементов эндоплазматической сети, рибосом и митохондрий.

На периферии эксплантатов через 15 суток культивирования отмечается интенсивное разрастание эндокринной паренхимы. Наблюдается слияние отдельных островков в большие массы эндокринной ткани. В цитоплазме В-клеток выявляются многочисленные секреторные гранулы на разных стадиях формирования, накопления и выведения секрета. Встречаются также клетки, одновременно содержащие в цитоплазме гранулы зимогена и эндокринные секреторные гранулы, что указывает на процесс ацино-инсулярной трансформации. Можно предположить, что ацино-инсулярная трансформация эпителиоцитов является одним из источников образования инсулоцитов в органных культурах поджелудочной железы.

Через 30 суток культивирования эпителий сохраняется только по самому краю эксплантатов. Он представлен одиночными эпителиальными трубками, находящимися в стадии дегенерации, и отдельными эпителиальными клетками с большим светлым ядром и просветленной цитоплазмой. Основная часть эксплантатов представлена клеточным детритом, макрофагами и стромой, богатой фибробластическими элементами.

Выводы

Таким образом, в органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы происходит структурно-функциональная перестройка ацинусов в эпителиальные трубки, которые сохраняют способность к росту и вторичной дифференцировке. Эпителиальные трубки образуются в органных культурах эмбриональной поджелудочной железы также за счет пролиферации эпителия выводных протоков.

Эпителиоциты выводных протоков и эпителиальных трубок активно делятся и претерпевают процесс вторичной секреторной дифференцировки, результатом которой является образование концевых отделов - ацинусов. В эпителиоцитах вторично дифференцированных ацинусов отмечается образование гранул зимогена, содержащих панкреатические ферменты.

Из инсулоцитов функционально активными во все сроки исследования остаются В-клетки. В них наблюдаются активные процессы гормонообразования и выведения секрета.

Можно считать, что образование инсулоцитов в органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы происходит в результате следующих процессов: 1) дифференцировки отдельных эпителиоцитов в составе эпителиальных трубок; 2) пролиферации эндокринных клеток; 3) ацино-инсулярной трансформации эпителия.

Список литературы

1. **Andersson A., Christensen N., Groth C.C.,Hellerstrom C, Petersson B., Sandler S**. Survival of human fetal pancreatic explants in organ culture as reflected in insulin secretion and oxygen consumption. Transplantation. 1984, 37, 5: 499-503.
2. **Bolton W.E.,Terrell S.P., Andrews K. L., Boyd J. J**. Preparation of primary monolayer cultures of mouse pancreatic epithelial cells. J.Tissue Cult.Meth.1982, 7, 1: 39-42.
3. **Mandel T.E., Carter W.M., Kaelmanda M.** Organ culture of human fetal pancreas for transplantation. Transplant.Proc. 1984,16, 4: 1040-1042
4. **Yao Zhong-Xiang, Qin Mao-Lin, Liu Jian-Jun, Chen Xing-Shu, Zhou De-Shan**. In vitro cultivation of human fetal pancreatic ductal stem cells and their differentiation into insulin-producing cells World. J. Gastroenterol., 2004, 10, 10: 1452-1456.
5. **Лурия Е.А.** Кроветворная и лимфоидная ткань в культурах. М.: Медицина, 1972, 176 с.
6. **Bals R., Gamarra F., Kaps A., Grundler S., Huber R.M., Welsch U.** Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system. Cell and Tissue Res. 1998, 293, 3: 573-577.
7. **Луговой С.В., Бондаренко Т.П., Губина Н.Ф., Олефиренко А.И., Олефиренко А.А.** Органная культура щитовидной железы новорожденных поросят как объект криоконсервирования. Пробл. криобиол., 2003, 2: 98-103.
8. **Чалисова Н.И., Хавинсон В.Х., Давыденко В.В., Доровский А.А., Вербовая Т.А., Пенниайнен В.А.** Влияние цитомединов на развитие органотипической культуры различных тканей внутренних органов крысы. Цитология, 2000, 42, 12: 1144-1147.
9. **Лопатина Е.В., Пенниайнен В.А., Зайка А.А.** Исследование участия Na/K-АТФазы в регуляции роста эксплантатов ткани сердца в органотипической культуре. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2005, 140, 8: 150-152.
10. **Takahashi Ikuko, Sashima Susumu, Nakazawa Kiyoshi**. Homparative analysis of proteoglycans synthesized by chick corneal stromal cells in cell culture and organ culture. Biol. and Pharm. Bull. 2001, 24, 1: 27-33.
11. **Чалисова Н.И., Пенниайнен В.А., Харитонова Н.В., Ноздрачев А.Д.** Динамика стимулирующих и ингибирующих эффектов в органотипической культуре нервной и лимфоидной ткани. Докл. РАН. 2001, 380, 3: 418-421.
12. **Чалисова Н.И., Пенниайнен В.А.** Модулирующее действие аминокислот на развитие тканей в органотипической культуре. Рос. физиол. журнал. 2004, 90, 6: 801-810.
13. **Stoll Stefan W., Kansra Sanjay, Elder James T**. Metalloproteinases stimulate ErbB-dependent ERK signaling in human skin organ culture. J. Biol. Chem. 2002, 277, 30: 26839-26845.
14. **Катинас Г.С., Булгак В.И., Никифорова Е.Н., Светикова К.М.** О нахождении стандартной ошибки средней с учетом индивидуальной изменчивости признака в пределах организма. Арх. анат., гистол., эмбриол.1969, 57, 9: 97-104.

ПРОГРЕССИЯ КАРИОТИПА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ЧЕЛОВЕКА

Т.К. Яковлева, Н.М. Ярцева, В.И. Турилова

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

Клеточные линии опухолевого происхождения широко используются в разных областях биологии и медицины, в основном, в качестве моделей для изучения различных аспектов онкогенеза. В процессе культивирования клеточных линий происходят изменения кариотипа клеток, которые могут приводить к изменению их тканеспецифических и опухолеспецифических свойств. Роль тканеспецифических механизмов онкогенеза в кариотипической изменчивости опухолевых клеток в культуре остается малоизученной. Цель работы состояла в изучении характера кариотипической изменчивости клеточных линий острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) с опухолеспецифической перестройкой в кариотипе – делецией длинного плеча хромосомы 5, del(5q).

Анализ кариотипов клеточных линий GF-D8, UoC-M1, HL-60, KG-1, KG-1a и SAML-2 был выполнен по данным литературы. Показано, что в прогрессии кариотипа клеточных линий ОМЛ основную роль играет структурная кариотипическая изменчивость. В клеточных линиях выявлены характерные для ОМЛ in vivo структурные перестройки хромосом 5, 7, 8, 11 и 17. Вовлечение нормальных хромосом в новые реаранжировки при прогрессии кариотипа клеток в условиях in vitro также имеет опухолеспецифический характер. Отмечен особый характер структурных перестроек, приводящих к увеличению дозы генов *MYC* и *MLL*: экстракопирование фрагментов хромосом, содержащих опухолеспецифические реаранжировки хромосомного материала. Преимущественное вовлечение определенных хромосом в структурные перестройки и специфический характер этих перестроек обеспечивают поддержание и углубление хромосомного дисбаланса в клеточных линиях ОМЛ с del(5q) в кариотипе при длительном культивировании.

В целом полученные данные свидетельствуют о сходном характере кариотипической изменчивости клеточных линий ОМЛ с del(5q) в процессе длительного культивирования. Показано, что использованный подход – анализ группы клеточных линий с определенной опухолеспецифической перестройкой в кариотипе – позволяет исследовать направленность и особенности кариотипической изменчивости опухолевых клеток в культуре.

Ключевые слова: острый миелобластный лейкоз, клеточные линии GF-D8, UoC-M1, HL-60, KG-1, KG-1a, SAML-2, делеция 5q, кариотипическая изменчивость.

Постоянные клеточные линии опухолевого происхождения повсеместно используются в самых разных областях биологии и медицины, в первую очередь, в качестве моделей для выявления и изучения генов, вовлеченных в онкогенез, их продуктов, механизмов злокачественной трансформации клеток, а также оценки эффективности противоопухолевых препаратов. Столь широкое применение постоянных клеточных линий обусловливает необходимость изучения закономерностей, определяющих динамику свойств культивируемых клеток как самостоятельных биологических систем.

Клеточные линии опухолевого происхождения характеризуются изменением структуры кариотипа (1), сохранением опухолеспецифических перестроек хромосом (2) и разной кариотипической структурой клеточной популяции (3). В условиях существования опухолевых клеток in vitro происходит дальнейшее изменение их кариотипа, что может приводить к изменению целого комплекса как тканеспецифических, так и опухолеспецифических свойств клеточных линий. Поэтому исследование направленности и особенностей кариотипической изменчивости клеточных линий, полученных из опухолей разных типов, становится чрезвычайно актуальным. В настоящее время хорошо исследована кариотипическая изменчивость клеточных линий в разных условиях культивирования клеток (4). Показано, что характер кариотипической изменчивости клеток под влиянием факторов культивирования зависит от структуры кариотипа клеточной линии (5). Роль тканеспецифических механизмов онкогенеза в кариотипической изменчивости опухолевых клеток в культуре остается практически не изученной.

Наиболее детально связь механизмов дифференцировки и опухолевой трансформации клеток in vivo исследована для новообразований гемопоэтической системы человека и положена в основу классификации гемобластозов (Франко-американо-британская (FAB) классификация). Клетки миелоидного и лимфоидного ряда могут вовлекаться в злокачественную трансформацию на разных этапах дифференцировки и созревания. Обнаружены специфические численные и структурные изменения хромосом, в основном, делеции и онкогенные транслокации, которые маркируют отдельные типы лейкозов и лимфом человека (6).

Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) – гетерогенная группа заболеваний, при которых в процесс трансформации вовлекаются клетки миелоидного ряда. Отдельные субтипы ОМЛ выделяют согласно стадии дифференцировки, на которой клетки миелоидного ряда вовлекаются в процесс злокачественной трансформации. В соответствии с FAB классификацией (7) это субтипы M0 – M7.

Одной из самых распространенных перестроек хромосом при ОМЛ является делеция длинного плеча хромосомы 5 – del(5q) (6). Делеция 5q как единственная аномалия кариотипа клеток встречается как при миелодиспластических синдромах – заболеваниях, нередко предшествующих ОМЛ, так и на начальной стадии развития ОМЛ, что позволяет рассматривать del(5q) как раннее событие в патогенезе ОМЛ (6). Делециям могут подвергаться разные по протяженности участки длинного плеча хромосомы 5 от полной потери 5q до отдельных сегментов, что приводит к гемизиготному статусу генов, локализованных в утраченных районах хромосомы 5. Известно, что наиболее часто делеции затрагивают сегмент 5q31, где локализованы критические для гемопоэза гены *CSF1R (*colony-stimulating factor 1 receptor)*, GMCSF* (granulocyte macrophage colony stimulating factor) и *IL3* (interleukin 3). Предполагается, что патогенетически значимой для ОМЛ может быть и гемизиготность генов *EGR1* (transcription factor early growth response 1), *RPS14* (ribosomal protein S14)*, CTNNA1* (cytoskeletal remodeling protein, catenin alpha 1) (6).

Показано, что ранние события онкогенеза ОМЛ определяют дальнейшие изменения генома клеток и прогрессию опухолей in vivo (6, 8). Однако, влияние онкогенетических механизмов ОМЛ на кариотипическую изменчивость лейкозных клеток in vitro остается неясным.

Целью настоящей работы являлось изучение характера кариотипической изменчивости клеточных линий ОМЛ с del(5q) в кариотипе.

Анализ кариотипов клеточных линий GF-D8, UoC-M1, HL-60, KG-1, KG-1a и SAML-2, изученных с помощью методов классической и молекулярной цитогенетики, был выполнен по данным литературы (табл.1). Авторы публикаций применяли методы дифференциального окрашивания хромосом (GTG), флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) с использованием локус-специфических и хромосом-специфических проб на все хромосомы кариотипа (M-FISH), спектрального кариотипирования (SKY) и сравнительной геномной гибридизации на метафазных хромосомах (CGH).

Таблица 1. Клеточные линии ОМЛ с del(5q) в кариотипе.

Название клеточной линии	Тип ОМЛ FAB	Линия получена	Методы и авторы анализа	Кариотип *	Доза генов *MYC* и *MLL*	Наличие линии в клеточных коллекциях
GF-D8	M1	1990	GTG, M-FISH, FISH, CGH (9*)	**47**,X,der(Y)t(Y;12)(q12;p13)del(Y)(q12),der(5;15)t(5;7)(q11;q33)t(7;15)(q33;q13), inv(7)(q31.2q36)**x2**,der(7)t(7;15)(q22;q22.3)del(7)(q22q33)del(15)(q13q22.3), dup(8)(q22.3q24),+der(8)trp(8)(q22.3q24)ins(8;11)(q24;q23.1qter) dup(11)(q23.1q23.3),der(11)t(8;11)(q22.3;q23.3)trp(8)(q22.3q24) dup(11)(q23.1q23.3),der(11)t(11;17)(p11.12;q11.12), der(12)t(7;12)(q33;p11.2)del(12)(p11.2p13),**+13**,−15, −17	Амплификация *MYC* Амплификация *MLL*	DSMZ
UoC-M1	M1	1993	GTG, FISH, SKY (10, 11*)	42-44,X,-Y,der(9)t(Y;9)(q1?2;p22)t(9;19)(q1?2;p12 or q12),del(5)(q1?2q3?4), der(5)t(5;9)(p1?5;q1?3),−7,−9,dic(11)t(9;11;19)(9qter→9q21::11?p11→11?q11: :9::11?p11→11?q11::9::19::11q?12→11?q24::11q2?2→11qter), der(14;21)(q10;q10)del(14)(q1?3),−16,der(17)t(7;17)(p14;p12),−19, del(19)(p1?1q1?2),+21,der(21)t(11;21)(q22;q22)dup(21)(q11q22), +der(21)t(16;21)(p11;p11),der(22)t(19;22)(p12 or q12;p1?1)	4 копии *MLL*	DSMZ
HL-60	M2	1977	GTG, M-FISH, SKY, FISH, CGH (1, 12, 13*)	**46,**X,−X,−5**,**dic(5;17)(q11~12;p11)**ins(17;8)(q2?2;q23q24)amp(8)(q23q24)**, **der(7)t(5;7;16)(7q31~32::5q11→5q12::16q24),der(8)t(8;17)(p2?3;p11)**, der(9)del(9)(p11)t(9;14)(q3?1;q2?4),**der(11)t(11;15)(p11~12;q21)**, **der(13)t(13;13)(p10;q14)**,der(14)t(9;14)(q3?1;q24),**der(15)t(13;15)(q22;q?21)**, der(16)t(5;16)(q31;q12~13),der(16)t(7;16)(q31~32;q2?2),−17,+18, **+18**	Амплификация *MYC*	ATCC DSMZ РККК
KG-1	M2	1978	GTG, FISH, SKY (14*)	46,XY,der(4)t(4;8)(q31;p21),−5,del(7)(q22q35),der(8)t(8;12)(p11;q13), +idic(8)(p11)x2,−12, der(17)(5pter→5p11::5q13→5q31::17p11.2→cen→17qter), der(20)t(12;20)(?;p13)	Амплификация *MYC*	ATCC DSMZ РККК
KG-1a (дериват KG-1)		1979	GTG, FISH, SKY (14*)	46,XY,der(4)t(4;8)(q31;p21),−5,del(7)(q22q35), der(8;**22**)(12qter→12q13::8p11→cen→**8q24::22q13**→**cen**→**22pter**), +idic(8)(p11),+**idic(11)(q10)**,−12, der(17)(5pter→5p11::5q13→5q31::17p11.2→cen→17qter), +**der(19)t(14;19)(q13;q13.4)**,der(20)t(12;20)(?;p13)	4 копии *MYC* 4 копии *MLL*	ATCC DSMZ
SAML-2	The-rapy rela-ted	1996	GTG, SKY, FISH, CGH (15*)	45,X,der(Y;15)(q10;q10),del(5)(q13q31),der(8)(8pter→8qter::11q21→11qter: :8q13→8qter::11q21→11qter::11q?23→11q?24),dup(10)(?p15p10),+11, der(11)(11pter→11q21::8q22.1→8q24.1::11q22→11qter)x2, der(12)t(12;13)(p13.3;q14)ins(12;5)(p13.3;q31q31),−13	Амплификация *MYC* Амплификация *MLL*	National Institute of Health, США

Примечание: * – кариотипы приведены в авторской интерпретации, отмечены авторы представленных кариотипов клеточных линий. Жирным шрифтом выделены численные и структурные изменения хромосом в процессе культивирования клеток. Подчеркиванием выделены структурно перестроенные хромосомы с экстракопированием фрагментов, содержащих опухолеспецифические реаранжировки хромосомного материала.

Таблица 2. Вовлечение хромосом в структурные перестройки в клеточных линиях ОМЛ с del(5q) в кариотипе.

Клеточная линия	Хромосомы																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
GF-D8					+		++ **+inv(7)**	++			++	++	**+13**		++		+							+
UoC-M1					++		++		++		+			+		+	+		++		+	+		+
HL-60 (DSMZ)					+ *		+ *	+ *	+		**+**		**++**	+	**+**	++ *	+ *	**+18**						
KG-1				+	+		+	+				+					+			+				
KG-1a				+	+		+	+ * **−idic(8)**			**+** **+idic(11)**	+		**+**			+		**+** **+der(19)**	+		**+**		
SAML-2					+			+		+	+	+	+		+									+

Примечание: + – один гомолог хромосомы вовлечен в структурные перестройки; ++ – оба гомолога хромосомы вовлечены в структурные перестройки; * – структурно перестроенная хромосома вовлекается в дальнейшие преобразования in vitro. Жирным шрифтом выделены численные и структурные изменения хромосом в процессе культивирования клеток; на сером фоне – численные изменения хромосом в процессе культивирования клеток.

Сведения о клеточных линиях и их кариотипах приведены в таблице. 1. Клеточные линии GF-D8 (16) и UoC-M1 (11) получены от больных ОМЛ М1 (ОМЛ без признаков созревания). Клеточные линии HL-60 (17) и KG-1 (18) получены от больных ОМЛ М2 (ОМЛ с признаками созревания). Клеточную линию KG-1a (дериват клеточной линии KG-1), полученную в результате клонирования клеток родительской линии KG-1 в 0.3% агаре (19), можно рассматривать как пример кариотипической изменчивости клеток KG-1 при жестком изменении условий культивирования.

Клетки HL-60 отличаются длительным существованием в условиях in vitro (17) и наиболее широко используются в экспериментальных исследованиях. Клеточная линия SAML-2 (15) получена из клеток ОМЛ, индуцированного радио- и химиотерапией у пациента с лимфомой Ходжкина (therapy related, t-ОМЛ).

