

АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ISSN 2077- 6055

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЮЛЛЕТЕНЬ

ВЫПУСК 28

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2012

УДК 576.3, 576.4, 576.5, 576.8.097, М-54

ISSN 2077- 6055

Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 28.

Отв. ред. М.С. Богданова. - СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2012. - 62 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» (информационный 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, 2012

© Составление. Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН, 2012

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОБЛАСТОИДНОЙ ЛИНИИ NAMALVA

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

ФБГУ РНЦ радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург,

* mpsamoylovich@gmail.com

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) способны угнетать или стимулировать размножение трансформированных клеток в зависимости от гистогенеза последних, уровня их дифференцировки и/или условий культивирования. Задача работы состояла в изучении влияния МСК жировой ткани на пролиферацию лимфобластоидных клеток линии Namalva при разных условиях культивирования. Клетки того и другого типа культивировали в атмосфере с 5% CO₂ и 20% O₂ (нормоксия) или 5% O₂ (гипоксия). Дефицит ростовых факторов создавали за счет использования сыворотки со сниженной ростостимулирующей активностью. Гипоксия стимулировала пролиферацию клеток Namalva при выращивании в среде, богатой ростовыми факторами, и оказывала подавляющий эффект при дефиците ростовых факторов. При сокультивировании клеток Namalva с МСК наблюдали образование тесных контактов между клетками обоих типов. Совместное культивирование клеток Namalva с МСК в стандартной ростовой среде стимулировало пролиферацию лимфобластоидных клеток в нормоксии и при гипоксии. В условиях дефицита сывороточных ростовых факторов сокультивирование с МСК обеспечивало выживание клеток Namalva как в нормоксии, так и при гипоксии, а также способствовало их пролиферации. Таким образом, МСК из жировой ткани обеспечивают выживание и пролиферацию трансформированных В-лимфобластоидных клеток линии Namalva в условиях дефицита ростовых факторов.

Ключевые слова: стволовые клетки, лимфобластоидные линии, сокультивирование.

Накопленные за последнее десятилетие сведения об иммуномодулирующей активности мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток (МСК) (1, 2, 3) дали основания предполагать, что в перспективе МСК могут заменить лекарственную

иммунодепрессию при профилактике проявлений тканевой несовместимости, лечении воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваний. К настоящему времени, однако, активность МСК как биологических иммуномодуляторов изучена лишь в общих чертах. Остается неясным вопрос о влиянии МСК на функции В-лимфоцитов и на процесс превращения их в плазматические клетки-продуценты антител. Опубликованы данные об ингибирующем действии МСК на пролиферацию В-лимфоцитов и на синтез антител (4, 5). В других исследованиях показано, что присутствие МСК усиливает процессы размножения и дифференцировки В-лимфоцитов (6, 7, 8). Противоречия могут быть обусловлены как особенностями изучаемых объектов, так и различиями в условиях их культивирования. Во всех указанных работах источником МСК служили клетки костного мозга. Наряду с В-лимфоцитами донорской крови использовали клетки селезенки человека и мыши. В работе Amé-Thomas с соавторами (8) изучали действие МСК на В-клеточные линии. Применение лимфомных, лимфобластоидных и миеломных В-клеточных линий в качестве тест-объектов модулирующего действия МСК имеет ряд преимуществ. Такие линии стабильны, сохраняют основной дифференцировочный признак (способность синтезировать иммуноглобулины) и в отличие от монослойных культур МСК представляют собой суспензионные культуры. Цель настоящей работы состояла в изучении влияния МСК, полученных из жировой ткани человека, на пролиферацию клеток лимфобластоидной линии Namalva в зависимости от условий культивирования.