Характерной чертой **количественной кариотипической изменчивости** клеточных линий ОМЛ с del(5q) является сохранение околодиплоидного статуса клеток в течение многих лет культивирования (табл.1). Так, в клеточных линиях KG-1 и KG-1a число хромосом в кариотипе оставалось диплоидным, несмотря на появление новых структурных перестроек в клетках KG-1a. При этом в кариотипе клеточной линии KG-1a, в отличие от родительской линии KG-1, отмечено, с одной стороны, утрата одной из двух копий изохромосомы 8 по длинному плечу, idic(8q), с другой – появление структурно перестроенной хромосомы 11 – изохромосомы 11 по длинному плечу, idic(11q). Кроме того, в кариотипе клеток KG-1a помимо двух гомологов хромосомы 19 появилась дополнительная аномальная хромосома der(19), а один из гомологов хромосомы 22 вовлекался в структурную перестройку с образованием дицентрической хромосомы der(8;22). В кариотипе клеточных линий HL-60 и GF-D8 наблюдали увеличение числа хромосом до 46-ти и 47-ми, соответственно; на ранних этапах культивирования число хромосом в этих клетках было ниже диплоидного и составляло 45. В процессе культивирования в клетках HL-60 обнаружено появление дополнительной копии хромосомы 18, а в клетках GF-D8 - экстракопирование хромосомы 13 и структурно перестроенной хромосомы 7. Клетки UoC-M1 и SAML-2 сохраняли гиподиплоидный кариотип.

Анализ **структурной кариотипической изменчивости** клеточных линий ОМЛ с del(5q) позволил выявить ряд особенностей прогрессии кариотипа клеток в процессе культивирования, а именно, вовлечение в структурные перестройки определенных хромосом кариотипа и специфический характер этих перестроек, что обеспечивает поддержание и углубление хромосомного дисбаланса в клетках (табл. 1, 2, рис.).

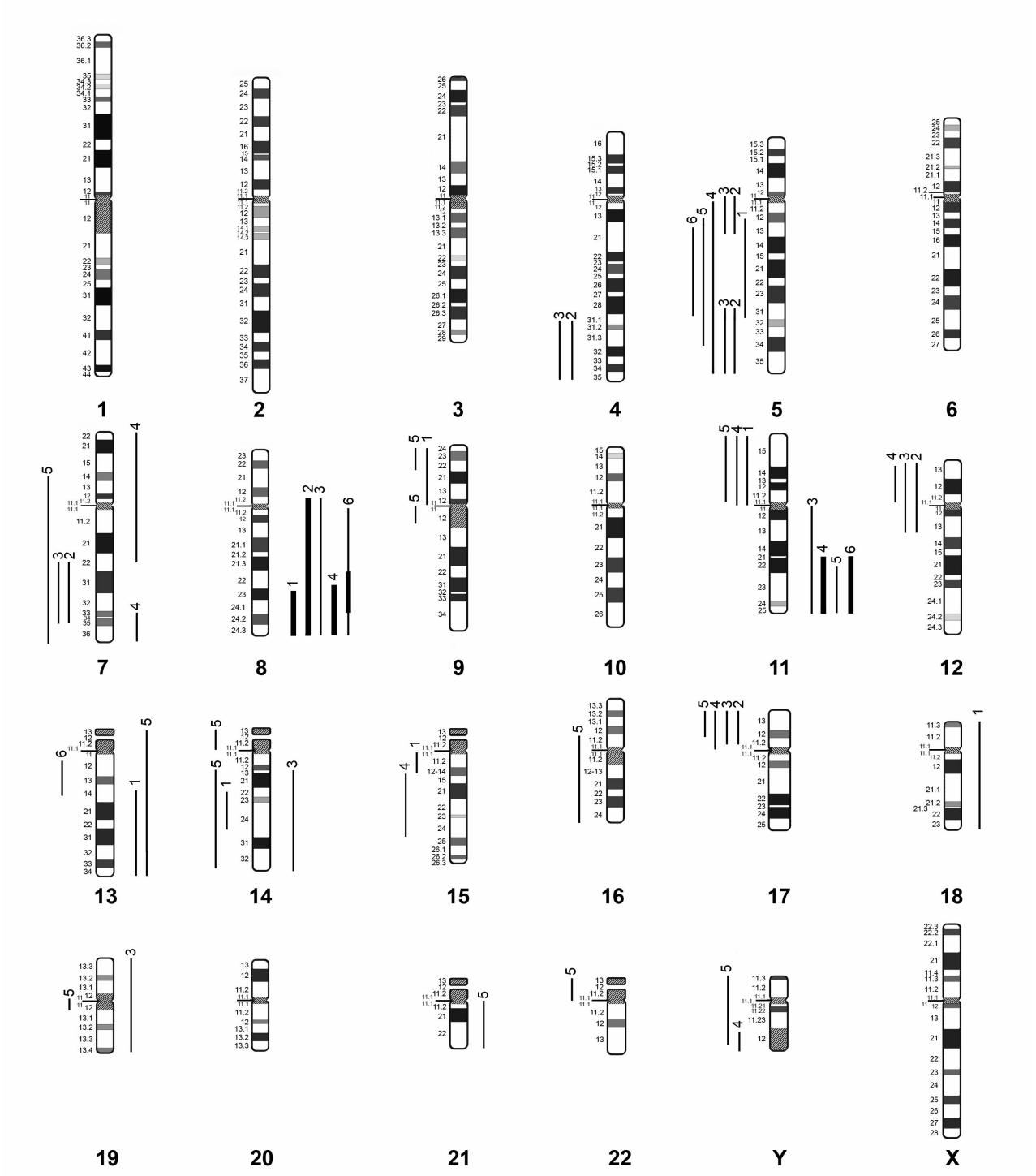


Рисунок. Хромосомный дисбаланс в клеточных линиях ОМЛ человека с del(5q) в кариотипе. Экстракопирование (справа) и потеря (слева от идиограмм хромосом) материала отдельных хромосом по сравнению с диплоидным уровнем.

1 – HL-60, данные CGH (13). 2 – KG-1, реконструкция по описанию кариотипа клеточной линии (14). 3 – KG-1a, реконструкция по описанию кариотипа клеточной линии (14). 4 – GF-D8, данные CGH (9). 5 – UoC-M1, реконструкция по описанию кариотипа клеточной линии (11). 6 – SAML-2, данные CGH (15).

Амплификация отдельных сегментов хромосом 8 и 11 обозначена жирными блоками.

В клеточных линиях ОМЛ делеции длинного плеча хромосомы 5 охватывали разные и большие по протяженности районы 5q – от полной потери 5q (GF-D8) до потери района 5q12-13 – 5q31 (HL-60 и SAML-2). Общим для всех клеточных линий районом делеции являлся район 5q31 (рис.). Делеция 5q в неизмененном виде сохранялась только в клеточных линиях UoC-M1 и SAML-2, в остальных клеточных линиях делетированная хромосома 5 вовлекалась в транслокации с хромосомами 7 (GF-D8, HL-60), 16 (HL-60) и 17 (HL-60, KG-1, KG-1a).

Известно, что изменения кариотипа клеток с делецией 5q при прогрессии ОМЛ in vivo часто сопровождаются перестройками других хромосом, в частности, появлением в кариотипе дополнительной копии хромосомы 8, утратой хромосомы 7 или делециями ее длинного плеча, а также делецией короткого плеча хромосомы 17 (20). Подобная избирательность вовлечения хромосом в структурные перестройки обнаруживается и в клеточных линиях ОМЛ с del(5q) в кариотипе.

На основании цитогенетического анализа клеточной линии HL-60, выполненного разными исследователями (1, 12, 13, 21, 22), можно обозначить определенные тенденции в изменении кариотипа клеток HL-60 при длительном культивировании: вовлечение в структурные перестройки уже измененных хромосом и тех хромосом кариотипа, аномалии которых отмечены в клетках других линий ОМЛ с del(5q). Неслучайный характер вовлечения хромосом в перестройки был ранее обнаружен при изучении динамики структуры кариотипа клеточных линий множественной миеломы в процессе культивирования: вовлечение в перестройки уже измененных хромосом и тех нормальных хромосом, один из гомологов которых участвовал в перестройках в клетках in vivo или на ранних этапах культивирования клеток (23).

В клеточной линии HL-60 дальнейшим преобразованиям подвергались структурно перестроенные хромосомы dic(5;17), der(7) и der(8), а в новые перестройки вовлекались хромосомы 11, 13 и 15 (табл. 2). Структурная перестройка хромосомы 11 сопровождалась потерей материала короткого плеча и возникновением дисбаланса по 11p, характерного для клеточных линий GF-D8 и UoC-M1. Реаранжировки хромосомы 13 в клетках HL-60 привели к увеличению количества хромосомного материала длинного плеча 13q14 – qter. Появление дополнительной копии хромосомы 13 также отмечено в клетках GF-D8 в процессе культивирования.

Особенностью прогрессии генома опухолевых клеток ОМЛ in vivo является амплификация генов *MYC и MLL* (mixed lineage leukemia). Экстрахромосомная амплификация гена *MYC* в виде двойных мини-хромосом (dmin) была обнаружена в опухолевых клетках больной ОМЛ и

в клетках линии HL-60, полученной из периферической крови этой больной (21). При анализе кариотипа клеток HL-60 (табл.1) из DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) двойные мини-хромосомы не были выявлены, а амплифицированный фрагмент хромосомы 8, содержащий ген *MYC*, был обнаружен в длинном плече хромосомы 17 в составе структурно перестроенной хромосомы dic(5;17) (табл. 1). В клетках HL-60 из ATCC (American Type Culture Collection) амплификация гена *MYC* была выявлена в сайте его локализации на хромосоме 8 (8q24.1) и в виде инсерции амплифицированного *MYC*-содержащего фрагмента хромосомы 8 в длинное плечо хромосомы 11 (12). По-видимому, фрагмент хромосомы 8, содержащий ген *MYC,* ведет себя подобно «прыгающим» сегментам, которые перемещаются на различные хромосомы с последующей дупликацией как самого сегмента, так и материала хромосомы-реципиента (24). Следствием таких перестроек является увеличение дозы генов и дестабилизация как структурно перестроенных, так и интактных хромосом кариотипа.

В клеточных линиях KG-1 и KG-1a также можно выделить структурные перестройки хромосом 5, 7, 8 и 17. Кроме того, в клетках KG-1 и KG-1a обнаружены реаранжировки хромосом 4, 12 и 20. Интересно, что в клеточной линии KG-1a, которая является результатом эволюции кариотипа клеток KG-1 под влиянием жестких условий культивирования, наблюдалась та же тенденция в характере вовлечения хромосом в структурные перестройки in vitro, что и при длительном культивировании клеток в оптимальных условиях (клетки HL-60). В клетках KG-1a изменениям подвергались структурно перестроенная хромосома der(8) и хромосомы 11, 14, 19 и 22, участвующие в перестройках в других клеточных линиях ОМЛ с del(5q). Такое неслучайное вовлечение хромосом в структурные перестройки может свидетельствовать о влиянии ранних онкогенетических событий, определивших структуру кариотипа опухолевых клеток in vivo, на характер кариотипической изменчивости этих же клеток in vitro.

Изменение соотношения материала хромосом 8 и 11 в клетках KG-1a по сравнению с клетками KG-1 демонстрирует связь между численными и структурными перестройками хромосом определенных пар. Если в клетках линии KG-1 было 6 копий длинного плеча хромосомы 8 (8q) и две хромосомы 11, то в клетках линии KG-1a число копий 8q уменьшилось до 4-х в результате утраты одной из двух хромосом idic(8q), а число копий длинного плеча хромосомы 11 (11q) увеличилось до 4-х в результате структурной перестройки хромосомы 11 (табл.1, 2, рис.). Экстракопирование района 11q22-23–qter показано в низкодифференцированных клеточных линиях, полученных из опухолевого материала

больных ОМЛ М1 (GF-D8 и UoC-M1), а также в линии SAML-2 (t-ОМЛ). Следует отметить, что изменение кариотипа клеток линии KG-1 при культивировании в 0.3% агаре сопровождалось снижением уровня дифференцировки клеток и изменением других характеристик, выявленном при сравнении клеток KG-1a с родительской линией KG-1 (19).

В клеточных линиях GF-D8, UoC-M1 и SAML-2, помимо хромосомы 5, наблюдали преимущественное вовлечение в структурные перестройки хромосом: 7 (GF-D8, UoC-M1), 8 (GF-D8, SAML-2), 11(GF-D8, UoC-M1 и SAML-2) и 17 (GF-D8, UoC-M1). В клетках SAML-2 не выявлена структурная перестройка хромосомы 17, однако известно, что в этих клетках один из аллей гена *TP53,* локализованный в 17p13, делетирован, а во втором обнаружена инактивирующая мутация (15). Кроме того, в клеточных линиях GF-D8 и SAML-2 отмечены структурные перестройки хромосомы 12 (как и в клетках KG-1 и KG-1a) и хромосомы 15 (как и в клетках HL-60).

Характерной особенностью структурных перестроек хромосом 8 и 11 в клеточных линиях GF-D8, UoC-M1 и SAML-2 является экстракопирование фрагментов, содержащих опухолеспецифические реаранжировки хромосомного материала (табл. 1). Вовлечение в такие перестройки хромосомы 11 приводит к увеличению дозы гена *MLL* (UoC-M1), а в случае транслокации между хромосомами 8 и 11 – к увеличению числа копий двух генов, *MYC* и *MLL* (GF-D8, SAML-2). Скорее всего, экстракопирование перестроенных хромосомных фрагментов в составе хромосом der(8) и der(11) происходит in vitro и способствует усилению хромосомного дисбаланса по дистальным районам длинных плеч хромосом 8 и 11. Подобный характер хромосомных преобразований описан в клетках линии хронического миелоидного лейкоза человека К562 при длительном культивировании. Опухолеспецифическая перестройка в виде Филадельфийской хромосомы Ph^1 – der(22)t(9;22)(q34;q11) была обнаружена в клетках больного и в кариотипе клеточной линии К562 на ранних этапах культивирования. В процессе культивирования клеток К562 наблюдали экстракопирование реаранжированного фрагмента хромосом 9 и 22, содержащего гибридный ген *BCR/ABL1*, в составе хромосомы der(22)t(9;13;22)(q34;q31;q11) (25).

Таким образом, анализ группы клеточных линий GF-D8, UoC-M1, HL-60, KG-1, KG-1a и SAML-2, полученных из разных типов ОМЛ, с разной продолжительностью существования клеток в культуре, и имеющих опухолеспецифическую перестройку – del(5q) в кариотипе, выявил сходный характер кариотипической изменчивости клеток в процессе длительного культивирования.

Показано, что в прогрессии кариотипа клеточных линий основную роль играет структурная кариотипическая изменчивость. Преимущественное вовлечение в структурные перестройки характерных для ОМЛ аномальных и интактных хромосом кариотипа, а также специфический характер этих перестроек обеспечивают поддержание и углубление хромосомного дисбаланса в клеточных линиях ОМЛ с del(5q) в кариотипе при длительном культивировании. Углубление хромосомного дисбаланса обусловлено увеличением копийности материала длинных плеч хромосом 8 и 11 и, соответственно, дозы генов *MYC* и *MLL*, что, по-видимому, способствует наращиванию пролиферативного потенциала опухолевых клеток in vitro.

Можно предположить, что, несмотря на опухолеспецифическую направленность прогрессии кариотипа клеток in vitro, комплексные реаранжировки хромосомного материала могут приводить к изменению паттерна экспрессии генов и функционального статуса клеток.

Список литературы

1. **Roschke A.V., Tonon G., Gehlhaus K.S., McTyre N., Bussey K.J., Lababidi S., Scudiero D.A., Weinstein J.N., Kirsch I.R.** Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. Cancer Res., 2003, 63, 24: 8634-8647.
2. **Мамаева С.Е.** Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология, 1996, 38, 8: 787-814.
3. **Полянская Г.Г., Вахтин Ю.Б.** The karyotypic structure of cell populations in vitro as integral system. Цитология, 2003, 45: 115-131.
4. **Полянская Г.Г.** Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях. Успехи совр. биол., 2000, 120: 529-539.
5. **Полянская Г.Г.** Кариотипическая изменчивость в клеточных линиях и структура кариотипа. Клеточные культуры (инф. бюлл.), СПб, 2009, вып. 24: 15-24.
6. Cancer Cytogenetics. Third Edition. Ed.: Heim S., Mitelman F. Wiley-Blackwell, 2009, 756 p.
7. **Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C.** Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann. Intern. Med., 1985, 103: 620-625.
8. **Bullinger L., Döhner K., Bair E., Fröhling S., Schlenk R.F., Tibshirani R., Döhner H., Pollack J.R.** Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. N. Engl. J. Med., 2004, 350, 16: 1605-1616.
9. **Tosi S., Giudici G., Rambaldi A., Scherer S.W., Bray-Ward P., Dirscherl L., Biondi A., Kearney L.** Characterization of the human myeloid leukemia-derived cell line GF-D8 by multiplex fluorescence in situ hybridization, subtelomeric probes, and comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer, 1999, 24, 3: 213-221.
10. **Veldman T., Vignon C., Schröck E., Rowley J.D., Ried T.** Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. Nat. Genet., 1997, 15, 4: 406-410.
11. **Allen R.J., Smith S.D., Moldwin R.L., Lu M.-M., Giordano L., Vignon C., Suto Y., Harden A., Tomek R., Veldman T., Ried T., Larson R.A., Le Beau M.M., Rowley J.D., Zeleznik-Le N.**

Establishment and characterization of a megakaryoblast cell line with amplification of MLL. Leukemia, 1998, 12, 7: 1119-1127.

12. **Liang J.C., Ning Y., Wang R.Y., Padilla-Nash H.M., Schröck E., Soenksen D., Nagarajan L. Ried T.** Spectral karyotypic study of the HL-60 cell line: detection of complex rearrangementsinvolving chromosomes 5, 7, and 16 and delineation of critical region of deletion on 5q31.1. Cancer Genet. Cytogenet., 1999, 113, 2: 105-109.

13. **Cottier M., Tchirkov A., Perissel B., Giollant M., Campos L., Vago P.** Cytogenetic characterization of seven human cancer cell lines by combining G- and R-banding, M-FISH, CGH and chromosome- and locus-specific FISH. Int. J. Mol. Med., 2004, 14, 4: 483-495.

14. **Mrózek K., Tanner S.M., Heinonen K., Bloomfield C.D.** Molecular cytogenetic characterization of the KG-1 and KG-1a acute myeloid leukemia cell lines by use of spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization. Genes Chromosomes Cancer, 2003, 38, 3: 249-252.

15. **Knutsen T., Pack S., Petropavlovskaja M., Padilla-Nash H., Knight C., Mickley L.A., Ried T., Elwood P.C., Roberts S.J.** Cytogenetic, spectral karyotyping, fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization characterization of two new secondary leukemia cell lines with 5q deletions, and MYC and MLL amplification. Genes Chromosomes Cancer, 2003, 37, 3: 270-281.

16. **Rambaldi A., Bettoni S., Tosi S., Giudici G., Schirò R., Borleri G.M., Abbate M., ChiaffarinoF., Colotta F., Barbui T., Biondi A.** Establishment and characterization of a new granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent and interleukin-3-dependent human acute myeloid leukemia cell line (GF-D8). Blood, 1993, 81, 5: 1376-1383.