Материал и методы

Образцы подкожной жировой ткани были получены при информированном согласии от двух пациентов в ходе выполнения плановых хирургических операций по поводу злокачественных новообразований и от двух здоровых доноров. Согласно стандартной процедуре выделения МСК (9) ткань механически измельчали и выдерживали в 0,1% растворе коллагеназы (Sigma), приготовленном на среде α -MEM с 10 mM HEPES. Диссоциированные клетки отмывали от фермента с помощью центрифугирования и рассеивали в вентилируемые культуральные флаконы при плотности 100–400 тыс. клеток на 1 см² (кл/см²). Через 24 часа заменяли среду, удаляли неприкрепившиеся ко дну клетки. Монослой прикрепившихся клеток по достижении 70-80% конфлюента пересеивали при плотности 5 тыс. кл/см². В экспериментах использовали клетки 3-5

пассажей. Поверхностные маркеры выявляли с помощью меченных флуорохромами антител против CD34, HLA-DR, CD29, CD44, CD90, CD105, CD73 на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ (Becton-Dickinson) в соответствии с инструкцией производителя.

Линию лимфобластоидных клеток Namalva, полученную из Коллекции клеточных культур ИНЦ РАН, выращивали в среде DMEM/F12 с добавлением 5% сыворотки эмбрионов коров (Hyclone Defined). Для приготовления стандартной ростовой среды использовали сыворотку, хранившуюся при +4°C не более 3 мес. Для приготовления среды, дефицитной по ростовым факторам, использовали сыворотку того же происхождения, хранившуюся при +4°C в течение 12 мес. Все культуры выращивали в мультигазовом инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 20%O₂ (условия нормоксии) или 5% CO₂ и 5%O₂ (гипоксия).

Влияние МСК на клетки Namalva исследовали с помощью метода контактного сокультивирования. МСК рассеивали в ячейки 24-луночного планшета по 5 тыс кл/см². После прикрепления и распластывания МСК занимали 15-20% поверхности ячеек. Через сутки в те же ячейки вносили клетки Namalva в дозах 5, 10 или 50 тыс кл/мл. Контролем служили клетки Namalva, культивируемые без МСК. На 5 сутки после посева численность клеток в культурах определяли с помощью кондуктометрического счетчика Z1 (Beckman-Coulter). Счетчик был откалиброван для дифференцированного учета лимфобластоидных (меньших по размеру) и мезенхимальных (более крупных) клеток. Коэффициент размножения лимфобластоидных клеток вычисляли как отношение N5/N0, где N0 – посевная доза клеток, а N5 - количество клеток в культуре на 5 сутки. Все эксперименты были поставлены в 3–6 повторностях. На гистограммах представлены средние арифметические значения.

Результаты

При посеве клеток Namalva в дозах от 5 до 50 тыс. кл/мл в стандартной ростовой среде в условиях нормоксии наблюдали прямую зависимость величины коэффициента размножения от посевной дозы (рис 1). При дозе 2 тыс. кл/ мл за 5 суток культивирования численность клеток не нарастала, а при дальнейшем снижении плотности происходила гибель культур. Эти результаты определили выбор диапазона посевных концентраций клеток Namalva в последующих опытах.

При культивировании в среде, дефицитной по ростовым факторам, пролиферацию клеток *Namalva* наблюдали только в случае, если плотность посева превышала 10 тыс. кл/мл (рис. 1).

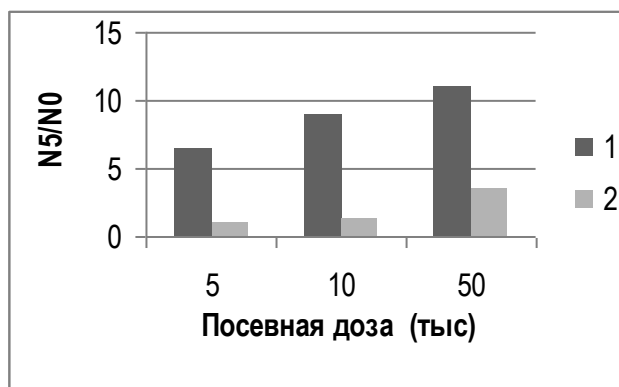


Рис.1. Влияние дефицита ростовых факторов на коэффициент размножения клеток *Namalva* при культивировании в условиях нормоксии. 1- стандартная культуральная среда; 2- среда, дефицитная по ростовым факторам.