17. **Collins S.J., Gallo R.C., Gallagher R.E.** Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. Nature, 1977, 270: 347-349.

18. **Koeffler H.P., Golde D.W.** Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. Science, 1978, 200: 1153-1154.

19. **Koeffler H.P., Billing R., Lusis A.J., Sparkes R., Golde D.W.** An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). Blood, 1980, 56, 2: 265-73.

20. **Mrózek K.** Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. Semin. Oncol., 2008, 35, 4: 365-377.

21. **Gallagher R., Collins S., Trujillo J., McCredie K., Ahearn M., Tsai S., Metzgar R., Aulakh G., Ting R., Ruscetti F., Gallo R.** Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. Blood, 1979, 54, 3: 713-733.

22. **Мамаева С.Е.** Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М., Научный мир, 2002, 236 с.

23. **Турилова В. И.** Динамика структуры кариотипа клеточных линий множественной миеломы человека в условиях их длительного существования in vitro. Вестник Казахского Национального Университета имени аль-Фараби, Серия биологическая, 2010, 1(43): 70-74.

24. **Sawyer J.R., Tricot G., Lukacs J.L., Binz R.L., Tian E., Barlogie B., Shaughnessy J. Jr.** Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q. Genes Chromosomes Cancer, 2005, 42, 1: 95-106.

25. **Gribble S.M., Roberts I., Grace C., Andrews K.M., Green A.R., Nacheva E.P.** Cytogenetics of the chronic myeloid leukemia-derived cell line K562: karyotype clarification by multicolor fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and locus-specific fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet. Cytogenet., 2000,118, 1: 1-8.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И КРИОКОНСЕРВАЦИИ ПАРАЗИТИЧЕСКОГО ПРОСТЕЙШЕГО TRICHOMONAS VAGINALIS ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ

Л.Ф.Литвинчук [1], Н.В.Раздольская [2], М.В. Потапчук [1], О.В.Гаврилова [2], А.М.Иванов [2]

[1]ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития России, [2] Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, office@influenza.spb.ru

В настоящем исследовании дана краткая характеристика простейшего Trichomonas vaginalis (T.V.), важнейшего патогена человека, входящего в структуру инфекций, передающихся половым путем. Как следует из данных литературы, методы длительного сохранения организмов такого типа несовершенны и ограничены в сроках хранения. По существу, отсутствуют современные технологии для долгосрочной консервации подобных объектов в условиях глубокого замораживания. В задачи настоящей работы входило получение модели «паразит-хозяин» in vitro для последующего накопления достаточного количества жизнеспособных и активных простейших и, на основе техники криоконсервации клеточных культур, проведение глубокого замораживания накопленной популяции трихомонад. Было подготовлено и криоконсервировано 6 штаммов T.V., полученных от больных трихомониазом. При консервации в жидком азоте в течение 2-х лет все штаммы сохранили подвижность, характерную морфологию и способность инициировать инфекционный процесс на клеточных культурах.

Ключевые слова: культивирование Trichomonas vaginalis, криоконсервация, криопротекторы, глубокое замораживание простейших, криобанки.

В последние годы сформировался устойчивый интерес к долгосрочному сохранению микроорганизмов как к компоненту биологического разнообразия. Микроорганизмы не менее значимы и как патогены человеческой популяции. Криобанки инфекционных возбудителей человека – необходимый современный базис для решения многих проблем: научно-медицинских, информационных, практических и экономических. Создание таких криобанков позволит сохранить популяции инфекционных возбудителей человека для перспективных и, что не менее важно, ретроспективных исследований изменчивости их свойств. На

охарактеризованных коллекционных моделях возможно тестирование фармпрепаратов и более углубленное изучение тонких механизмов патогенеза.

В структуре инфекций, передающихся половым путем (ИППП) инфекция, вызываемая паразитическим простейшим Trichomonas vaginalis (T.V.), занимает около 25%. Являясь многоочаговой инвазией, трихомонады способны поразить у мужчин уретру, семенные пузырьки, предстательную железу, мочевой пузырь и лоханки; у женщин – преддверие влагалища, само влагалище, придатки яичников, маточные трубы, матку. До 65% выявляемого трихомониаза носит транзиторный или бессимптомный характер. Инфицирование T.V. урогенитальных путей мужчин и женщин даже в бессимптомной форме приводит к нарушению экологического равновесия микробиоценоза, поддерживающего нормальный гомеостаз организма. Вследствие этого наблюдается снижение колонизационной резистентности слизистых, что способствует формированию новых микробных ассоциаций с патогенными тенденциями. При отсутствии выраженной симптоматики инфекционного заболевания трихомониазом существенно снижается качество жизни пациента. Медицинская проблема дополняется социальным компонентом (1, 2, 3, 4).

Проблема долгосрочного сохранения T.V. возникла перед исследователями сразу после выделения их из природных очагов и установления научно-практической значимости этого возбудителя для человеческой популяции. В ряде работ разных лет криоконсервации подвергались суспензионные (или бульонные) культуры, полученные в результате посева патологического материала на селективные среды. В качестве основной среды для криоконсервации использовали именно такую среду с добавлением самых разнообразных криопротекторов. Применяли глицерин, ДМСО, пропандиол, поливинилпирролидон, пропилен, этиленгликоль и др. Использовались разные режимы замораживания, включая быстрое (150^0/мин) с 20% ДМСО. Концентрации криоконсервируемых простейших находились в пределах 100/мл – 10^6/мл, что явно недостаточно. Низкие концентрации T.V. могут быть следствием некультивируемости их in vitro в бесклеточных системах. Дальнейшее сохранение проводилось, как правило, при температуре -70^0C – -80^0C. Высказывалось мнение о губительном для T.V. сохранении в жидком азоте. Несмотря на разнообразие предлагаемых методов, срок сохранения ограничивался, как правило, 0,5-1 годом (5, 6, 7, 8, 9). Предлагаемые в процитированных выше работах условия, принципы и уровень протекции простейших при криоконсервации являются, безусловно, паллиативным средством с заведомо ограниченными результатами в длительности хранения и логичной утратой при

этом биосинтетического потенциала. В настоящее время отсутствует технология долгосрочного хранения простейших в условиях глубокого замораживания.

T.V. является легко разрушающимся в процессе охлаждения одноклеточным сложноустроенным организмом, размеры которого (7-30 микрон), сравнимы с культивируемыми клетками. Поэтому, перспективным, с нашей точки зрения, является использование для криоконсервации T.V. значительного научно-практического опыта криоконсервации клеточных культур. Основными задачами, которые представлялось необходимым решить для осуществления успешной и долгосрочной криоконсервации T.V., были следующие:

- подготовить высокожизнеспособную популяцию в концентрации не менее 2-3 x 10^7-10^8/мл паразитического простейшего T.V. в условиях in vitro, максимально приближенных к естественным условиям его существования, то есть при совместном культивировании с клеточными культурам (в системе паразит-хозяин);
- отработать минимальную эффективную дозу быстро проникающего криопротектора ДМСО с целью уменьшения его токсического действия и оптимизировать состав криозащитной среды;
- подобрать температурный режим охлаждения для последующего длительного хранения в условиях глубокого замораживания, то есть в жидком азоте при температуре -196^{0}C.

При условии выполнения поставленных задач, возможно формирование современной охарактеризованной криоколлекции различных штаммов паразитического простейшего T.V., близких к ним организмов и их длительное хранение. Очевидно, что существование такой коллекции невозможно без информации о каждом объекте. Поэтому в задачи исследования входила и попытка сформулировать объем и схему информации о каждом штамме T.V., т.е. предложить возможный вариант паспорта.

Материал и методы

Штаммы Trichomonas vaginalis были выделены из 9 клинических образцов урогенитального материала больных острым трихомониазом при посеве их на селективную среду TYM с добавлением 10% сыворотки КРС (Биолот). В течение 3-4 суток патологический материал культивировался при 37^{0}C, затем полученная бульонная культура подвижных простейших центрифугировалась при 1500 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Для дальнейших исследований полученный осадок переносили на монослой клеточной культуры в концентрации 5x10^4 - 5x10^5/мл. Как правило, патологический изолят

исходного материала оказывался значительно контаминированным сопутствующей бактериальной и микотической флорой, поэтому бульонная культура и, далее, инфицированная клеточная культура в той или иной степени содержали эти контаминанты, что легко определялось при прижизненной микроскопии. Оказалось, что культуры трех из девяти исходных штаммов содержали низкую концентрацию подвижных T.V. и значительное количество посторонних контаминантов, явно угнетающих рост T.V. Для дальнейшей работы эти образцы оказались непригодными. Поэтому для подготовки к криоконсервации было использовано 6 штаммов паразитических простейших T.V. С целью угнетения вегетации бактериальной и микотической флоры и последующей очистки в среду культивирования добавляли комбинацию из 3-4 антибиотиков, обязательным из которых являлся амфотерицин (5 ед/мл), что существенно сдерживало рост бактериальной и микотической флоры. Были использованы следующие антибиотики: пенициллин, стрептомицин, канамицин по 400-500 ед/мл, линкомицин 300-400 ед/мл и гентамицин 300 ед/мл. Комбинация антибиотиков подбиралась эмпирически в зависимости от конкретных результатов той или иной стадии обработки. Дополнительная очистка проводилась путем многократного пассирования на клеточных культурах. При последовательном инфицировании простейшими клеточного монослоя начальные концентрации в питательной среде находились в пределах 1-5 х 10^3-10^5/мл.

Клеточные культуры, используемые в настоящем исследовании, являются коллекционными линиями ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития России. Это известные и широко используемые линии различного видового и тканевого происхождения: HEp-2, L-41, MA-104, MDCK, Vero, L-929. Линии имели паспорта и были свободны от контаминантов. Для культивирования всех видов клеток была использована комбинация сред αMEM/199 в соотношении 1:1 с добавлением 5% сыворотки крови КРС или 5% сыворотки эмбрионов коров (все – производства «Биолот»). При культивировании клеток использовался антибиотик гентамицин 100ед/мл.

Совместное культивирование клеток и простейших осуществляли при 37^0С. Клеточные культуры для инфицирования простейшими выращивали в пластиковых 6-, 12-, 24–луночных планшетах и пластиковых флаконах 25 $см^2$ (Orange Scientific, Бельгия). Прижизненные наблюдения осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Telaval. Для контроля контаминации и проведения более детальных исследований готовили препараты инфицированных клеточных культур, выращенных на покровных стеклах. Препараты

фиксировали 96%-ным охлажденным этиловым спиртом в течение 10 мин и окрашивали при комнатной температуре по Романовскому–Гимза. Анализировали препараты с помощью микроскопа МББ–1. Подсчеты клеток и простейших осуществляли с помощью камеры Горяева при окрашивании материала 0,4%-ным раствором трипанового синего.

Криоконсервацию T.V. осуществляли, исходя из принципов, принятых для клеточных культур, с уточнением отдельных параметров для исследуемого объекта. В качестве криопротектора использовали ДМСО. Суспензию, состоящую из простейших, клеток L-41, и содержащую криопротектор, разливали по криопробиркам. Замораживание подготовленного материала проводили в 96%-ном этиловом спирте с помощью последовательного добавления жидкого азота. В предварительных опытах по криоконсервации был испытан следующий режим охлаждения: от $+4^0$ до -30^0С материал охлаждался со скоростью 1 градус в минуту, от -31^0 до -55^0С - со скоростью 5 градусов в минуту, затем следовало быстрое охлаждение до -65^0 -70^0С и погружение в жидкий азот. Размораживание проводилось обычным способом, как это принято для клеточных культур: помещение криопробирок с материалом из жидкого азота в воду с температурой +45 - $+50^0$С. Пробное восстановление T.V. было произведено непосредственно после погружения в жидкий азот и через 7 дней хранения. Жизнеспособность T.V. составила 80-90%, что соответствовало исходному состоянию. Во всех последующих экспериментах был использован именно этот режим замораживания. Криоконсервации были подвергнуты 6 штаммов T.V.

Для всех криоконсервированных штаммов T.V. жизнеспособность определялась в течение всего срока хранения (2 года): через 1-2 месяца, 6 месяцев, 1 год и 2 года. При восстановлении проводили окрашивание 0,4%-ным раствором трипанового синего на нулевом пассаже и титрование заражающей дозы на монослое клеток 12- или 24- луночного планшета.

Результаты и обсуждение

Биологические свойства и строение Trichomonas vaginalis.

Протозойное паразитическое простейшее T.V., являющееся причиной строго антропонозного воспалительного заболевания урогенитальных путей человека, было открыто Альфредом Донне в 1836 г. как влагалищный паразит (1). Несмотря на относительно небольшие размеры (7-30 микрон), T.V. имеет довольно сложное строение (рис.1).

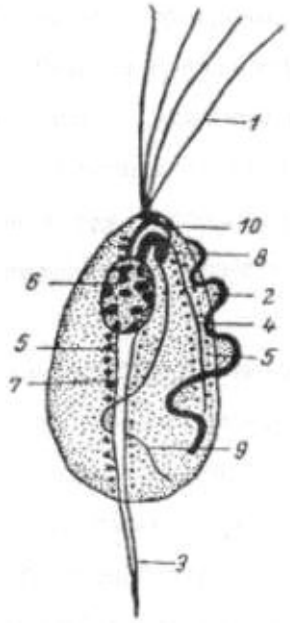


Рис 1. Схема строения клетки урогенитальной трихомонады (Суханова, 2000).

1 – жгутики, 2 – ундулирующая мембрана, 3 - шипик, 4 – коста, 5 – гидрогеносомы, 6 – ядро, 7- аксостиль, 8- парабазальное тело, 9 – парабазальный филамент, 10 – пельта.

От переднего конца клетки отходит 5 жгутиков, 4 из которых направлены вперед, а 5-й (возвратный или рекуррентный) жгутик – к заднему концу клетки. Ядро имеет структуру, характерную для большинства ядер эукариот, окружено 2-х-слойной ядерной мембраной и смещено к передней части клетки. Вдоль всего тела простейшего проходит так называемая ундулирующая мембрана, являющаяся, наряду со жгутиками, органоидом движения. Комплекс этих структур может выполнять поступательные и вращательные движения T.V., что является важным при передвижении в вязкой межклеточной среде макроорганизма. Структуры аксостиль, коста и пельта являются элементами цитоскелета. Аксостиль проходит по всей длине клетки и его задний конец выдается наружу в виде шипика. Особенностью T.V. является отсутствие в цитоплазме типичных митохондрий. Неким аналогом митохондрий принято считать гранулярные структуры гидрогеносомы. В цитоплазме визуализируются лизосомоподобные структуры – фагосомы. T.V. имеет диплоидный набор хромосом 2n=6, но половой процесс неизвестен. Исследования in vitro по совместному культивированию T.V. с лактобациллами, стафилококками, лейкоцитами и эритроцитами продемонстрировали фагоцитарную активность T.V. в отношении всех перечисленных бактерий и клеток. Феномен

обнаружения in vivo бактерий и вирусов человека внутри цитоплазмы T.V. мало изучен и требует дальнейшего детального исследования (1, 10, 11, 12).

Нормативные документы РФ по лабораторной диагностике трихомониаза регламентируют дифференцировку исключительно типичных грушевидных форм T.V., которые при остром трихомониазе легко идентифицируются при микроскопии нативных изолятов благодаря своей подвижности (13). Тем не менее, многолетними исследованиями отечественных и зарубежных авторов продемонстрировано существование T.V. в материалах от больных трихомониазом одновременно в 3-х морфологических формах или морфотипах: грушевидная жгутиковая, обладающая подвижностью, амебоидная и округлая. Установлено, что переход от одного фенотипа к другому сопровождается корреляционной изменчивостью внутреннего строения. Патогенетический смысл морфотипов T.V. и их жизненный цикл активно обсуждается на протяжении многих лет. Фенотипическая изменчивость паразитического T.V. in vivo обусловлена, по-видимому, постоянно меняющимися условиями внутренней среды макроорганизма, влиянием нейрогуморальных и иммунных факторов, а также конкурентными метаболическими взаимоотношениями с биоценозом ацидофильной и анаэробной микрофлоры человека. В настоящее время представляется убедительной точка зрения, характеризующая округлые и амебоидные морфотипы не как дегенеративные или тупиковые формы T.V., а как одну из стадий их жизненного цикла, а именно: стадию непосредственной адгезии на эпителиальную клетку и последующее её разрушение, т.е. проявление цитотоксичности по отношению к клетке хозяина. Этот факт продемонстрирован в многочисленных экспериментах in vitro, в том числе и в работах авторов этой статьи (4, 14, 15, 16, 17, 18, 19).

Культивирование Trichomonas vaginalis.

На первом этапе настоящего исследования необходимо было выбрать наиболее оптимальную клеточную линию для подготовки и накопления достаточного количества жизнеспособных T.V. при проведении криоконсервации. Для первичного заражения клеток 2-х - 4-х суточную бульонную культуру T.V. в селективной бесклеточной среде TYM с добавлением сыворотки КРС центрифугировали и осадок простейших наносили на клеточный монослой в концентрации 2 x 10^3-10^5/мл. В начале исследования были произвольно использованы клетки L-41. Разрушение клеточного пласта и накопление T.V. происходили в течение 24-48 часов и зависели от исходного материала. В результате полной деструкции клеток популяция T.V. увеличивалась, как правило, в несколько раз. Контроль осуществлялся

при прижизненной микроскопии и на окрашенных препаратах. Второй и последующий пассажи для накопления биомассы простейших не представляли особой трудности. На пассажах концентрация T.V. могла достигать 2-3-х 10^8/мл. В течение 8-12 часов после разрушения клеточного монослоя T.V. сохраняли высокий пролиферативный и жизненный потенциал, далее отмечались процессы старения, выражающиеся в уменьшении количества и подвижности T.V. При заражении клеточного монослоя линий HEp-2, L-41, MA-104, MDCK, Vero, L-929 дозами T.V. 10^5 и 10^6/мл были прослежены скорость и характер разрушения монослоя и клеток. Хотя принципиальных отличий в деструктивных процессах и в количестве получаемых T.V. выявлено не было, дольше всего процесс разрушения длился на клетках Vero и L-929; средние показатели были характерны для клеточных линий MA-104 и MDCK. Монослои клеточных линий HEp-2 и L-41 разрушались наиболее быстро. Неодинаковая чувствительность клеточных линий определялась, по-видимому, не только самой природой клеток, но и гистотипической структурой монослоя. Для последующей работы была выбрана линия L-41 как удобная, простая в культивировании, активно пролиферирующая клеточная линия, характеризующаяся выраженными адгезивными свойствами и высокой плотностью насыщения монослоя. Накопление T.V. в любых количествах при использовании клеток L-41 не представляло больших трудностей.