Снижение концентрации O_2 до 5% при культивировании клеток в стандартной ростовой среде стимулировало их пролиферацию. Прирост численности клеток в условиях гипоксии был в 1,3-1,9 раза больше, чем при нормоксии. Стимулирующий эффект гипоксии проявлялся только при выращивании клеток в среде, содержащей сыворотку, богатую ростовыми факторами. При использовании среды, дефицитной по ростовым факторам, и посевной дозе ниже 10 тыс. кл/мл гипоксия приводила к снижению плотности культуры и её гибели (рис. 2).

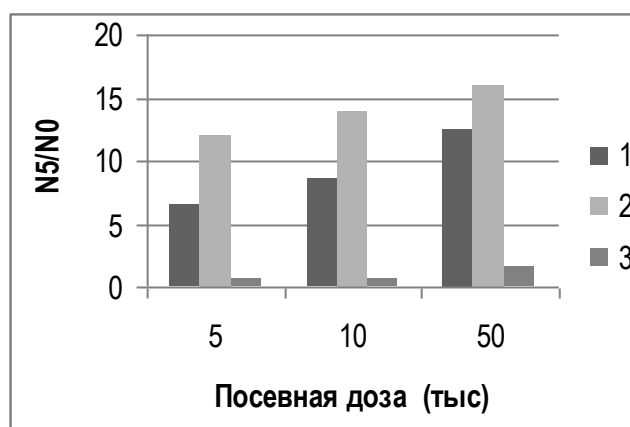


Рис.2. Влияние гипоксии и дефицита ростовых факторов на коэффициент размножения клеток *Namalva*. 1- культивирование в стандартной среде при нормоксии (контроль); 2- стандартная среда + гипоксия, 3- среда, дефицитная по ростовым факторам + гипоксия.

Культуры МСК, предназначенные для опытов по сокультивированию, характеризовали по экспрессии поверхностных маркеров (табл.1). Культуры МСК, обозначенные номерами 7 и 11, происходили из липоаспиратов здоровых доноров. Образцы культур МСК под номерами 6 и 8 были выделены из жировой ткани, иссеченной в ходе удаления злокачественных новообразований. Из данных, приведенных в таблице 1, следует, что по экспрессии основных маркеров культивируемые МСК пациентов не отличались от клеток доноров.

Таблица 1. Экспрессия поверхностных маркеров на МСК жировой ткани, использованных в опытах по сокультивированию с клетками Namalva.

Антиген	Процент клеток, экспрессирующих антиген в культурах МСК			
	№ 7	№ 11	№ 6	№ 8
CD44	88,6*	95,5	93,9	85,5
CD73	93,8	94,4	93,3	94,6
CD90	96,0	94,4	98,6	99,4
CD105	75,1	91,8	85,4	86,1
CD34	1,0		1,8	1,2
HLA-DR	0,2	0,2	0,6	0,1

При сокультивировании с МСК в течение первых суток после посева клетки Namalva оседали на дно ячеек, концентрировались вокруг МСК и прикреплялись к ним настолько плотно, что при осторожном перемешивании содержимого ячеек на орбитальном шейкере не переходили в суспензию. Если посевная доза составляла 50 тыс. кл/мл, лимфобластоидные клетки полностью маскировали распластанные МСК, оставляя свободной только поверхность, не покрытую монослойной культурой. На протяжении последующих дней пролиферирующие клетки формировали на поверхности МСК трехмерные колонии. По мере роста колоний часть клеток Namalva переходила в суспензию. На 5 сутки сокультивирования пипетирование позволяло перевести в суспензию незначительную часть лимфобластоидных клеток. Для полного перевода в суспензию лимфобластоидных клеток в ячейки наливали стандартный раствор трипсина (фирмы Биолот) и инкубировали при комнатной температуре под контролем инвертированного микроскопа. При этом наряду с клетками Namalva с поверхности удаляли часть МСК. Ферментативную активность трипсина ингибировали, перенося клеточную суспензию в среду DMEM с добавлением 10% сыворотки. Суспензии,

полученные на всех этапах, объединяли и брали пробы для определения в них количества клеток.

Сокультивирование клеток Namalva с МСК в стандартной ростовой среде в условиях нормоксии стимулировало пролиферацию лимфобластоидных клеток. Коэффициент размножения в смешанной культуре увеличивался при всех посевных дозах, эффект был наиболее значим при минимальной из использованных доз (рис. 3).

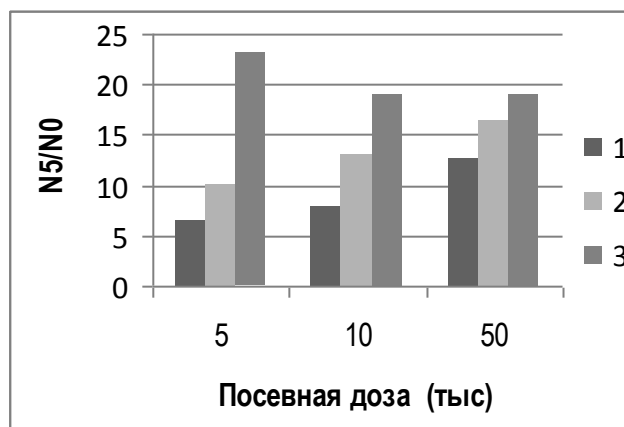


Рис. 3. Влияние МСК на пролиферацию клеток Namalva в стандартной ростовой среде в условиях нормоксии или гипоксии. 1- культура Namalva при нормоксии; 2- сокультивирование Namalva с МСК при нормоксии; 3-сокультивирование Namalva с МСК при гипоксии. Представлены средние значения, полученные для четырех культур МСК от разных индивидуумов.

В экспериментах были использованы две культуры МСК, полученные из липоаспираатов здоровых доноров и две культуры, выделенные из подкожной жировой клетчатки пациентов. Стимуляцию пролиферации клеток Namalva наблюдали при культивировании с МСК всех четырех культур.

Влияние МСК на клетки Namalva при культивировании в среде, бедной ростовыми факторами, было изучено как в условиях нормоксии, так и в атмосфере с пониженным содержанием кислорода.

Совместное культивирование с МСК частично компенсировало эффект дефицита ростовых факторов сыворотки и обеспечивало выживание лимфоидных клеток и их пролиферацию (рис. 4).

Как было показано выше, гипоксия угнетала пролиферацию клеток Namalva, культивируемых в среде, бедной ростовыми факторами. Присутствие МСК в такой среде компенсировало негативный эффект гипоксии (рис. 5).

Обсуждение

Постоянные линии, происходящие из В-лимфоцитов человека, в течение нескольких десятилетий используются как экспериментальные модели при изучении биологии В-лимфоцитов, процессов их злокачественной трансформации и механизмов синтеза иммуноглобулинов (10, 11, 12).

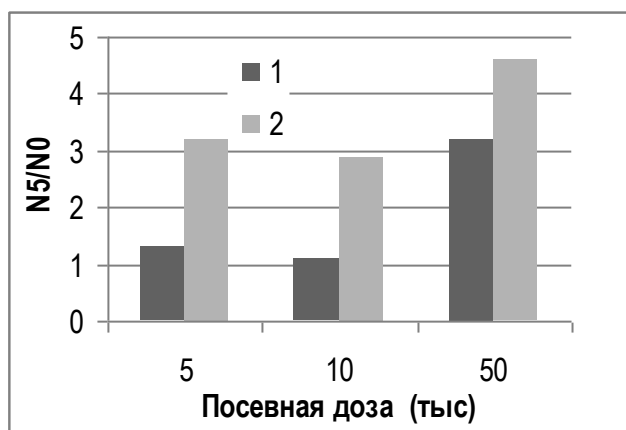


Рис.4. Влияние МСК на пролиферацию клеток Namalva при нормоксии в среде, дефицитной по ростовым факторам. 1- культура Namalva; 2-сокультивирование Namalva с МСК.