Трудноразрешимой проблемой оказалась деконтаминация штаммов T.V. от бактериальной и микотической флоры, полученной из первичного патологического изолята. Ситуация усугублялась тем, что при культивировании T.V. на культуральных средах, дополненных ростовыми факторами клеток, активно размножались не только T.V., но и ассоциированные с ними контаминанты. Необходим был комплекс мер, направленных на сдерживание активного роста контаминантов и, по возможности, удаления их из среды культивирования. Для этого в среду вводили комплекс подобранных эмпирически 3–4-х антибиотиков с увеличенными в 4-6 раз дозами по сравнению с профилактическими. Обязательно добавлялся амфотерицин, доза которого была увеличена в 2 раза. В дополнение к культивированию в присутствии антибиотиков был использован достаточно эффективный, как оказалось, метод разделения популяции T.V. и сопутствующих контаминантов. Для этого клетки L-41 выращивали до плотного монослоя в нескольких пластиковых флаконах (25 см^2). Затем на монослой наносилась 1/3–1/2 суспензии T.V. от предыдущего пассажа после полного разрушения монослоя вместе с питательной средой и детритом и выдерживалась 2-3 часа при 37^{0}C. Затем среда сливалась, монослой осторожно споласкивался теплой средой и заливался

новой порцией среды с усиленной дозой антибиотиков. Далее культивирование T.V. снова проходило до полного разрушения клеточного монослоя (24-36 часов) и 1/3 полученной суспензии трихомонад переносилась на новый монослой клеток L-41. Описанная процедура повторялась многократно. Комплексы антибиотиков, временные интервалы, заражающие дозы подбирались эмпирически в зависимости от конкретных результатов. Контроль осуществлялся с помощью микроскопирования нативных и окрашенных препаратов. Можно было добиться такого состояния популяции T.V., при котором на окрашенных препаратах активно вегетирующая сопутствующая бактериальная флора не идентифицировалась. От микотической составляющей ассоциированных с T.V. контаминантов вышеописанными процедурами удавалось избавиться полностью в течение нескольких пассажей, о чем свидетельствовало отсутствие дрожжеподобных и мицелиальных элементов гриба при длительном культивировании популяции простейших и при их культивировании после криоконсервации. Полностью избавиться от бактериальной флоры оказалось практически невозможным.

Процесс размножения T.V. сопровождался проявлением феномена активного фагоцитоза ими бактерий, которые, возможно, достаточно длительное время сохраняют свою жизнеспособность в фагоцитированном состоянии, в том числе и в процессе криоконсервации. Популяцию T.V. считали условно деконтаминированной и готовой к криоконсервации при отсутствии на окрашенных препаратах вегетирующей бактериальной флоры в течение 2-х – 3-х и более пассажей с интервалом пересева 48–72 часа. О высокой жизнеспособности T.V. свидетельствовала выраженная подвижность простейших и способность к развитию инфекционного процесса при небольших заражающих дозах – 200-400/мл. Как правило, процедура подготовки штамма T.V. занимала 1–2 месяца.

Криоконсервация Trichomonas vaginalis и характеристика криоконсервированных штаммов.

Для криоконсервации были подготовлены 6 штаммов T.V. В результате заражения 3-х пластиковых флаконов (25 см^2) можно было получить 15-20 мл культуры T.V. с концентрацией 10^7-10^8/мл. На последнем этапе подготовки суспензии концентрат T.V. наносился на адекватную площадь клеточного монослоя L-41 с удаленной средой, т.е. 20 мл концентрированной суспензии T.V. наносились на монослой клеток во флаконе объемом 200 мл. Через 30–80 минут разрыхленный и частично разрушенный монослой можно было легко стряхнуть с подложки вместе с T.V. Полученная суспензия, как правило, содержала не менее 2 х 10^8/мл простейших и могла быть далее сконцентрирована или подвергнута

криоконсервации в исходной концентрации. В качестве криопротектора был использован ДМСО. Для уточнения минимальной концентрации ДМСО была проведена пробная криоконсервация одного штамма T.V. с 3%, 5% и 10% ДМСО. Каждый вариант был восстановлен сразу после замораживания и через месяц хранения в жидком азоте. Для каждого варианта было восстановлено по 3 криопробирки с материалом и определена доля жизнеспособных T.V. и минимальная заражающая доза. Существенных отличий между вариантами с 5 и 10% ДМСО на нулевом пассаже и после месяца хранения обнаружено не было. Жизнеспособность простейших, криоконсервированных с 3% ДМСО, после месяца хранения снизилась на 25%. Исходя из полученных результатов, основную криоконсервацию всех штаммов проводили с 5% ДМСО. Таким образом, подготовленная к криоконсервации суспензия для каждого штамма T.V. состояла из кондиционированной культуральной среды (75%), содержащей концентрат T.V. (2–3 x 10^7-10^8/мл), клетки L–41 и клеточный детрит, сыворотку КРС или эмбрионов коров (20%) и ДМСО (5%). Полученную суспензию разливали по криопробиркам и замораживали в соответствии с режимом, изложенным в разделе «Материал и методы».

6 криоконсервированных штаммов T.V. хранятся в криохранилище более 2-х лет. Контрольные размораживания простейших проводили через 1-2 месяца, 6 месяцев, 1 и 2 года. В течение первого года хранения количество жизнеспособных особей T.V. сократилось на 15-25% от исходного состояния, а к концу второго года - на 25–30%. Следует отметить, что и к концу второго года хранения при восстановлении T.V. с использованием клеточной культуры, простейшие приобретают подвижность через 10–15 мин после инфицирования ими клеток. При увеличении заражающей дозы быстро развивается инфекционный процесс, разрушается монослой и популяция T.V. быстро восстанавливается.

Возможность длительного хранения T.V. в условиях глубокого замораживания позволяет создать криобанк длительного хранения патогенных простейших, входящих в структуру ИППП. Предлагаемый ниже проект характеристики (паспорт) можно считать предварительным обобщением научно-практического опыта исследований авторов в течение нескольких лет по лабораторной диагностике и культивированию T.V. *in vitro*. Характеристика штамма дана на основе схемы паспорта коллекционной клеточной линии.

Характеристика штамма паразитического простейшего *Trichomonas vaginalis* Donne

Коллекционный номер, обозначение (наименование) штамма _____

Биологический вид, классификация _____

Автор, публикация _____

История происхождения штамма

Дата, географическое место выделения T.V._____

Клинические данные о пациенте (диагноз, характеристика патологического изолята, сопутствующие инфекции, методы выделения и диагностики) _____

Сведения о безопасности материала (наличие у пациента СПИДа, гепатита и прочих опасных сопутствующих инфекций) _____

Морфологическая характеристика in vivo и in vitro _____

Характеристика вирулентности (степень манифестации инфекционного процесса in vivo и in vitro, маркеры вирулентности) _____

Условия и параметры культивирования in vitro (клеточные линии, среды, сыворотки, антибиотики, пассажи и дозы заражения in vitro)_____

Криоконсервация. Состав замораживаемой суспензии: ростовая среда, T.V. (концентрация), клеточная линия, сыворотка, антибиотики, ДМСО_____

Определение жизнеспосособности после криоконсервации (доля T.V., окрашенных трипановым синим на нулевом пассаже в %, и определение минимальной заражающей дозы на клеточных культурах in vitro)_____

Контроль контаминации_____

Контроль видовой идентичности_____

Кариология_____

Другие характеристики и особенности штамма (биохимические маркеры, клонирование, феномен внутриклеточного фагоцитоза)_____

Область применения _____

Коллекции _____

Многие положения данной характеристики являются дискуссионными и требуют развернутых обсуждений и, по мнению многих авторов, не имеют еще достаточно убедительных данных. Например, такой показатель как маркер вирулентности, то есть степени манифестации инфекционного процесса in vivo, логично мог бы быть протестирован in vitro на клетках, но не все авторы с этим согласны. Мало изучен такой феномен трихомонад как способность к фагоцитозу. Продемонстрирована способность T.V. фагоцитировать клетки, дрожжеподобные элементы гриба, бактерии и вирусы (герпес), но не решен вопрос о сохранении жизнеспособности фагоцитированных агентов. Если экстраполировать эти

данные и на более опасные инфекции, такие как СПИД и гепатит, то очевидно, что и степень опасности работы с T.V. и контроли штаммов T.V. должны быть расширены. На основании многолетнего опыта работы с T.V. можно сделать заключение, что этот организм может представлять интерес не только как патоген человека, но и как объект со сложной организацией, с высоко плейоморфными потенциями, непростым жизненным циклом. T.V. может эффективно использоваться как модель и инструмент исследования в экспериментальной медицине и биологии.

Список литературы

1. **Дмитриев Г.А.** Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций. М. «Мед. книга» - Н.Новгород. Изд-во НГМА. 2003, 336 с.
2. **Клименко Б.В., Авазов Э.П., Барановская В.Б.** Трихомониаз мужчин, женщин и детей. СПб, «Сюжет». 2001,183 с.
3. **Скрипкин Ю.К., Шарапова Г.Я., Селисский Г.Д.** Инфекции, передаваемые половым путем: практическое руководство. М. 2001, 368 с.
4. **Раздольская Н.В.** Диагностическое значение цитоморфологических, культуральных и иммуногенных свойств Trichomonas vaginalis. Автореф. канд. дисс. СПб. 2009, 24 с.
5. **Christian R.T., Miller N.F., Ludovici P.P., Riley G.M.** A study of Trichomonas vaginalis in human cell culture. Am.J.Obst.& Gynec. 1963, 1: 947-954.
6. **Беднова В.Н., Кисина В.И., Данилова Т.Н., Каменецкая С.Б., Нарзикулов Р.М.** Способ длительного сохранения штаммов влагалищной трихомонады. Вестник дерматологии и венерологии. 1990, 10: 24-26.
7. **Miyake Y., Karanis P. Uga S.** Cryopreservation of protozoan parasites. Cryobiology. 2004, 48: 1-7.
8. **Matsuo J.** A simple and rapid method for cryopreservation of Trichomonas vaginalis. Parasitol. Res. 2007, 101: 907-911.
9. **Barchardt K.A.** A new method for extended trichomonad storage. Sex Transm. Infect. 2004, 80: 74-78.
10. **Суханова К.М.** Протисты. Часть 1. Руководство по зоологии. СПб. Наука. 2000, 368 с.
11. **Карпов С.А.** Строение клетки протистов. СПб. «ТЕССА». 2001, 382 с.
12. **Yuh Y.S., Lied J.Y., Shaio M.F.** Chromosome number of Trichomonas vaginalis. J. Parasitol. 1997, 83. 3: 551-553.
13. Национальный стандарт «Урогенитальный трихомониаз, неосложнённая форма», проект. Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. М. 2008.
14. **Alderete J.F., Pearlman E.** Pathogenic Trichomonas vaginalis cytotoxcity to cell culture monolayers. Br.J.Vener.Dis. 1984, 60: 99-105.
15. **Alderete J.A., Demes P, Gombosova A., Valent M.** Specific Parasitism of Purified Vaginal Epitelial Cells by Trichomonas vaginalis. Infection and Immunity. 1988, 56. 10: 2558-2562.
16. **Jesus J.B., Vannier-Santos M.A., Britto C., Godefroy P.** Trichomonas vaginalis virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established stain and a fresh isolate. Parasitol. Res. 2004, 93: 369-377.
17. **Rojas L., Sariego I., Fraga J., Sarria C.A.** Use of in vitro cytoadherence assays in the comparative study of the virulence of isolates of Trichomonas vaginalis. Parasitol. Res. 2004, 93: 332-337.

18. **Раздольская И.В., Литвинчук Л.Ф., Иванов А.М., Гаврилова О.В.** Инфицирование клеточных культур паразитическими простейшими Trichomonas vaginalis. Бюлл. Моск. общ. испыт. природы. 2009, 114, 2: 88-89.
19. **Gilbert R.O., Ella G., Beach D.H.** Cytopathogenic Effect of Trichomonas vaginalis on Human Vaginal Epithelial Cells Cultured In Vitro. Infection and Immunity. 2000, 68, 7: 4200-4206.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУПЕРНАТАНТА ПРОГЕНИТОРНЫХ НЕЙРОКЛЕТОК КРЫС НА КУЛЬТУРАХ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА

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

ДУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова АМН Украины», Киев,

seveme22@rambler.ru

Исследовано влияние супернатанта (фактора) прогениторных нейроклеток (ФНК) из фетального мозга крысы (Е12-16) на активность роста глиальных опухолей головного мозга человека в условиях культивирования. Зарегистрирован дозозависимый цитотоксический эффект воздействия ФНК на опухолевые клетки культивируемых глиом после его 24–часовой инкубации с культурами. Воздействие ФНК индуцирует дистрофические и некробиотические изменения в опухолевых клетках культур с нарушением общей структуры зоны роста, нарастающие при увеличении тестируемой концентрации ФНК и удлинении срока инкубации до 48 часов. Наиболее выраженный эффект противоопухолевого влияния ФНК наблюдается в культурах глиобластом – самых злокачественных глиом головного мозга.

Ключевые слова*:* прогениторные нейроклетки мозга крысы, супернатант, фактор нейроклеток, культуры глиом головного мозга человека, анапластические астроцитомы, глиобластомы.

Как известно, внутримозговые глиальные опухоли (глиомы) являются самыми распространенными первичными опухолями мозга, значительную часть которых составляют злокачественные формы с плохим прогнозом для жизни пациентов. Среди всех глиом головного мозга у 30% больных диагностируются анапластические астроцитомы, а у 50 % -

глиобластомы. Злокачественные глиомы характеризуются высокой пролиферативной активностью, в большинстве случаев резистентны к антибластической химио- и лучевой терапии и обладают инфильтративным ростом, что обусловливает их продолженный рост после частичного хирургического удаления (1). В связи с этим возникает потребность в разработке новых подходов мишеневой терапии этих опухолей и создании новейших клеточно-молекулярных технологий для их лечения. Одним из таких подходов в комплексном лечении злокачественных форм этих новообразований является метод биотерапии и генно-клеточной терапии с использованием стволовых клеток (СК) (2,3).

Известно, что клетки эмбриональной нервной ткани (ЭНТ) содержат значительное количество нейрогенных СК (НСК), которые могут проявлять противоопухолевые свойства (4). В частности, в эксперименте показано противоопухолевое влияние эмбриональных нейроклеток и клеток мозга новорожденных животных на опухолевые клетки линии К-562 (5). Подобный эффект наблюдался также на модели глиом человека, трансплантированных под капсулу почки мышей (в субкапсулярном тесте) совместно с нейрональнообогащенными клеточными суспензиями, полученными из ткани развивающегося мозга (4). Зарегистрировано также прямое цитотоксическое воздействие эмбриональных нейроклеток крыс на клетки экспериментальной перевивной злокачественной глиомы крыс (штамм 101.8) при их совместном культивировании (6).

Однако, вопрос о противоопухолевом потенциале НСК, особенно их гуморальных агентов, недостаточно изучен, и поскольку существуют перспективы их использования в комплексном лечении злокачественных опухолей мозга, исследования в этом направлении являются крайне актуальными.

Целью настоящей работы являлось исследование особенностей влияния супернатанта нейроклеток из ЭНТ крыс на активность роста злокачественных глиальных опухолей головного мозга человека в первичных диссоциированных культурах.

Материал и методы

Материалом для культивирования служили фрагменты опухолей головного мозга, удаленных во время оперативного вмешательства (n=32). Для получения супернатанта - ФНК использовали суспензию НК из ткани фетального мозга крысы 12-16 суток гестации (Е12-16). Нативную ткань мозга в физиологическом растворе освобождали от оболочек, переносили в среду DMEM (Sigma, Германия) и суспендировали с помощью шприца с толстой иглой. Жизнеспособность клеток в суспензии определяли в стандартном цитотоксическом тесте с

0,2% трипановым синим (“Merch”, Германия) (7). К полученной клеточной суспензии (концентрация 6,0x10^6 клеток/мл) добавляли конканавалин А (10 мкг/мл) и инкубировали 2 часа в CO_2-инкубаторе при 37,0±0,5^{0}С при постоянной влажности 95% и 5% CO_2. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, отмывали в среде DMEM, добавляли свежую среду DMEM и инкубировали в тех же условиях в течение 24 час. После инкубации клетки вторично осаждали центрифугированием 5 мин при 1500 об/мин, отбирали супернатант, определяли в нем концентрацию белка, стандартизировали до концентрации 0,1 мг/мл, аликвотизировали и сохраняли при – (20±0,5) ^{0}С.

Получение первичных диссоциированных культур из опухолей головного мозга. В качестве экспериментальной модели опухолевого роста глиом головного мозга использованы первичные диссоциированные культуры, полученные по стандартной методике (7). Культивировали ткань 32 опухолей головного мозга, удаленных у нейрохирургических больных на операциях. Согласно международной классификации опухолей ЦНС (8) при гистологическом исследовании опухолей диагностировано: 11 анапластических астроцитом и 4 анапластических олигоастроцитом (III степень анаплазии), 17 глиобластом (IV степень анаплазии). Полученную из операционной опухолевую ткань отмывали от крови, освобождали от сосудов и оболочек, измельчали микроножницами в среде DMEM и механически диссоциировали многократным пипетированием. По 1x10^6 клеток наносили на покровные адгезивные стекла, покрытые полиэтиленимином (“Sigma”). Культивирование опухолей проводили в чашках Петри в среде 199 и DMEM (1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 400 мг% глюкозы и 0,2 ед/мл инсулина. Культуры опухолей содержали в CO_2-инкубаторе (37^{0}С, 95% влажности и 5% CO_2), прижизненно наблюдали в инвертированном микроскопе (Биолам П-3, ЛОМО, С.- Петербург) в динамике роста. В опыты отбирали культуры с наиболее обширной, относительно равномерной зоной роста. В каждом опыте культуры распределяли на 3 группы: 1) – контрольная группа; 2) – культуры глиом, инкубированные с препаратом ФНК в течение 24 час; 3) - культуры глиом, инкубированные с препаратом ФНК в течение 48 час. Концентрация ФНК в группах 2 и 3 составляла 0,02 и 0,1 мг/мл. Для гистологического исследования контрольные и опытные культуры фиксировали 10%-ным формалином и окрашивали гематоксилином Караччи.

В культурах глиом визуально оценивали фенотипические особенности клеточного состава, характер распределения опухолевых клеток, общую архитектонику зоны роста. На гистологических препаратах культур анализировали также частоту митотически делящихся

опухолевых клеток с оценкой патологии митозов и определением митотического индекса (МИ). Подсчет митозов проводили в 3-х наблюдениях культур каждого гистологического типа глиом и каждого варианта опытов в 10 случайно выбранных полях зрения микроскопа (х400), выведенных на монитор цитоанализатора изображения IBAS-2000 (Германия). На каждом препарате подсчитывали не менее 1000 клеток. В этих же участках опытных культур визуально оценивали содержание измененных клеток по сравнению с контрольными культурами. Количественные показатели МИ обрабатывали методом вариационной статистики для малых выборок (9).

Результаты и обсуждение

Контрольные культуры глиом. Прижизненные наблюдения культивируемых глиом III-IV степени анаплазии в динамике роста, а также их изучение на гистологических препаратах показало, что в этих условиях отчетливо воспроизводятся гистотипические признаки роста, свойственные гистоструктуре этих опухолей in vivo. В стадии сформированной зоны роста культур (8 - 10 сут) наблюдались обширные разрастания фенотипически характерных глиальных опухолевых клеток различной степени анаплазии. В культурах анапластических астроцитом III степени анаплазии чаще обнаруживались участки роста умеренно полиморфных отростчатых опухолевых клеток астроцитарного генеза, формирующих характерные сетевидные структуры. Местами в зоне роста таких культур преобладали монослойные территории малодифференцированных опухолевых глиоцитов, среди которых выявлялись клетки в стадии митотического деления (МИ составлял 2,43 $\pm$ 0,09 %).

В контрольных культурах анапластических олигоастроцитом III степени анаплазии (глиом смешанного состава) наряду с разрастаниями опухолевых клеток астроцитарного фенотипа определялись плотноклеточные монослойные комплексы опухолевых олигодендроцитов с узкими цитоплазматическими телами, переходящими в короткие конусовидные отростки. Опухолевые олигодендроциты содержали ядра правильной округлой формы с компактной структурой хроматина. При этом признаки ядерного полиморфизма более отчетливо выявлялись в опухолевых клетках астроцитомного компонента этих культур, что наблюдается также и в гистоструктуре нативной ткани этих опухолей, исследованных на биоптическом (операционном) материале.

По сравнению с анапластическими астроцитомами и олигоастроцитомами, глиобластомы (IV степень анаплазии) в условиях культивирования отличались от глиом III степени анаплазии злокачественности большей плотностью роста, а также резко выраженным

клеточным полиморфизмом. В глиобластомах появлялись атипические гигантские одноядерные или многоядерные формы. Наряду с этим, в зоне роста культивируемых глиобластом часто выявлялись патологические типы митотического деления: моноцентрическая метафаза, отщепление хромосом или их рассеивание в метафазе, полая и комковатая метафаза (К-митоз). При этом показатель митотической активности опухолевых клеток (МИ =3,84 ±0,08%) существенно превышал таковой в культурах анапластических астроцитом. Наличие повышенного содержания делящихся клеток в культурах глиобластом отражает ускоренную пролиферацию этих опухолей соответственно их гистоструктуре и гистобиологическим свойствам in vivo.

Результаты тестирования культивированных глиом с ФНК. В опытных культурах анапластических астроцитом и олигодендроастроцитом III степени анаплазии 24-часовая инкубация с ФНК (0,02 мг/мл) вызывает заметное разрежение преимущественно в монослойных участках зоны роста культур за счет частичной десквамации дистрофированных опухолевых клеток. Важно отметить, что среди опухолевых клеток более дифференцированной популяции с признаками астроцитарного фенотипа дистрофические изменения клеток выражены в заметно меньшей степени, чем в монослойных разрастаниях малодифференцированных опухолевых клеток. Вместе с тем, в сохранных участках зоны роста этих культур выявлялись фигуры митотического деления, однако средний МИ снизился до 1,90±0,23 %.

Увеличение концентрации исследуемого препарата ФНК (0,1 мг/мл) при этой же длительности инкубации в культурах анапластических глиом визуально индуцирует некоторое нарастание содержания поврежденных опухолевых клеток. Однако, в сохранных клеточных комплексах способность опухолевых клеток к митотическому делению сохраняется (МИ составляет 1,78±0.08%).

При удлинении срока инкубации этих культур с ФНК в той же концентрации до 48 час в зоне роста культур более часто выявлялись очаги разрежения клеточных массивов, что сопровождалось снижением митотической активности в сохранных участках зоны роста культур (МИ составил 1,22±0,09%).

Особый интерес представляет реакция на воздействие ФНК клеток культивируемых глиобластом, поскольку эти опухоли клинически обладают наиболее выраженными признаками злокачественности, высокой скоростью роста и часто поражают жизненно важные структуры головного мозга. В культурах глиобластом, инкубированных с ФНК (0,02 мг/мл) в

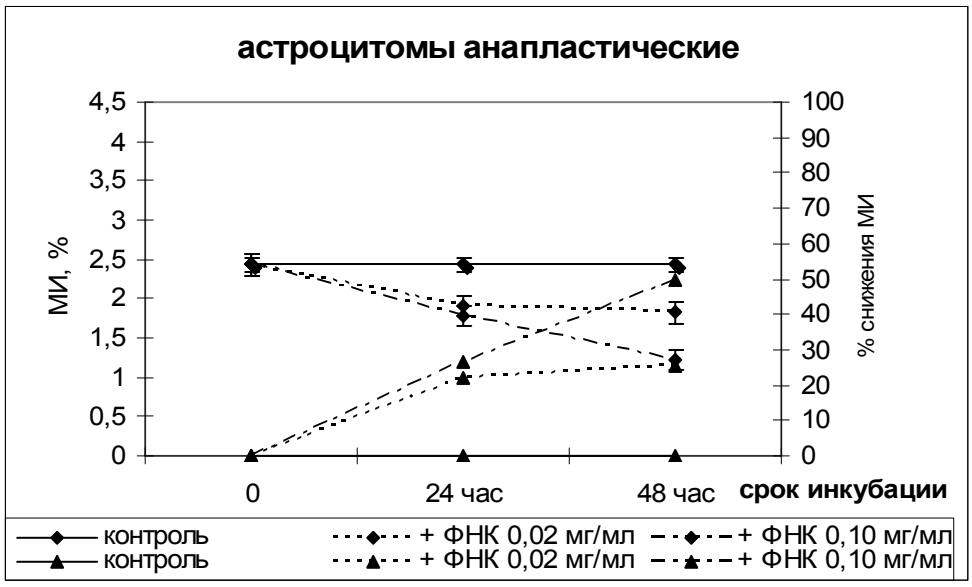
течение 24 час, прослеживаются признаки цитотоксического воздействия препарата в виде появления очагов дискомплексации зоны роста культур с наличием распадающихся клеток и снижением митотической активности (МИ составил 1,91±0,14%). Однако местами в таких культурах выявлялись островки морфологически сохранных клеток с признаками цитотипической астроглиальной дифференцировки, что указывает на устойчивость этой популяции фенотипически дифферецированных опухолевых клеток к воздействию тестируемого фактора. Аналогичный феномен прослежен и в культурах анапластических глиом III степени анаплазии. При увеличении срока инкубации культивируемых глиобластом с этой же концентрацией ФНК (0,02 мг/мл) до 48 часов доля поврежденных клеток нарастает, что сопровождается уменьшением МИ до 0,73%±0,10 .

Тестирование увеличенной концентрации ФНК (0,1 мг/мл, 24 часа) в культурах глиобластом показало сходный характер влияния препарата на опухолевые клетки, наблюдающийся при инкубации с меньшей концентрацией препарата (0,02 мг/мл). Однако после удлинения срока инкубации культур с большей концентрацией ФНК до 48 час на подложке оставались сохранными лишь небольшие остаточные комплексы опухолевых клеток с единичными митозами (МИ составил 0,28±0,04%). Таким образом, в этих опытах прослеживается тенденция дозозависимого ингибирующего влияния исследуемого препарата на опухолевые клетки культивируемых глиобластом. При этом выраженность регрессивных изменений в общей клеточной массе культур наиболее заметно усиливается при удлинении продолжительности инкубации культур с препаратом до 48 час.

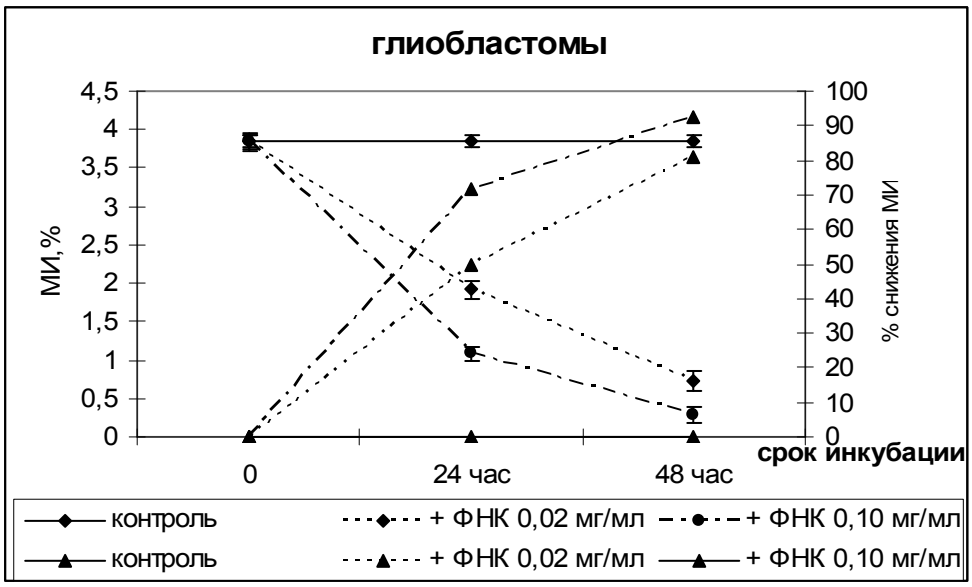
На рис.1(а,б) приведена динамика изменения МИ в культурах глиом после воздействия препарата ФНК в разных вариантах опытов. Из диаграммы следует, что в культурах глиом величина МИ постепенно снижается по мере увеличения концентрации ФНК и продолжительности инкубации культур с препаратом. При этом в культурах глиобластом наблюдается более значимое (статистически достоверное по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$) снижение МИ.

Проведенные исследования по тестированию препарата ФНК с целью оценки особенностей его влияния на первичные культуры глиальных опухолей III-IV степени анаплазии показали, что данный препарат на этой экспериментальной модели имеет тенденцию проявлять противоопухолевую активность. После инкубации с препаратом ФНК наблюдаются признаки дозозависимого цитотоксического действия препарата, который индуцирует появление дистрофических и некробиотических изменений в преобладающей

части опухолевых клеток с нарушением общей структуры зоны роста, усиливающиеся при удлинении времени инкубации до 48 час. Выявляется также зависимость эффекта действия препарата ФНК от степени анаплазии опухолей. Наиболее значимый эффект противоопухолевого действия препарата регистрируется в культурах глиобластом.



а



б

Рис.1. Динамика изменения митотического индекса (МИ) в культурах анапластических астроцитом (а) и глиобластом (б) после инкубации с супернатантом прогениторных нейроклеток (ФНК).

Суммируя полученные данные, можно предположить, что ФНК (Е12-16) крысы оказывает цитотоксическое и проапоптотическое действие на клетки опухолей мозга. Предпосылкой такого влияния, возможно, является способность эмбриональных и прогениторных

нейроклеток продуцировать цитокины с противоопухолевым действием. Так, известно, что мультипотентные нейральные прогениторные клетки человека экспрессируют как провоспалительные, так и супрессорные цитокины (IL-1α, IL-1β, TGF-β1, TGF-β2, TNF-α) (10). Нейральные прогениторные клетки крыс и мышей также экспрессируют некоторые из них при тех же условиях. Наряду с этим, нейральные прогениторные клетки крысы продуцируют все изоформы TGF-β (11). По другим данным в суспензии нейроцитов 17-20-недельного плода человека в следовых количествах выявлялся TNF-α, тогда как концентрация IL-6 составляла (36,64$\pm$4,64) пг/мл при отсутствии IL-10 (12). Кроме того, на роль биологически активных молекул, продуцируемых ЭНК, могут претендовать простагландин E2 (PGE2) и NO, секреция которых доказана для мезенхимальных СК (13-15).

НСК in vivo продемонстрировали высокую миграционную способность и супрессивный эффект на пролиферацию клеток глиомы (глиобластомы, медуллобластомы) (15-21). Введение прогениторных НСК в мозг увеличивало выживаемость животных с глиомой и угнетало развитие опухоли (11,22,23). Более того, генетическая модификация СК терапевтическими цитокинами и лигандами (S-TRAIL, CXCR3) усиливала противоопухолевый эффект и удлиняла срок выживания животных-опухоленосителей (24-26). В частности, НСК с трансфицированным геном IL-12, а также нейральные прогениторные клетки, генетически сконструированные к продукции IL-23, имели выраженный противоопухолевый эффект: увеличивали срок выживания животных-носителей внутримозговой и диссеминированной глиомы, по сравнению с несекретирующими НСК (2,3,27).

Полученные нами данные относительно противоопухолевого действия гуморальных факторов, выделенных из нейроклеток фетального мозга крыс (E12-16), согласуются с результатами, полученными в экспериментах гетеротрансплантации глиом под капсулу почки мышей (4). Показано, что на этой модели нейроклетки новорожденных животных и эмбрионов (E6-E17) оказывают ингибирующее влияние на рост глиальных опухолей человека и животных. Установлена также значительно менее выраженная ингибирующая опухолевый рост способность нейроклеток от взрослых животных, чем от новорожденных и эмбрионов, которая реализовалась путем продукции гуморальных агентов (6).

Обнаруженный нами феномен угнетения роста опухоли in vitro при воздействии ФНК на опухолевые клетки культивируемых глиом вполне согласуется также с концепцией иммуноподобных свойств клеток ЭНТ, описанных ранее (4). Активность воздействия ФНК на

опухолевые клетки глиом in vitro сопоставима с воздействием супернатанта лимфоцитов (СЛ) условно здоровых лиц (неопубликованные данные собственных наблюдений), что, предположительно, можно объяснить сходным набором продуцируемых растворимых факторов, содержащихся в кондиционированных средах от прогениторных нейроклеток крысы (под воздействием конканавалина А) и лимфоцитов условно здоровых лиц, что согласуется с известными данными литературы (10-12).

В наших исследованиях является доказательным предположение, что противоопухолевое действие растворимых продуцированных факторов прогениторных нейроклеток крысы обусловлено прямым цитотоксическим действием на клетки опухолей. Для установления механизма цитотоксического и возможного проапоптотического противоопухолевого действия супернатанта НК (Е12-16) крысы на культивированные клетки глиом необходимы дальнейшие исследования.

Выводы

Результаты представленных исследований существенно дополняют известные экспериментальные факты противоопухолевого влияния клеток ЭНТ и препаратов из нее на глиомы головного мозга различной степени анаплазии, что позволяет надеяться на разработку новых методов биотерапии злокачественных новообразований.

Список литературы

1. **Никифорова А.С., Коновалов А.Н., Гусев Е.И.** Клиническая неврология. М.: «Медицина», 2004, 3,1, 598 с.
2. **Ehtesham M., Kabos P., Kabosova A., Neuman T., Black K.L., Yu J.S.** The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. Cancer Res., 2002, 62, 20: 5657-5663.
3. **Yang S.Y., Liu H., Zhang J.N.** Gene therapy of rat malignant gliomas using neural stem cells expressing IL-12. DNA Cell Biol., 2004, 23, 6: 381-389.
4. **Лисяный Н.И.**, **Олейник Г.М., Маркова О.В., Семенова В.М., Носов А.Т.** Влияние клеток головного мозга на рост опухолей под капсулой почки in vivo. Иммунная система головного мозга. К., 1999:116-135.
5. **Маркова О.В.** Изучение некоторых механизмов цитотоксического действия клеток головного мозга in vitro. Иммунная система головного мозга. К., 1999:147-156.
6. **Семенова В.М., Цымбалюк В.И., Стайно Л.П., Любич Л.Д., Верхоглядов Ю.П.** Изучение противоопухолевых свойств различных популяций клеток головного мозга в культуре нервной ткани in vitro. Иммунная система головного мозга. К., 1999: 136-146.
7. **Божкова В.П., Брежестовский Л.А., Буравлев В.М.** Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. М.:Наука, 1988, 318 с.
8. **Kleihouse P., Cavanee W.K.** World Health Organisation Classifications of tumors: tumors of the nervous system – pathology and genetics.-Lyon, France: IARC Press, 2000. В кн.:Стандарты,

рекомендации и опции в лечении глиальных опухолей головного мозга у взрослых. М., 2005, 30 с.

9. **Шевченко И.Т., Богатов, Хрибта Ф.Л.** Элементы вариационной статистики для медиков. К.: Здоров'я, 1970. 112 с.
10. **Klassen H.J., Imfeld K.L., Kirov I.I., Tai L., Gage F.H., Young M.J., Berman M.A.** Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. Cytokine, 2003, 22, 3-4: 101-106.
11. **Staflin K., Honeth G., Kalliomaki S., Kjellman C., Edvardsen K., Lindvall M.** Neural progenitor cell lines inhibit rat tumor growth in vivo. Cancer Res., 2004, 64, 15: 5347-5354.
12. **Жусупова А.С., Сыздыкова Б.Р., Яушева Д.С.** Динамика уровня цитокинов в сыворотке крови больных с сирингомиелией и травматической болезнью спинного мозга после трансплантации фетальных нейроцитов. Нейроиммунология, 2007, 5, 2:47-48.
13. **Beachy P.A., Karhadkar S.S., Berman D.V.** Tissue repair and stem renewal in carcinogenesis. Nature, 2004, 432: 324-331.
14. **Oh I., Ozaki K., Sato K.** Interferon-gamma and NF-kappaB mediate nitric oxide production by mesenchymal stromal cells. Biochem.Biophys.Res.Commun., 2007, 355, 4: 956-962.
15. **Pisati F., Belicchi M., Acerbi F., Marchesi C., Giussani C., Gavina M., Javerzat S., Hagedorn M., Carrabba G., Lucini V., Gaini S.M., Bresolin N., Bello L., Bikfalvi A., Torrente Y.** Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models. Cancer Res., 2007, 67, 7: 3054-3063.
16. **Aboody K.S., Brown A., Rainov N.G., Bower K.A., Liu S., Yang W., Small J.E., Herrlinger U., Ourednik V., Black P.M., Breakefield X.O., Snyder E.Y.** Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence for intracranial gliomas. PNAS USA, 2000, 100: 12846-12851.
17. **Hamada H., Kobune M., Nakamura K., Kawano Y., Kato K., Honmou O., Houkin K., Matsunaga T., Niitsu Y.** Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. Cancer Sci., 2005, 96. 3: 149-156.
18. **Heese O., Disko A., Zirkel D.** Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. Neuro Oncol., 2005, 7, 4: 476-484.
19. **Pisati F., Bossolasco P., Meregalli M., Cova L., Belicchi M., Gavina M., Marchesi C., Calzarossa C., Soligo D., Lambertenghi-Deliliers G., Bresolin N., Silani V., Torrente Y., Polli E.** Induction of neurotrophin expression via human adult mesenchymal stem cells: implication for cell therapy in neurodegenerative diseases. Cell Transplant., 2007, 16, 1: 41-55.
20. **Schmidt N.O., Przylecki W., Yang W., Ziu M., Teng Y., Kim S.U., Black P.M., Aboody K.S., Carroll R.S.** Brain tumor tropism of transplanted human neural stem cells is induced by vascular endothelial growth factor. Neoplasia, 2005, 7, 6: 623-629.
21. **Ziu M., Schmidt N.O., Cargioli T.G., Aboody K.S., Black P.M., Carroll R.S.** Glioma-produced extracellular matrix influences brain tumor tropism of human neural stem cells. J.Neurooncol., 2006, 79, 2: 125-133.
22. **Barresi V., Belluardo N., Sipione S., Mudò G., Cattaneo E., Condorelli D.F.** Transplantation of prodrug-converting neural progenitor cells for brain tumor therapy. Cancer Gene Ther., 2003, 10, 5: 396-402.
23. **Staflin K., Lindvall M., Zuchner T., Lundberg C**. Instructive cross-talk between neural progenitor cells and gliomas. J. Neurosci Res., 2007, 85, 10: 2147-2159.
24. **Jeon J.Y., An J.H., Kim S.U., Park H.G., Lee M.A.** Migration of human neural stem cells toward an intracranial glioma. Exp. Mol. Med., 2008, 40, 1: 84-91.