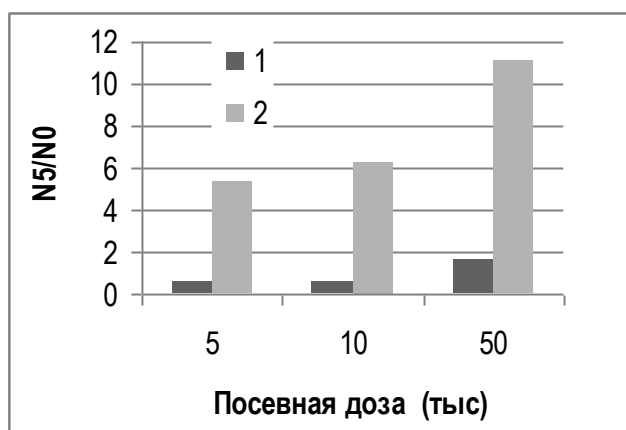


Рис.5. Влияние МСК на пролиферацию клеток Namalva при гипоксии в среде, дефицитной по ростовым факторам. 1- культура Namalva; 2-сокультивирование Namalva с МСК.

Известны единичные работы, в которых изучали влияние МСК на лимфомные или лимфобластоидные клетки В-клеточных линий (8, 13). Многообразие таких линий, иммортализованных на разных стадиях дифференцировки, заставляет уделять серьезное внимание оптимизации условий культивирования. Полученные в настоящей

работе данные указывают на то, что пролиферация клеток Namalva более всего зависит от плотности посева и от ростовых факторов сыворотки. В ходе настоящей работы установлено, что сильное стимулирующее действие оказывает снижение концентрации кислорода до 5%, что ранее не было известно и во многих прежних исследованиях не учитывалось.

Наибольшую стимуляцию пролиферации клеток Namalva наблюдали при сочетании богатой ростовыми факторами (стандартной) культуральной среды и гипоксии. В этих условиях практически нивелировалась зависимость скорости размножения от плотности посева. Важно подчеркнуть, что гипоксия оказывала положительное влияние только при наличии полноценной ростовой среды. При использовании среды, дефицитной по ростовым факторам, в условиях гипоксии клетки Namalva либо практически не размножались, либо погибали.

Присутствие монослоя МСК стимулировало пролиферацию клеток Namalva. Коэффициент размножения был наибольшим при сокультивировании на полноценной ростовой среде в условиях гипоксии. В среде, дефицитной по ростовым факторам, гипоксия угнетала пролиферацию клеток Namalva. Присутствие МСК в такой среде компенсировало ингибирующий эффект гипоксии. Таким образом, в целом полученные результаты позволяют сделать вывод о стимулирующем действии МСК на клетки линии Namalva. При этом активность МСК, выделенных от пациентов с новообразованиями, была такой же, какую проявляли клетки здоровых доноров.

В настоящей работе получены данные об установлении тесных контактов между МСК и лимфобластоидными клетками Namalva. Эти наблюдения дополняют опубликованные ранее сообщения о контактном взаимодействии МСК с кардиомиоцитами (14) или Т-лимфоцитами (15) и позволяют думать, что выявляемая при сокультивировании склонность МСК к установлению тесных контактов с клетками разных линий дифференцировки представляет собой универсальное свойство, которое может проявляться и в условиях целостного организма.

Список литературы

1. **Uccelli A., Moretta L., Pistoia V.** Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.*, 2006, 36: 2566-2573.