25. **Honeth G., Staflin K., Kalliomäki S., Lindvall M., Kjellman C.** Chemokine-directed migration of tumor-inhibitory neural progenitor cells towards an intracranially growing glioma. Exp Cell Res, 2006, 312, 8: 1265-1276.
26. **Shah K., Bureau E., Kim D.E., Yang K., Tang Y., Weissleder R., Breakefield X.O.** Glioma therapy and real-time imaging of neural precursor cell migration and tumor regression. Ann Neurol., 2005, 57, 1: 34-41.
27. **Yuan X., Hu J., Belladonna M.L., Black K.L., Yu J.S.** Interleukin-23-expressing bone-marrow-derived neural stem-like cells exhibit antitumor activity against intracranial glioma. Cancer res., 2006, 66, 5: 2630-2638.

РАЗРАБАТЫВАЕТСЯ ПРОБЛЕМА

ОСОБЕННОСТИ РАСПОЛОЖЕНИЯ ХРОМОСОМ В ЯДРАХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO

А.В. Лавров, Я.И. Вольдгорн

Учреждение Российской академии медицинских наук Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, avlavrov@yandex.ru

Важная роль в регуляции экспрессии генов принадлежит эпигенетическим механизмам, в т.ч. трёхмерному строению хроматина в ядре. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются перспективной моделью изучения роли строения ядра в процессах дифференцировки, сопровождающейся значительными изменениями в экспрессии многих генов. Цель данной работы – изучение особенностей расположения хромосом в ядрах МСК на ранних и поздних пассажах культивирования МСК. Проанализировано более 400 ядер девяти культур МСК. Центромеры хромосомы 6 находятся на большем (0,68), а хромосомы 18 на меньшем (0,49) радиальном расстоянии. Гомологи каждой хромосомы лежат на различных радиальных расстояниях. Между МСК, полученными из жировой ткани и костного мозга, различий в радиальных расстояниях хромосом не выявлено. После восьмого пассажа происходит дистальное смещении центромеры хромосомы 6 (0,66 против 0,72), что может свидетельствовать о старении или спонтанной дифференцировке клеток.

Ключевые слова: хромосомная территория, строение интерфазного ядра, мезенхимная стволовая клетка.

Изучение структуры и пространственной организации интерфазного ядра, как основы регуляции генома на эпигенетическом уровне, является неотъемлемой составляющей современных исследований в области клеточной биологии. Изучение структуры хроматина в клеточном ядре ведётся уже более 20 лет. Показано не только неслучайное расположение хромосом в ядре, но и влияние пространственной укладки хроматина на такие важные функции, как, например, клеточную дифференцировку. Однако до сих пор не существует единого мнения о закономерностях изменений архитектуры ядра при функционально различных его состояниях и принципах реорганизации хроматина при переходе ядра из одного функционального состояния в другое. Несмотря на то, что существование хромосомных территорий (ХТ), как самостоятельных структурных единиц интерфазного ядра, было доказано в 1980 г.[4], до сих пор остаётся неизвестным, каким образом формируется и поддерживается уникальное для разных типов клеток высших эукариот взаимное расположение хромосомных территорий и какие причинно-следственные связи существуют между особенностями строения ХТ и активностью генов в соответствующих хромосомах. Особый интерес представляет изучение стволовых клеток, например, мезенхимных стволовых клеток человека (МСК). МСК широко используются в клинических исследованиях при разработке методов клеточной терапии распространённых заболеваний. МСК являются интересной моделью изучения роли строения ядра в процессах дифференцировки. Целью настоящей работы является изучение строения ядер МСК на примере анализа расположения отдельных аутосом в клетках на ранних и поздних пассажах культивирования МСК.

Материал и методы

Получение клеток.

МСК из жировой ткани и костного мозга выделяли и культивировали согласно описанному ранее [1; 3] – выделенные мононуклеарные клетки культивировали в полной ростовой среде (DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), 10% FBS (Perbio HyClone, США), гепарин 8 Ед/мл (ПанЭко, Россия), L-глутамин 2мМ (ПанЭко, Россия), FGF-b 10нг/мл (ПанЭко, Россия), пенициллин/стрептомицин (ПанЭко, Россия)) при температуре 37^0C и CO_2 5%. Через 24-48 ч неприлипшие клетки удаляли со сменой среды и далее среду меняли каждые 3-4 дня. МСК из жировой ткани были любезно предоставлены ГУЗ г. Москвы «Банк стволовых клеток департамента здравоохранения г. Москвы», а также получены самостоятельно. МСК из костного мозга были любезно предоставлены ЗАО «РеМеТэкс». От пациентов получены письменные добровольные согласия.

Проведение FISH-анализа.

Для проведения FISH-анализа клетки отмывали от среды в DPBS (Панэко, Россия) и фиксировали ледяным метанолом. Денатурацию, гибридизацию и отмыв проводили по стандартному протоколу Vysis (США). Для проведения FISH-анализа интерфазных ядер использовали цетромерные зонды фирмы Vysis, Inc. на хромосомы 6, 8, 11, 18. Для окраски ядер использовали DAPI. Препараты анализировали под микроскопом AxioImager с комплектом интерференционных фильтров (Zeiss, Германия) с помощью программного обеспечения FISH-анализа (Fish View System, Applied Spectral Imaging).

Результаты

Проанализировано 9 различных культур МСК на разных пассажах (табл. 1). Пассажи до 4 включительно отнесены к ранним, а пассажи, начиная с 8 – к поздним. Для анализа выбрали хромосому 18, как одну из наиболее часто изучаемых в подобных исследованиях – бедную генами хромосому, расположенную обычно на периферии ядра; хромосому 6, как несущую ряд генов, связанных с недифференцированным статусом стволовых клеток, а также генов, задействованных в характерных для МСК путях дифференцировки – остео- и адипогенном.

Таблица 1. Характеристики проанализированных культур.

№ культуры	Пассаж	Источник	Проанализированные хромосомы	
			6	18
MSC-1	Ранний	КМ	+	+
MSC-2	Ранний	КМ	+	
MSC-3	Ранний	КМ	+	
MSC-3	Поздний	КМ	+	
MSC-4	Поздний	КМ	+	
MSC-5	Ранний	ЖТ	+	
MSC-6	Ранний	ЖТ	+	+
MSC-7	6	ЖТ	+	+
MSC-7	Поздний	ЖТ	+	+
MSC-8	6	ЖТ	+	+
MSC-9	6	ЖТ	+	+

КМ- костный мозг; ЖТ – жировая ткань.

Размеры ядер.

Ранее мы показали, что в культуре МСК из жировой ткани клетки гетерогенны по размерам ядер [2], поэтому в данной работе при проведении FISH-анализа оценивали также площадь ядер. Действительно, клетки оказались гетерогенными по размерам ядер. Разброс значений отличался значительной величиной – минимальные значения отличались от максимальных в несколько раз (табл. 2). Распределение размеров ядер отклонялось от нормального - около 16% ядер были значительного размера, что определяло появление правого «хвоста» у распределения. В дальнейшем при анализе радиальных расстояний учитывали размер анализируемых ядер.

Таблица 2. Размеры ядер в культивируемых МСК.

№ культуры	n	Медиана, пиксель	Минимальное значение, пиксель	Максимальное значение, пиксель
MSC-6 P	39	32016	17579	53877
MSC-7 6	19	27089	7384	59598
MSC-7 П	32	32913	18315	61637
MSC-8 6	78	74872	11408	212968
MSC-9 6	63	39403	23909	71154

P – ранний пассаж; П – поздний пассаж.

В каждой культуре наблюдалось большинство клеток с ядрами среднего размера и примерно 20% клеток – с ядрами маленького и большого размера.

Радиальные положения хромосом.

Для оценки и сравнения расположения хромосом в интерфазном ядре используют безразмерную относительную величину – радиальное расстояние. Радиальное расстояние представляет собой отношение расстояния от центра ядра до FISH-сигнала к расстоянию от центра до края ядра, отмеренному по радиусу, проходящему через изучаемый сигнал зонда. Радиальные расстояния в изученных культурах не отличались между культурами. Медианы радиальных расстояний центромер 6 и 18 составили 0,68 и 0,48, соответственно. При сравнении в одной и той же культуре и в целом по всем культурам центромера 18 лежала на меньшем расстоянии, чем центромера 6 ($p<0,001$, критерий Колмогорова-Смирнова) (табл. 3). Различия положения центромер в зависимости от размера ядра выявлены не были. При

сравнении культур на ранних и поздних пассажах было обнаружено, что в клетках на поздних пассажах хромосома 6 находится дистальнее (0,66 на ранних и 0,72 на поздних p=0,042; критерий Манна-Уитни). Хромосома 6 была выбрана для анализа, так как на ней находятся гены, определяющие недифференцированное стволовое состояние МСК, например, *OCT4,* экспрессия которого характерна для МСК [6], а также связанные с типичными направлениями дифференцировки МСК в адипо- и остеогеном направлениях: *BMP6, HDAC2, RUNX2*. Поэтому обнаруженное различие в положении хромосомы 6 может отражать процессы старения и/или спонтанной дифференцировки в культуре.

Радиальные положения гомологов. Во всех проанализированных культурах было отмечено ярко выраженное различное положение гомологичных хромосом (табл. 3). Различия в положении гомологов часто объясняются их разной активностью. Известно, что такое расположение нарушается за счёт сближения гомологов в нейронах головного мозга при некоторых психических заболеваниях [5].

Таблица 3. Медианы радиальных расстояний центромер хромосом 6, 8, 11 и 18.

	Хромосомы и гомологи				Хромосомы	
Номер кульутры	6пр	6д	18пр	18д	6	18
MSC-1 P	0,57	0,67	0,43	0,73	0,64	0,52
MSC-2 P	0,44	0,79			0,61	
MSC-3 P	0,64	0,88			0,72	
MSC-3 П	0,58	0,84			0,71	
MSC-4 П	0,62	0,82			0,72	
MSC-5 P	0,59	0,79			0,74	
MSC-6 P	0,58	0,64	0,40	0,60	0,59	0,48
MSC-7 6	0,53	0,78	0,46	0,67	0,67	0,53
MSC-7 П	0,61	0,87	0,34	0,60	0,73	0,43
MSC-7 П	0,55	0,76	0,41	0,62	0,69	0,51
MSC-8 6	0,55	0,76	0,38	0,66	0,65	0,46
MSC-9 6	0,54	0,73	0,36	0,61	0,64	0,47

P – ранний пассаж, П – поздний пассаж; пр – проксимальный гомолог данной пары, д – дистальный гомолог данной пары. Серым отмечены пары значений, уровень значимости различий в которых составил менее 0,025.

Выводы

Показано, что центромеры хромосомы 6 находятся на большем (0,68), а хромосомы 18 на меньшем (0,48) радиальном расстоянии. МСК из жировой ткани и костного мозга не отличаются друг от друга по изученным параметрам. Наблюдается разница в положении центромер гомологов каждой хромосомы. При длительном культивировании (более 8 пассажей) происходит изменение строения ядра, что отражается в дистальном смещении центромеры хромосомы 6, и может свидетельствовать о старении или спонтанной дифференцировке клеток.

Дальнейшее изучение архитектуры хроматина интерфазных ядер в культуре МСК при культивировании и дифференцировке позволит выявить особенности положения хромосомных территорий в стволовых и дифференцированных клетках, а также приблизиться к пониманию механизмов эпигенетической регуляции активности генома и поддержания стволовых свойств с помощью ремоделирования объёмной структуры хроматина.

Список литературы

1. **Бочков Н.П., Воронина Е.С., Катосова Л.Д., Никитина В.А.** Цитогенетическое исследование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека в процессе культивирования. Медицинская генетика. 2009, 8, 12, 90: 3-6.

2. **Лавров А.В., Смирнихина С.А.** Гетерогенность ядер и пролиферативный потенциал МСК-подобных клеток в культуре стромально-васкулярной фракции жировой ткани. Цитология. 2010, 52, 8: 616-620.

3. **Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К.** Стромальные клетки костного мозга и кроветворное микроокружение. Архив патологии. 1982, 10: 3-11.

4. **Cremer C., Cremer T., Fukuda M., Nakanishi K.** Detection of laser--UV microirradiation-induced DNA photolesions by immunofluorescent staining. Hum. Genet. 1980, 54, 1: 107-110.

5. **Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B.** Genomic Landscape of the Alzheimer's Disease Brain: Chromosome Instability - Aneuploidy, but Not Tetraploidy - Mediates Neurodegeneration. Neurodegener Dis. 2011, 8, 1-2: 35-37.

6. **Tai M.H., Chang C.C., Kiupel M., Webster J.D., Olson L.K., Trosko J.E.** Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. Carcinogenesis. 2005, 26, 2: 495-502.

ВОЗМОЖНОСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КОРОТКИМИ ТАНДЕМНЫМИ ПОВТОРАМИ

А.Ю. Маркарян, А.А.Бахарев, П.В. Устьянцев

ФГУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора, Екатеринбург,

Virus@etel.ru

Представлены результаты, полученные при анализе культур человеческого происхождения банка-музея Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций (ЕНИИВИ). Использовали методику полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением моноплексов тетрамерных STR-локусов человека. Первичный анализ показал отсутствие кросс-контаминации исследованых культур, позволил уточнить генетические характеристики некоторых из них, выявить генетические различия в отдельных клонах. В результате работы установлено частичное совпадение длин амплифицированных фрагментов STR-локусов человека и культивируемых клеток африканской зеленой мартышки (линия Vero). Предполагается наличие гомологичных фрагментов геномов.

Ключевые слова: клеточные культуры, ПЦР, STR-локусы.

Вопросы стандартизации клеточных культур, используемых в вирусологии и биотехнологии, являются неотъемлемой частью исследований, связанных с их качественными характеристиками. Широкое применение культур клеток в экспериментальной, диагностической, производственной работе и прикладных исследованиях подразумевает длительное серийное пассирование, при котором клеточные культуры проявляют тенденцию к непрерывному изменению основных характеристик, обусловленному контаминацией различными агентами, приводящей к изменению кариотипа и генотипа, что требует ведения постоянного контроля и анализа.

Наряду с применением клеточных культур как модельных систем, широкое прикладное значение в последнее время они приобрели, в частности, в заместительной клеточной терапии, где диплоидные клетки выступают производителями и носителями стимуляторов роста - цитокинов, способствующих регенерации тканей у пациентов при лечении ожогов, пародонта, заживлении ран и т.д. [1].

Точная идентификация клеточных линий необходима для своевременного выявления

контаминации, связанной со случайным занесением материала от других культур. Так, в частности, исследование депозитария банка клеточных культур Германии выявило, что 18 % из 252-х заложенных "новых" линий оказались кросс-контаминированными [2].

Детекцию контаминации клеточных культур проводят с помощью изоферментного анализа, HLA-типирования, кариотипирования, а также анализа полиморфизма на уровне ДНК. Открытие гипервариабельных регионов ДНК привело к концепции ДНК-дактилоскопии или фингерпринту - достаточно точному и качественному методу оценки генома, основными недостатками которого являются трудоемкость и высокая стоимость [3,4]. Новая тенденция использования локус-специфических последовательностей, так называемых STR (Short Tandem Repeats)-локусов, расширяет возможности использования их в качестве маркеров для стандартизации и при мониторинге клеточных культур на предмет контаминации и/или обнаружения изменения генотипа.

Следовало бы отметить, что данные STR-маркеры нашли в настоящее время применение в судебной медицине, в филогенетической реконструкции последовательностей, а также ранней диагностике химеризма при трансплантации органов, аллогенных клеток костного мозга [5]. Высокая информативность STR-локусов выражается аллельными частотами, распределением последних и уровнем гетерозиготности (табл. 1).

Таблица 1. Краткая характеристика STR-локусов

Наименование локуса	Хромосомная локализация	Число аллелей	Диапазон аллелей п.н.	Уровень гетеро-зиготности, %
VWA	12p-12p ter	18 (10-25)	123-171	52,2
THO1	11p-15,5	9 (3-14)	156-195	72,1

Последние качества дают возможность не просто проводить идентификацию личности, но также разрабатывать маркеры различных этнических групп. Данные выдающиеся факты не остались без внимания, и исследователи ряда ведущих институтов выступили с предложением использовать определенный набор локусов для стандартизации клеточных культур, основной ряд которых представлен тетраповторами и содержит 7 локусов [2].

Материал и методы

В наших исследованиях применялся метод амплификации локусов посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием моноплексов, что сделало метод относительно независимым от дорогостоящего оборудования и комплектующих и достаточно доступным для любой лаборатории, обладающей минимальным набором молекулярно-биологического оборудования (табл. 2).

Таблица 2. Перечень праймеров STR-локусов, применяемых в эксперименте

№ №	Локус	Длина повтора	Диапазон аллелей п.н.
1	VWA	4	123-171
2	THO1	4	156-195
3	D5S818	4	119-155
4	D3S1358	4	105-156
5	D19S433	4	104-144
6	D7S820	4	209-249
7	D11S554	4	-
8	F13AO1	4	278-330

Температурный режим амплификации составил: 35 циклов – T^0 денатурации 94^0C – 40 сек., T^0 отжига – 60^0C – 40 сек., T^0 элонгации 74^0C – 60 сек., заключительный синтез 74^0C – 15 минут. Последующий анализ длин амплифицированных фрагментов проводился в полиакриламидном геле (23 см), в качестве леддера (маркера) использовался набор синтезированных фрагментов ДНК шагом в 100 пар и 50 пар нуклеотидов (п.н.). Концентрация геля составляла 10-12% в зависимости от длин фрагментов, напряжение подавалось не более 8V/см. В последующем проводилось окрашивание геля бромистым этидием и экспозицией на ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

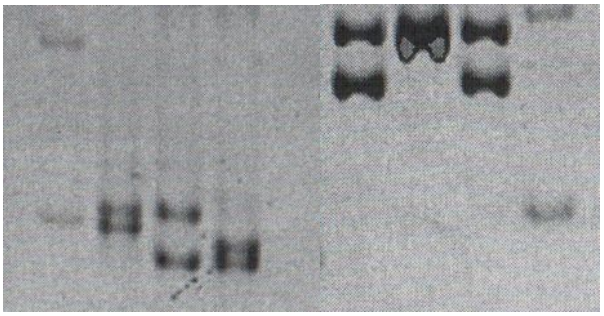
Анализировали диплоидные клеточные культуры ЛЭЧ-3 (легкие эмбриона человека), а также перевиваемые - HeLa (карцинома шейки матки), HEp2 (карцинома гортани), Vero (почка

африканской зеленой мартышки) из Коллекции банка-музея клеточных культур ЕНИИВИ. Анализируемые клетки культивировали и готовили к анализу по методике, приложенной производителем к тест-системе на основе методических рекомендаций по проведению работ в диагностических лабораториях МУ 1.3.1888-04, утвержденных Минздравом РФ от 04.03.2004 г.