2. **Кругляков П.В., Лохматова Е.Л., Климович В.Б., Зарицкий А.Ю.** Мезенхимные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2006, 1 (3): 36-41.
3. **Shi M., Liu Z.W., Wang F.S.** Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. Clin Exp Immunol., 2011, 164:1-8.
4. **Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V., Uccelli A.** Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood 2006, 107: 367–372.
5. **Schena F., Gambini C., Gregorio A., Mosconi M., Reverberi D., Gattorno M., Casazza S., Uccelli A., Moretta L., Martini A., Traggiai E.** Interferon- γ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2010, 62: 2776-2786.
6. **Traggiai E., Volpi S., Schena F., Gattorno M., Ferlito F., Moretta L., Martini A.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. Stem Cells. 2008, 26: 562-569.
7. **Rasmusson I., Le Blanc K., Sundberg B., Ringden O.** Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. Scand. J. Immunol. 2007. 65: 336–343.
8. **Amé-Thomas P., Maby-E.I. Hajjami H., Monvoisin C., Jean R., Monnier D., Caulet-Maugendre S., Guillaudeux T., Lamy .T., Fest T., Tarte K.** Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. Blood. 2007, 109: 693-702.
9. **Zuk, P.A. P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J.I., Futrell, W.J., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001. 7: 211–226.
10. **Sie L, Loong S., Tan E.K.** Utility of lymphoblastoid cell lines. J. Neurosci. Res. 2009, 87:1953-1959.
11. **Самойлович М.П., Пиневиц А.А., Вартанян Н.Л., Климович В.Б.** Продукция IgM и J-цепи В-лимфобластоидными клеточными линиями. Клеточные культуры. Инф. бюллетень. 2010, вып. 25: 15-23.
12. **Ballou M., Wang W., Xiang S.** Modulation of B-cell immunoglobulin synthesis by retinoic acid. Clin. Immunol. Immunopathol. 1996, 80: 73-81.
13. **Bocelli-Tyndall C., Bracci L., Spagnoli G., Braccini A., Bouchenaki M., Ceredig R. Pistoia V., Martin I., Tyndall A.** Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. Rheumatology. 2007, 46: 403-408.
14. **Plotnikov E.Y., , Khryapenkova T.G., Vasileva A.K., Marey M.V., Galkina S.I., Isaev N.K., Sheval E.V., Polyakov V.Y., Sukhikh G.T., Zorov D.B.** Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. J. Cell Mol. Med. 2008, 12:1622-1631.
15. **Suva D., Passweg J., Arnaudeau S., Hoffmeyer P., Kindler V.** In vitro activated human T lymphocytes very efficiently attach to allogenic multipotent mesenchymal stromal cells and transmigrate under them. J. Cell Physiol. 2008, 214: 588-594.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЦНС

(обзор литературы)

В.М. Семенова, Д.М. Егорова

Государственное учреждение Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова АМН
Украины, 04050, Киев, seveme22@rambler.ru

В обзоре литературы обобщены современные представления о биологических свойствах мезенхимальных стволовых клеток (МСК) взрослого организма. Особое внимание уделено особенностям получения и культивирования плюрипотентных аутологических МСК стромально-васкулярной фракции жировой ткани (СКЖТ). Рассмотрены методы направленной нейрогенной дифференцировки СКЖТ и перспективы их использования в восстановительном лечении ряда заболеваний ЦНС. Освещены возможные нежелательные последствия и опасности неконтролируемой спонтанной дифференцировки МСК в разнородные клеточные линии.

Ключевые слова: стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, нейрогенная дифференцировка, культивирование клеток, заболевания ЦНС.

Современное состояние учения о биологии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из различных тканевых источников взрослого человека позволяет надеяться на возможность их использования как объекта тканевой терапии в восстановительном лечении ряда заболеваний ЦНС - нейродегенеративных, ишемических, травматических, наследственных и др. Показана высокая выживаемость с признаками нейрогенной дифференцировки предварительно культивированных МСК из жировой ткани (ЖТ) человека при аллотрансплантации в ЦНС иммунодефицитных мышей и крыс, а также при ауто- и аллотрансплантации от человека к человеку при введении клеток в мозг гистосовместимых пациентов с цереброваскулярным инсультом, болезнью Паркинсона, болезнью Альцгеймера (1). Установлено, что благодаря паракринной функции МСК позитивно влияют на состояние больных при некоторых видах патологии нервной системы. Это подтверждается экспрессией нейрогенина 1 (Ngn1) и пронеурального гена, которые преобразуют мезодермальный путь развития МСК в нейрогенный (2).

Восстановительная функция МСК объясняется их плюрипотентностью, способностью к

направленной миграции в область повреждения, а также их адгезивными свойствами. К общим свойствам МСК относят их высокий пролиферативный потенциал и способность к симметричному и асимметричному делению. При этом терапевтический системный эффект трансплантации МСК, наблюдаемый в ряде доклинических и клинических испытаний, определяется не только дифференцировкой, но и регуляторной функцией этих клеток (3, 4). Так как МСК способны подавлять иммунореактивность, их клиническое применение приобретает особо важное значение при ряде аутоиммунных заболеваний (красная волчанка, рассеянный склероз), а также при трансплантации органов и тканей. Сходные механизмы течения этих процессов и реакции «трансплантат против хозяина» позволяют предположить, что трансплантация МСК может затормозить развитие этих заболеваний (4).

В настоящее время особенно активно обсуждается возможность использования для клеточной терапии плюрипотентных аутологических СК стромально-васкулярной фракции жировой ткани (СКЖТ), содержащей малодифференцированные клетки-предшественники в соединительнотканых междольковых перегородках. Первостепенным преимуществом СКЖТ является доступность получения ЖТ в достаточном объеме практически для любого пациента, а также относительно несложные ферментативные процедуры их обработки для культивирования. В связи с этим ЖТ рассматривается как оптимальный ресурс для клеточной терапии, в том числе, и для регенерации поврежденной нервной ткани. Предполагается, что ЖТ может явиться альтернативным источником аутологических СК, которые можно получать малоинвазивным способом в необходимых количествах под местной анестезией, неоднократно, с минимальными неудобствами для пациента при низкой контаминированности другими видами клеток (35).

Так как механизмы восстановительного влияния МСК из ЖТ включают эффекты, связанные с их секреторной активностью, они могут принимать участие в репаративных процессах в организме, в восстановлении поврежденной сосудистой сети, а также в регуляции иммунных процессов, что значительно повышает восстановительный эффект клеточной терапии при их использовании (5, 6).

Как известно, ЖТ взрослого человека имеет сложный клеточный состав и содержит зрелые адипоциты, преадипоциты, фибробласты, гладкомышечные клетки, эндотелиальные клетки, моноциты, макрофаги и Т-лимфоциты. Стромально-васкулярная фракция клеток ЖТ (СКЖТ) - это клетки, полученные сразу после их выделения из ЖТ ферментативным путем с помощью коллагеназы. При многих пассажах эти клетки поддерживают свои характеристики,

демонстрируют мультипотентную дифференцировку и могут быть охарактеризованы с использованием мультипанели мезенхимальных маркеров дифференцировки (табл. 1). Согласно рекомендациям Международного общества по применению технологий работы с ЖТ, МСК, выделенные из ЖТ, определяются как «стволовые клетки жировой ткани» (Adipose-Derived Stem Cells – ASCs). В табл. 1 представлен молекулярный фенотип СКЖТ (цитировано по Shaffler A., Buchler Ch., 2007 (7)).

Таблица 1. Молекулярный фенотип СКЖТ.

СКЖТ-позитивные клеточные маркеры	СКЖТ-негативные клеточные маркеры
CD9	CD116
CD10	CD14
CD13	CD19
CD29	CD31
CD44	CD34
CD49(d)	CD45
CD49(e)	CD79L
CD54	CD80
CD55	CD117
CD59	CD133
CD73	CD144
CD90	HLA-DR
CD105	c-kit
CD106	MyD88
CD146	STRO-1
CD166	Lin
HLA I	HLA II
Фибронектин	
Эндомуцин	
ASMA (α-актинин, специфичный для гладких мышц)	
Виментин	
Коллаген-1	

Понимание общего профиля экспрессии генов и белков в СКЖТ является первостепенным

условием для их успешного культивирования и специфической дифференцировки, а, следовательно, и для высокоэффективной клеточной терапии. СКЖТ на своей поверхности могут экспрессировать перечисленные выше клеточные маркеры. Приведенная информация обобщена по данным литературы, причем экспрессия поверхностных маркеров изучалась не на «первичных» клетках, а на клетках, полученных *in vitro*.