Результаты

Для испытания праймеров и собственно системы был проведен пробный анализ идентификации родственных связей (рис. 1). Показана электрофореграмма, подтверждающая оптимальность режима амплификации и работы праймеров.

Рис.1 Генотипирование VWA и THO1 на предмет родства.



м 1 2 3 1 2 3 м

Примечание: 1-я дорожка – отец, 2-я дорожка – дочь, 3-я дорожка – мать.

Праймеры прошли, также, испытание на амлификацию ДНК собаки, КРС и кур с полностью отрицательными результатами, что подтвердило видоспецифичность системы.

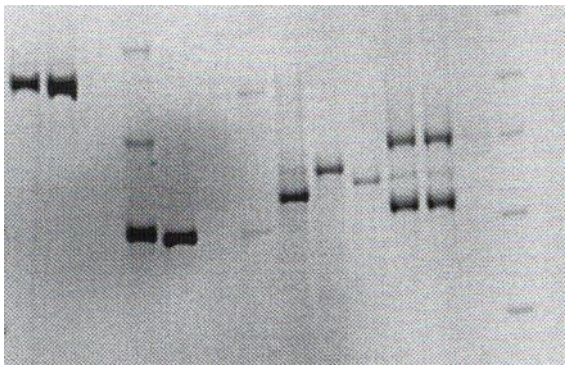
На последующих этапах проводили анализ наиболее часто используемых и востребованных культур, таких как ЛЭЧ-3, HeLa, HEp 2.

Как и следовало ожидать, высокой стабильностью отличались диплоидные клетки. Независимо от длительности пассирования не отмечено каких-либо изменений в фрагментарном спектре, указывающих на контаминацию в процессе пассирования. Практически аналогичную картину наблюдали и при исследовании перевиваемых культур.

Исключение составил трофовариант культуры HeLa клон 72, зарекомендовавший себя стабильной культурой. В клоне HeLa 72 была обнаружена делеция длиной 36 п.н. по локусу D7S820 (7-я хромосома), что является на данном этапе свидетельством внутрилинейной полиморфности культуры HeLa и может служить генетическим маркером данного

трофоварианта (рис. 2). Происхождение делеции можно объяснить мутацией исходной клетки клона.

Рис. 2. STR-анализ амплификатов клеток HeLa первичного и клона 72.



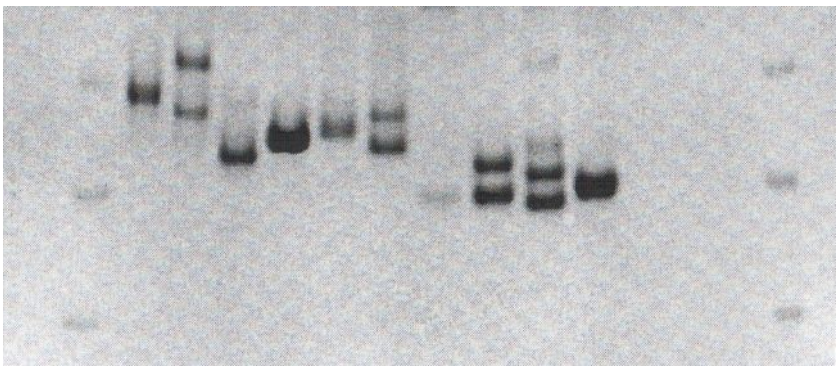
1 2 3 4 м 5 6 7 8 м

F13AO1 D19S433 D7S820 D11S554

Примечание: 1, 3, 5, 7 дорожки – HeLa 72 (5-я дорожка содержит делецию).

Неожиданные результаты получены при анализе клеток линии Vero (почка африканской зеленой мартышки), в которой сработало пять пар праймеров человека (рис. 3).

Рис. 3. Сравнительный STR-анализ амплификатов клеточных культур Vero, ЛЭЧ- 3, HEp-2.



М 1 2 3 4 5 6 м 7 8 9 м

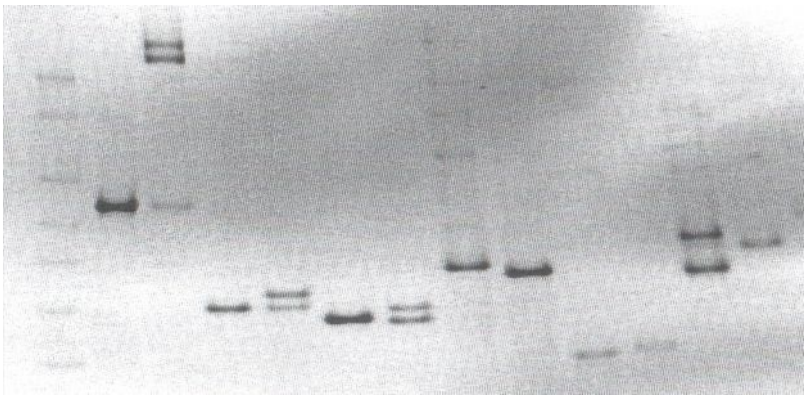
D11S554 D7S820 D19S433

Примечание: 1, 4, 7 дорожки – Vero; 2, 5, 8 дорожки – ЛЭЧ; 3, 6, 9 дорожки – HEp-2.

Сравнительный анализ предполагаемой контаминации линии Vero клетками HeLa не дал положительного результата (рис. 4). Таким образом, хотя и не подтверждена гипотеза о контаминации данной линии клетками HeLa, сделать однозначный вывод о причинах

указанного явления пока нельзя. Возможные объяснения: контаминация другой культурой человеческого происхождения или наличие идентичных человеческим STR- локусов в ДНК клеток мартышки. Присутствие аналогичных локусов амплифицированных фрагментов в других культурах не человеческого (приматы?) происхождения будет указывать на контаминацию клетками человека. Для уточнения ответа на данный вопрос нужны дополнительные экперименты.

Рис. 4. Сравнительный STR-анализ амплификатов клеточных культур Hela и Vero.



м 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

F13AO1 D19S433 D7S820 D11S554 D5S818 THO1

Примечание: 1, 3, 5, 7, 9, 11 дорожки – HeLa; 2, 4, 6, 8, 10, 12 дорожки – Vero.

Таким образом, уже первичный анализ клеточных культур с помощью метода генотипирования короткими тандемными повторами выявил факты, указывающие на необходимость использования данного метода для паспортизации клеточных культур и ведения постоянного их мониторинга. Следующим этапом работы будет проведение исследований по точной идентификации и стандартизации клеточных культур Коллекции банка-музея ЕНИИВИ, используемых в разработке иммунобиологических препаратов, в вирусологии и биотехнологии.

Список литературы

1. **Федоров В.Д., Саркисов Д.С., Туманов В.П.** Методические рекомендации «Метод хирургического лечения ожогов у детей с использованием культивированных аллофибробластов человека». Москва, 1997, 15 с.
2. **Jogn R. Masters, Jim A. Thomson, Bernadette Daly-Burns, Yvonne A. Reid, Wilhem G. Dirks, Phil Packer, Lloraine H. Toji, Tadao Ohno, Hideyuki Tanabe, Colin F. Alrett, Lloyd R. Kelland, Maureen Harrison, Arvind Virmani, Timoty H. Ward, Karen L. Ayres, and Paul**

G. Debenham. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. PNAS 2001, 98,14: 8012-8017.
3. **Alec J. Jeffreys., V Wilson., S.L. Thein.** Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. Nature. 1985, 314: 67-73.
4. **Alec J. Jeffreys., V. Wilson., S.L. Thein.** Individual-specific “fingerprints” of human DNA. Nature, 1985, 316: 76-79.
5. **Sellathamby S, Balasubramanian P., Sivalingan S., Shaji RV., Mathews V., George B., Viswabandya A., Srivastava A., Chandy M.** Post-Transplant Events Developing an algorithm of informative markers for evaluation of chimerism after allogenic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantation. 2006, 37: 751-755.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКОПЛАЗМ И ВИРУСА БЫЧЬЕЙ ДИАРЕИ В КОЛЛЕКЦИОННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

Р.Я. Подчерняева, Л.В.Урываев, А.В. Дедова, Л.В. Дедова, К.С. Ионова, Г.Р. Михайлова, Н.А.Парасюк, О.М. Гринкевич, Т.К. Селиванова, Т.В. Гребенникова, А.Д. Петрачев, М.Н. Щетвин,

ФГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России, Москва,

cells@rambler.ru

В работе представлены данные по определению токсичности эмбриональных телячьих сывороток разных фирм. Контаминацию культур клеток микоплазмой определяли с помощью антибиотика оливомицина и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Контаминацию 83 коллекционных клеточных линий вирусом бычьей диареи определяли с помощью ПЦР. Показано, что 30% исследованных линий содержат этот вирус.

Ключевые слова: культуры клеток, токсичность бычьих сывороток, контаминация, микоплазма, вирус бычьей диареи.

На базе Лаборатории культур тканей Института вирусологии им. Д.И. Ивановского находится созданная в 1957 г. Коллекция клеточных культур, которая насчитывает более 150 линий клеток человека и животных. Все линии охарактеризованы в соответствии с требованиями международной коллекции АТСС и включены в Каталог Всесоюзной Коллекции клеточных культур (1991 г.) и Европейский Каталог клеточных линий человека и животных

(1993 г.).На протяжении всего периода функционирования лаборатории постоянным разделом работы является индикация (с помощью оливомицинового метода, а впоследствии метода ПЦР) микоплазм в клеточных линиях (1-3), а также их деконтаминация различными препаратами (4, 7-10).

Так как в последние годы серьезной проблемой является отсутствие стандартных нетоксичных и неконтаминированных эмбриональных телячьих сывороток, выпускаемых различными фирмами, регулярно проводится проверка их на токсичность и на наличие микоплазм и вируса бычьей диареи (ВД).

Учитывая, что вирусные заболевания крупного рогатого скота (КРС) широко распространены во всем мире, в том числе и в России (8-14), внимание вирусологов привлечено к изучению наиболее часто встречающихся возбудителей вирусной диареи – болезни слизистых КРС. Вирус бычьей диареи (ВД) является представителем рода Pestivirus семейства Flaviviridae. Известные к настоящему времени изоляты ВД КРС подразделяются по своему воздействию на культуры клеток на нецитопатогенные (не сопровождаются видимыми морфологическими изменениями клеток) и цитопатогенные, вызывающие быстрое развитие цитопатического действия (ЦПД) и гибель клеток путем апоптоза (9). В последние годы ВД обнаруживается не только в нативных сыворотках КРС, но и в клеточных линиях, для культивирования которых необходимо применение сывороток. Исходя из этого, задачей данной работы было определение токсичности коммерческих эмбриональных телячьих сывороток (ЭТС) и проверка их на наличие ВД, а также обнаружение ВД и микоплазм в различных культурах клеток.

Материал и методы

Изучено 83 клеточных линии Коллекции культур тканей Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, представленные в таблице в разделе «Результаты и обсуждение». Культивирование клеток проводили на стандартных питательных средах (199, Игла, Игла МЕМ, ДМЕМ в зависимости от типа клеток) производства Московского института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН с 10% эмбриональной телячьей сыворотки от разных производителей. Антибиотики при культивировании клеток не использовались.

Определение токсичности сывороток проводили на наиболее чувствительной диплоидной клеточной линии легкого эмбриона человека (ЛЭЧ). Для этого на монослой клеток в пластиковом матрасе (25 см^2 фирмы Costar) наносили 5 мл нативной сыворотки и матрас

помещали в термостат при 37^{0}С на 24–72 ч. Ежедневно клетки просматривали под инвертированным микроскопом (ок.10хоб.20). О токсичности сыворотки судили по наличию в клетках дегенеративных изменений.

Определение микоплазм в клетках проводили с помощью отечественного препарата оливомицина. Для этого клеточные культуры выращивали на покровных стеклах в пенициллиновых флаконах и фиксировали через 2-3 суток роста в охлажденном до 4^{0}С 70%-ном этиловом спирте в течение 1 часа. Рабочий раствор оливомицина наносили на препарат и помещали в темную камеру на 1,5-2 ч. После промывки в дистиллированной воде покровные стекла с культурой монтировали на предметных стеклах в глицерине с дистиллированной водой (1:1) и просматривали под люминисцентным микроскопом с использованием фильтров: ФС 1-4, СС 15-7, БС-82.

Выделение ДНК из клеток, проведение ПЦР и анализ продуктов реакции для выявления микоплазм.

Суммарную ДНК выделяли из монослоя клеток, обработанных раствором версена с добавлением химотрипсина для отслоения клеток от подложки. Клетки центрифугировали при 4^{0}С в течение 10 минут и 1,5 об/мин, суспендировали в 200 мкл 0,14 М NaCl и добавляли 600 мкл лизирующего буфера из набора «Ветбиохим, Россия»». Далее - по методике производителя. Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР с целью обнаружения микоплазмы в культуре клеток с помощью универсальных праймеров GPOI (ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA), GPO3 (GGAGCAAATAGGATTAGATACCCT), MGSO (TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC), Uni (TAATCCTGTTTGCTCCCCAC).

ПЦР проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл ДНК; 10 пмоль каждого праймера, 0.25 mM каждого dNTP, 2,5 ед. Tag-полимеразы, х10 ПЦР буфер. Программа амплификации была следующая: (94^0 С - 1 минута) 1 цикл; (94^0 С - 30 сек, 55^0 С - 25 сек., 72^0 С - 30 сек.) - 30 циклов. Результы ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза, используя Tris-ацетатный буфер, содержащий этидиумбромид в концентрации 0,4-0,5 мкг/мл. Гели анализировали под трансиллюминатором с УФ светом. Величина фрагментов ПЦР в случае использования пары праймеров GP03/ MGSO составляла 288 п.н.; для праймеров GPOI/ Uni - 472 п.н; 724 п.н. для пары праймеров GPOI/MGSO.

Выделение РНК из клеток, проведение ОТ-ПЦР и анализ продуктов реакции для выявления генома вируса бычьей диареи.

Суммарную РНК выделяли из монослоя клеток с использованием неорганического носителя и набора «Тест-система для обнаружения вируса диареи (ВД) крупного рогатого скота методом ПЦР» («Ветбиохим», Россия) по методике производителя. Для выявления генома ВД КРС использовалась та же тест-система. Анализ проводили с помощью метода «nested» ПЦР.

ОТ-ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл РНК, 10 пмоль каждого праймера для ПЦР-1, 0.25 mM каждого dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы, 1,25 ед. ревертазы (M-MuLV Revers), 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM $MgCl_2$. Использовали следующие параметры ПЦР: (50°C - 50 минут, 94°C - 5 минут) - 1 цикл, (94°C - 20 секунд, 55°C - 20 секунд, 72°C - 20 секунд)- 30 циклов, (94°C - 20 секунд, 55°C - 20 секунд, 72°C - 5 минут) - 1 цикл. После ОТ-ПЦР проводили второй раунд амплификации.

ПЦР-II проводили в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл продукта реакции ОТ-ПЦР, 10 пмоль каждого праймера для ПЦР-II, 0.25 mM каждого dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM $MgCl_2$. Использовали следующие параметры ПЦР: (94°C - 20 секунд, 55°C - 20 секунд, 72°C - 20 секунд)- 30 циклов, (94°C - 20 секунд, 55°C - 20 секунд, 72°C - 5 минут) - 1 цикл.

Результаты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле (2%), используя Трис-ацетатный буфер, содержащий бромистый этидий в концентрации 0,4-0,5 мкг/мл. Гели анализировали, используя трансиллюминатор (длина волны 254 нм). Размер фрагментов ПЦР после проведения анализа составлял 264 п.н.

Результаты и обсуждение

Все поступающие в лабораторию коммерческие эмбриональные телячьи сыворотки (ЭТС) проверяются в первую очередь на их токсичность для диплоидной клеточной линии легкого эмбриона человека (ЛЭЧ), затем на контаминацию микоплазмой и вирусом бычьей диареи.

Для культивирования клеток применяются нетоксичные ЭТС, когда морфология клеток ЛЭЧ в матрасе при добавлении сыворотки остается неизменной после 24 ч инкубации в термостате при 37 ^{0} С также, как и в контрольном матрасе. В том случае, если сыворотка обладает токсичностью, то уже спустя 24 ч наблюдается полная дегенерация клеток. Такая сыворотка не пригодна для культивирования коллекционных клеток. К сожалению, большинство коммерческих сывороток являются либо токсичными (дегенерация клеток через 24 ч), либо слаботоксичными, когда изменение морфологии наблюдается через 48 или 72 ч.

Индикация микоплазм в клеточных культурах с помощью антибиотика оливомицина определяется визуально. Микоплазма под люминесцентным микроскопом обычно выглядит в виде отдельных гранул, окрашенных в желто-зеленый цвет, расположенных вдоль границ цитоплазмы и в межклеточном пространстве.

В случае наличия микоплазм мы проводили определение их видовой принадлежности, используя метод ПЦР. Были протестированы следующие клеточные линии: ФЭЧ, ЭПНТ, HeLa, Caco-2, МДСК, CH5, Lunet, Mpf, Vero E6, ЛЭЧ, PLC, L929 на наличие микоплазм Hominis и Laidlawii, используя готовую тест-систему «ЛТПФ ДНК-технология». В изученных линиях клеток оба вида микоплазм не были обнаружены.

С помощью метода ПЦР выявлено наличие ВД в различных коммерческих ЭТС, полученных из разных фирм (ПанЭко – катал. №35422 и 35205, ООО «Биолот» - Б-04-35, Gibco -41G9872K, Biowest – So471651810, Hy Clone – 35422, ASF29574, ASF29773, Amimed – 70050, Sigma -057K3396). В сыворотке ЭТС (ПанЭко) ВД обнаруживался как до, так и после прогревания в водяной бане при 56 ^{0} С в течение 30 и 60 мин.

В таблице представлены результаты определения ВД с помощью ПЦР в 83 клеточных линиях человека и животных. Из таблицы видно, что все диплоидные клетки человека не содержат ВД, а у 62% исследованных лимфобластоидных линий клеток человека этот вирус был обнаружен. Из 26 различных перевиваемых клеток человека наличие ВД выявлено в 7 видах культур. ВД был обнаружен у всех линий клеток КРС, у 50% клеточных линий обезьян, в 2-х из 4-х закладок клеток почек свиньи, в 1-ой из 9 клеточных линий мышей, в 2-х из 3-х закладок клеток кролика, в 2-х линиях клеток кошек, в 1 линии клеток почки овцы и в 2 из 7 различных закладках клеток почки собаки (МДСК). В таблице приведены линии клеток МДСК, заложенные в жидкий азот в различные годы (с 2000 по 2009 г.г.). В клетках 2000 г. и в более поздних закладках (в 2008 и 2009 г.г) ВД не обнаружен, однако в закладке 2003 г. выявлено наличие этого вируса. Возможно, что при культивировании этих клеток применялась сыворотка, содержащая ВД. Выявлено также, что клеточные линии хомячка, крыс, клетки мозга хорька и клетки кур не содержат ВД.

Таким образом, из 83 изученных линий приблизительно в 30% из них обнаружено наличие ВД. Зависимости наличия в клетках ВД с цитотоксическим действием этого вируса нами не было выявлено.

Аналогичные результаты были получены при анализе 41 клеточной линии Американской коллекции клеточных культур (14), когда в 13 разных линиях (тоже в 30%) была обнаружена

контаминация ВД. Так, вирус диареи был обнаружен у всех 10 проверенных линий клеток коров, у 1 из 7 клеточных линий кролика, у 1 из 5 линий кошек и у 1 линии клеток козы. Культуры клеток барана, свиньи, хомячка, собаки, обезьяны и человека не были контаминированы ВД.

Известно, что присутствие в клетках микоплазмы и ВД приводит к снижению чувствительности к репродукции в них вирусов, а это важно не только для проведения научных исследований, но и для получения антигенов, используемых для приготовления любых медико-биологических препаратов.

Таблица. Определение вируса бычьей диареи в клеточных культурах

Наименование	Обозначение	Орган выделения	Время закладки	Определение ВД
Диплоидные клетки человека	ЛЭЧ	Легкое эмбриона	9.07.82г	-
	ЛЭЧ	Легкое эмбриона	11.08.08г	-
	ФЭЧ	Фибробласты эмбриона	11.02.08г	-
	M_7	Кожно-мышечная ткань	15.10.07г	-
Перевиваемые клетки человека не контаминированные клетками HeLa	A-549	Карцинома легкого	29.09.09 г	-
	GL-6	глиобластома	11.04.05 г	-
	T-24	Опухоль мочевого пузыря	18.08.08 г	-
	HT29	Карцинома толстой кишки	31.05.77 г	-
	HT29		27.07.09 г	-
	CaCo	Карцинома кишечника	28.12.09 г	+
	GM-639	Фибробласты больного галактоземией	21.12.09 г	-
	L_{41}	Костный мозг больного лейкемией	3.03.08 г	-
Перевиваемые клетки человека HeLa и HeLa подобные	HeLa	Карцинома шейки матки	28.01.93 г	-
	HeLa	-«-	30.11.07 г	-
	HeLa лхм	-«-	30.06.80 г	-
	Hep-2	Карцинома гортани	27.10.97 г	-
	Hep-2	-«-	12.05.09 г	-
	RH	Почка эмбриона	23.05.80 г	
	Chang conjunctiva	конъюнктива	10.11.09 г	-

	Chang liver	Печень	22.06.09 г	-
	Huh-7	Гепатома	23.11.09 г	+
	Huh-7	-«-	20.01.10 г	-
Лимфобластоидные клетки человека	Raji	Лимфома Беркита	9.06.77 г	-
	Namalva	-«-	20.04.82 г	+
	Daudi	-«-	26.02.07 г	_
	P3H3(R-1)	-«-	6.05.81 г	+
	P3H3	-«-	20.12.83 г	+
	L_{101}	Лейкоциты крови больного лейкозом	30.03.77 г	+
	T_{1387}	Т-лейкоциты костного мозга	4.12.06 г	+
	Molt-4	Т-лейкоциты больного лейкемией	26.06.06 г	-
Клетки обезьян	BGM	Почка зеленой мартышки	9.02.05 г	+
	CV1	-«-	28.12.77 г	-
	Vero	-«-	27.09.04 г	-
	Vero E6	-«-	27.07.09 г.	+
	Vero(B)	-«-	-«-	-
	4647	-«-	28.04.05 г	+
	GMK	-«-	15.05.78 г	+
	BSC-1	-«-	7.11.05 г	
	MA-104	Почка макаки резус	25.12.92 г	+
	LLC-MK-2	-«-	15.12.08 г	-
	Frhk-4/R	-«-	22.03.04 г	+
Клетки крупного рогатого скота	МДВК	Почка КРС	31.01.05 г	+
	PT-80	Почка телят	17.06.83 г	+
	ПЭК	Почка эмбриона коровы	10.12.07 г	+
	ТЭБ	Тестикулы эмбриона быка	19.06.92 г	+
Клетки собаки	МДСК	Почка	14.05.01	+
	МДСК	-»-	20.10.03	+
	МДСК	-»-	07.04.09	-
	МДСК	-»-	28.12.09	-
	МДСК	-»-	14.12.00	-
	МДСК	-»-	04.02.08	-
	МДСК	-»-	29.01.07	±

Клетки свиньи	PS	Почка свиньи (Чехословакия)	29.06.77 г	-
	СПЭВ	Почка эмбриона (Россия)	26.05.94 г	+
	СПЭВ	Почка –«-	07.04.08г	+
	ППЭС	Почка –«-	11.04.05 г	_
Клетки крыс	НГУК-1	Невринома Гассерова узла	04.02.08 г	-
	ХС	Саркома	27.05.77 г	-
	NWERC	Эмбриональные опухоли крыс Wistar трансформированные вирусом саркомы Рауса	21.03.77 г	-
	NRK	почка	26.06.79 г	-
Клетки мышей	L_{929}	фибробласты	13.09.93 г	-
	L_{929}	-«-	21.07.08 г	-
	3T3 BALB/C	Фибробласты эмбриона	18.02.93 г	-
	SC-1	-«-	21.07.77г	-
	Lsv 5	-«-	20.04.77г	-
	Ltk	-«-	29.12.76 г	+
	ЭПНТ-5	глиобластома	2.06.08 г	-
	Y-1	Опухоль коры надпочечника	3.07.80 г	-
	Tb1Lu (NBL-12)	Легкое летучей мыши	10.05.77 г	-
Клетки хомячка	ВНК-21	Почка новорож-денного сирийского хомячка	10.10.05 г	-
	НАК	Почка сирийского хомячка	2.12.96 г	-
	ХТК-2	Кожно-мышечная ткань сирийского хомячка	25.03.81 г	-
	ВНК-BS	Почка сирийского хомячка с парамиксовирусом	29.10.79 г	-
	Cer	Гибрид хомячок/курица	9.02.81 г	-
	CHO-K1	Яичник китайского хомячка	06.11.06 г	-
Клетки кролика	RK	почка	25.09.06г	+
	RK82	почка	19.10.84 г	+
	RS537	Фибробласты кожи	23.12.76 г	-
Клетки кошки	CREK	почка	20.03.06 г	+
	CC-81	почка	26.12.05 г	+
Клетки овцы	FLK	почка	2.04.07 г	+

Клетки хорька	Mpf	мозга	5.12.05 г	-
Клетки кур	LOC	Лимфома яичника	3.09.07г	-
Итого: 83, положительных 26 (т.е. 30%)				

Список литературы

1. **Михайлова Г.Р., Бердникова З.Е.** Использование ДНК-специфического флюорохрома оливомицина для работы с клеточными культурами. Цитология и генетика. 1991, 5:15-20.
2. **Михайлова Г.Р., Хижнякова Т. М., Подчерняева Р.Я., Грикевич О.М.** Использование фторхинолонов для элиминации микоплазм в клеточных культурах. Тез. Всероссийской научно-практической конференции «Медицинская микробиология – XXI век» Саратов. 2004, 1: 157-158.
3. **Михайлова Г.Р., Подчерняева Р.Я., Данлыбаева Г.А., Селиванова Т.К., Гребенникова Т.В., Гринкевич О.М.** Индикация микоплазм и деконтаминация их в клеточных линиях для проведения вирусологических исследований. Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва, 2007: 238.
4. **Михайлова Г.Р., Новохатский А.С., Родова М.А.** Новый способ выявления микоплазм в культурах перевиваемых клеток. Вопросы вирусологии. 1982, 6: 119-121.
5. **Михайлова Г.Р., Хижнякова Т.М., Подчерняева Р.Я., Гринкевич О.М., Алипер Т.И.** Метод деконтаминации клеточных культур от микоплазм при помощи фторхинолонов в сочетании с антибиотиками. Инф. бюлл. « Клеточные культуры». 2005, вып. 20: 41-45.
6. **Михайлова Г.Р., Хижнякова Т.М., Подчерняева Р.Я.** Использование антибиотиков для деконтаминации клеточных культур от микоплазм. Ветеринарная патология. 2005,1: 48-52.
7. **Ночевный В.Т., Подчерняева Р.Я., Михайлова Г.Р.** Деконтаминация перевиваемых линий клеток от микоплазм при помощи фторхинолонов. Цитология. 2001, 43, 4: 374.
8. **Глотов А.Г., Петрова О.П., Сергеев А.Н., Глотова Т.И., Нефедченко А.В., Шевченко Н.И., Мошкина С.В.** Распространение вирусных респираторных заболеваний.Ветеринария. 2002, 3: 11-15.
9. **Глотов А.Г., Глотова Т.И., Рябчикова Е.И., Сергеев А.Н.** Выделение и характеризация изолятов вируса вирусной диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота. Вопросы вирусологии. 2006, 1: 42-45.
10. **Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., АлиперТ.И.** Вирусы и вирусные вакцины.М.2007:522 с.
11. **Bolin. S.R., Matthews P.I., Ridpath I.F.** Methods for detection and antibodies against bovine viral diarrhea virus I.Vet.Invest, 1991, 3:199-203.
12. **Hoff H.S., Donis R.O**. Indiction of apoptosis and cleavage of poly (ADPribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhea virus infection. Virus Res., 1997, 49: 101-113.
13. **Zevings R.L., Wessman S.I.** Bovine viral diarrhea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. Dev. Biol. Stand. 1991, 75: 177-181.
14. **Steven R.Bolin., Iulia F. Ridpath, Iohn Black, Marvin Macy, Richard Roblin.** Survey of cell lines in the American Type Culture collection for bovine viral dear rhea virus. J.of virological Method, 1994, 48: 211-221.

Х Р О Н И К А

КОНФЕРЕНЦИИ И ШКОЛЫ, ПРОВЕДЕННЫЕ В 2010 ГОДУ

1. **4-й Всероссийский симпозиум с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»** был проведен в апреле 2010 г. в Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. акад. И.П.Павлова. На симпозиуме обсуждались проблемы организации и деятельности тканевых и клеточных банков России, вопросы технологии изготовления биологических материалов, проблемы тканевой инженерии и клинические аспекты клеточных технологий. В работе симпозиума принимали активное участие члены Ассоциации специалистов по клеточным культурам.

2. В Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН (Москва) в сентябре 2010 г. была проведена **Школа-конференция молодых ученых: «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины – 2010».** На конференции состоялся конкурс молодежных научных инновационных проектов.

3. Институт стволовых клеток и Межрегиональная общественная организация специалистов по клеточным технологиям и регенеративной медицине провели в сентябре 2010 г. в Москве **3-й Международный симпозиум «Актуальные вопросы клеточных технологий».** В программу симпозиума были включены устные доклады по следующим разделам: - фундаментальные аспекты создания и экспериментального обоснования клеточных технологий; - банкирование стволовых клеток; - правовые и эстетические аспекты регистрации и применения клеточных технологий; - опыт клинического применения клеточных технологий.

4. 16-й Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра» был проведен в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург) в октябре 2010 года. В рамках симпозиума были заслушаны устные доклады и представлены стендовые сообщения, часть из которых содержали результаты исследований, выполненных на культурах клеток и тканей.

5. В Киеве Центр регенеративной медицины и Координационный центр трансплантации органов, тканей и клеток провели в октябре 2010 г. **Научно-практическую конференцию с международным участием: «Генетическая и регенеративная медицина: проблемы и перспективы».** Тематика основных направлений: - стволовые и коммитированные клетки – экспансия и дифференциация, идентификация клеток, маркеров, генов; - использование генных и клеточных технологий для диагностики и лечения в регенеративной медицине; -

контроль, безопасность, иммунологические, этические и правовые аспекты использования генных и клеточных технологий в биомедицине и фармакологии (www.igrm.kiev.ua).

6. В октябре 2010 г. в МГУ им. Ломоносова на факультете фундаментальной медицины была проведена **Всероссийская научная школа-конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина».** Обсуждались следующие проблемы: - биология стволовых и прогениторных клеток; - методы исследования и подготовка клеток для трансплантации; - перспективы развития регенеративной медицины, как инновационного направления отечественного здравоохранения.

7. В ноябре 2010 г. в Институте физиологии им. И.П.Павлова (Санкт-Петербург) была проведена **Международная научно-практическая конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине».** Главная тематика конференции: разработка и реализация оптимальных схем и путей развития образования, науки, инновационной промышленности и стандартов в области физиологии, медицины и фармакологии.

К О Н Ф Е Р Е Н Ц И И 2011

1. **3-я конференция: «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты»,** посвященная памяти акад. Н.Г.Хрущева, будет проходить в Москве в Институте биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН **6-8 июня 2011 г.**

Предполагается рассмотрение следующих проблем: эмбриональные, тканеспецифичные и индуцированные стволовые клекти животных; ниша стволовых клеток; роль стволовых клеток в процессах развития, поддержании гомеостаза и регуляции; пластичность стволовых клеток, репрограммирование; генетические и эпигенетические механизмы самоподдержания и дифференцировки стволовых клеток. Тел. Оргкомитета: 8-499-135-63-37, Маршак Татьяна Леонидовна. E-mail: 4361.idb@bk.ru; TLM41@yandex.ru

2. Научный совет РАН по клеточной биологии и иммунологии, Институт цитологии РАН, Ассоциация специалистов по клеточным культурам проводят в Санкт-Петербурге **с 17 по 21 октября 2011г. Школу-конференцию для молодых ученых «Клеточные технологии для регенеративной медицины».** В программу школы включены лекции, посвященные общим принципам создания клеточных технологий восстановления поврежденных тканей и органов человека; разработке клеточных продуктов для терапии конкретных тяжелых заболеваний; использованию в технологиях разных стволовых клеток; развитию методов

тканевой инженерии с использованием биорезорбируемых полимерных конструкций; применению клеточных технологий для тестирования биобезопасности фармакологических препаратов; методам выделения, культивирования и подготовки аутологичных и аллогенных клеток для создания клеточных продуктов; использованию клеточных технологий и клеточных продуктов в клинической практике; проблемам клеточных технологий и перспективам их развития.

Участниками школы могут быть бакалавры, магистры, аспиранты и молодые кандидаты наук. Слушателям предлагается выступить со стендовыми сообщениями, которые будут обсуждаться на круглых столах в конце каждого заседания. Тезисы стендовых сообщений будут опубликованы в журнале «Цитология». Программа школы представлена на сайте Института цитологии РАН: http://www.cytspb.rssi.ru Контактный телефон: (812) 297-18-59.

Р А З Н О Е

Вышла из печати книга: **«Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»**. Сб. тезисов 4-го Всероссийского симпозиума с международным участием (под ред. акад. РАН и РАМН С.П. Миронова) – СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2010. - 334 с.

Вышла из печати монография: **Цымбалюк В.И., Медведев В.В. «Спинной мозг. Элегия надежды».** – Винница: Нова Книга, 2010. – 944 с. ISBN 978-966-382-199-3.

В монографии изложены современные представления о молекулярных механизмах развития спинного мозга, физиологии этого отдела нервной системы, функционировании двигательной системы. Приведен анализ современных представлений о патогенезе травмы спинного мозга, синдрома посттравматической спастичности, расстройств функции внутренних органов. Описаны современные методы лечения последствий травмы спинного мозга, приведены результаты экспериментальных исследований эффективности имплантации макропористого гидрогеля и культивированных нейроклеток обонятельной луковицы на модели травматического повреждения спинного мозга. На светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях прослежена динамика структурных изменений в спинном мозге крыс в очаге травмы в различные сроки после имплантации культивированных нейроклеток ольфакторной луковицы совместно с макропористым гидрогелем.

Библиогрпафический указатель содержит более 3500 источников.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи принимаются редакцией в электронном варианте и в рукописи. Электронный вариант статьи высылается в редакцию по электронной почте в виде **одного файла в формате Microsoft Word для Windows** (рисунки и таблицы вставляются в текст статьи). 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. Перед основным текстом статьи приводится краткое **резюме** (не более 1 стр.) и **ключевые слова**. Экспериментальная статья должна состоять 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 библиографические данные всех цитируемых работ. Для статей указываются фамилии и инициалы всех авторов (выделяются жирным шрифтом), название статьи, журнала, год его издания, том, выпуск, страницы. Для книг указываются фамилии и инициалы авторов, год издания, название книги, место издания, издательство и общее число страниц.

На английском языке представляются: название статьи, ф. и. о. авторов, наименования учреждений, краткое резюме и ключевые слова.

В редакцию бюллетеня высылается 1 экземпляр рукописи статьи с подписями всех ее авторов и направление ее в редакцию бюллетеня от учреждения, в котором выполнена работа. Все присланные в редакцию статьи проходят рецензирование и только после получения положительных рецензий публикуются.

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

О Г Л А В Л Е Н И Е

Основные направления исследований на клеточных культурах в учреждениях России

Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Гуткова Т.М., Писарева М.М., Кадырова Р.А., Слита А.В.
Влияние различных инфицирующих доз вирусов гриппа А на пролиферацию перевиваемых клеток человека……3

Щелкунова Т.И., Щелкунов И.С.
Получение и свойства двух постоянных линий клеток плавников сибирского осетра, Acipenser baerii……13

Адоева Е.А. Органотипическое культивирование эмбриональной поджелудочной железы крысы……..25

Яковлева Т.К., Ярцева Н.М., Турилова В.И.
Прогрессия кариотипа клеточных линий острого миелобластного лейкоза человека……34

Литвинчук Л.Ф., Раздольская Н.В., Потапчук М.В., Гаврилова О.В., Иванов А.М.
Изучение биологических свойств и криоконсервации паразитического простейшего Trichomonas vaginalis при совместном культивировании с клеточными культурами……46

Стволовые клетки: их использование в фундаментальной клеточной биологии и медицине

Семенова В.М., Любич Л.Д., Лисяный Н.И., Главацкий А.Я., Стайно Л.П.
Исследование биологических свойств супернатанта прогениторных нейроклеток крыс на культурах глиом головного мозга……58

Разрабатывается проблема

Лавров А.В., Вольдгорн Я.И.
Особенности расположения хромосом в ядрах мезенхимных стволовых клеток человека при культивировании in vitro……68

Маркарян А.Ю., Бахарев А.А., Устьянцев П.В.
Возможности стандартизации клеточных культур с помощью метода генотипирования короткими тандемными повторами……..74

Методы исследований

Подчерняева Р.Я., Урываев Л.В., Дедова А.В., Дедова Л.В., Ионова К.С., Михайлова Г.Р., Парасюк Н.А., Гринкевич О.М., Селиванова Т.К., Гребенникова Т.В., Петрачев А.Д., Щетвин М.Н.
Определение микоплазм и вируса бычьей диареи в коллекционных клеточных линиях……..80

Х р о н и к а

Конференции и школы, проведенные в 2010 году……89

Конференции 2011……90

Р а з н о е……91

Правила для авторов……92