До настоящего времени были неизвестны поверхностные маркеры, экспрессируемые СКЖТ, и их отличия от маркеров, экспрессируемых фибробластами. Считается, что МСК должны, как минимум, экспрессировать CD105, CD73, CD90 и должны быть лишены маркеров гемопоэтической линии: c-kit, CD14, CD116, CD34, CD79L, CD19, HLA-DR. При этом отсутствие экспрессии HLA-DR и иммуносупрессивные свойства СКЖТ делают их пригодными для аллогенной трансплантации без риска отторжения тканей. Кроме того, они не вызывают *in vitro* аллореактивность несовместимых лимфоцитов, тормозят смешанные лимфоцитарные реакции и пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены. Это подтверждает мнение о том, что СКЖТ обладают такими же иммуносупрессивными свойствами, как и МСК из КМ, и могут быть их альтернативой (5, 7, 8, 9, 10).

При сравнительном анализе с помощью микроаналитических тестов характера экспрессии генов человеческих МСК, полученных из ЖТ, КМ, пуповинного канатика и нормальных фибробластов, обнаружено 25 генов (включая гены фибронектина, ECM2, глипикана-4, ID1, NFIB, HOXA5 и HOXB6), которые сверхэкспрессировались в препаратах МСК по сравнению с фибробластами. Между тремя препаратами МСК не выявлены отличия при использовании панели с 22 поверхностными антигенами. Однако при сравнении СК из ЖТ и из КМ с МСК из пуповинного канатика обнаружено несколько сотен дифференцированно экспрессированных генных последовательностей (11).

В настоящее время разработаны оптимальные методы выделения, культивирования и дифференцировки МСК из КМ и ЖТ в остео-, адипо-, миохондрогенные и нейрональные линии. В эксперименте установлено, что на скорость пролиферации и способность СКЖТ к дифференцировке могут влиять возраст донора, тип ткани (белая или бурая ЖТ), область забора (подкожная или висцеральная ЖТ), вид хирургической манипуляции, а также условия культивирования: контакт с пластиком, плотность посева, состав питательной среды (12, 13, 14, 15). При этом скорость пролиферации СК из ЖТ и период удвоения клеточной популяции зависят от вида хирургической манипуляции при некоторых преимуществах резекции и тумесцентной липосакции в сравнении с ультразвуковой липосакцией (12). Однако De Ugarte

D.A. и соавторы (16) сравнивая МСК, полученные из КМ и СК из липоаспирата ЖТ у одного и того же пациента, не выявили различий в получении эффективного количества СК, в кинетике их роста, старения, способности к многорядной дифференцировке и эффективности трансдукции генов. Судя по всему, еще окончательно не определена единая комбинация методик обработки и получения СК, которая имела бы преимущества (13).

Показано, что способность к адгезии и пролиферации более выражена у СКЖТ, полученных от доноров более молодого возраста, хотя по мере старения организма способность этих клеток к дифференцировке не утрачивается (17). Обнаружено также, что выделенные СКЖТ могут сохраняться с помощью криометодов и рекультивироваться *in vitro* (18). В то же время, на выживаемость и способность к дифференцировке СКЖТ и изоляции разных подтипов клеток могут влиять различные по качеству коллагеназные препараты и разная скорость центрифугирования.

Установлено также, что скорость роста и продолжительность жизни СКЖТ можно повысить с помощью использования антиоксидантов (например, N-ацетил- L-цистеин, L-аскорбиновая кислота) и низкой концентрации кальция (19). Пролиферацию СКЖТ можно стимулировать фактором роста фибробластов (FGF-2) через FGF-рецептор-2 (20), сфингозилфосфорилхолином через активацию c-jun N-терминал киназы (JNK) (21), тромбоцитарным фактором роста через активацию JNK (22) и с помощью онкостатина М через активацию протеинкиназы JAK3/STAT1-пути, ассоциированной с микроканальцами (23). Продолжительность жизни человеческих СКЖТ может быть увеличена сверхэкспрессией каталитической субъединицы гена человеческой теломеразы (24).

По данным Zaragosi L.E. и соавторов (25) СКЖТ осуществляют экспрессию аутокринного FGF-2 кольца, которое обеспечивает их способность к самообновлению *in vitro*. Поскольку ингибирование MEK1 снижает клоногенный потенциал СК из ЖТ, не влияя на их способность к дифференцировке, ERK1/2 сигнальный путь, вероятно, принимает участие в FGF-2-опосредованном самообновлении.

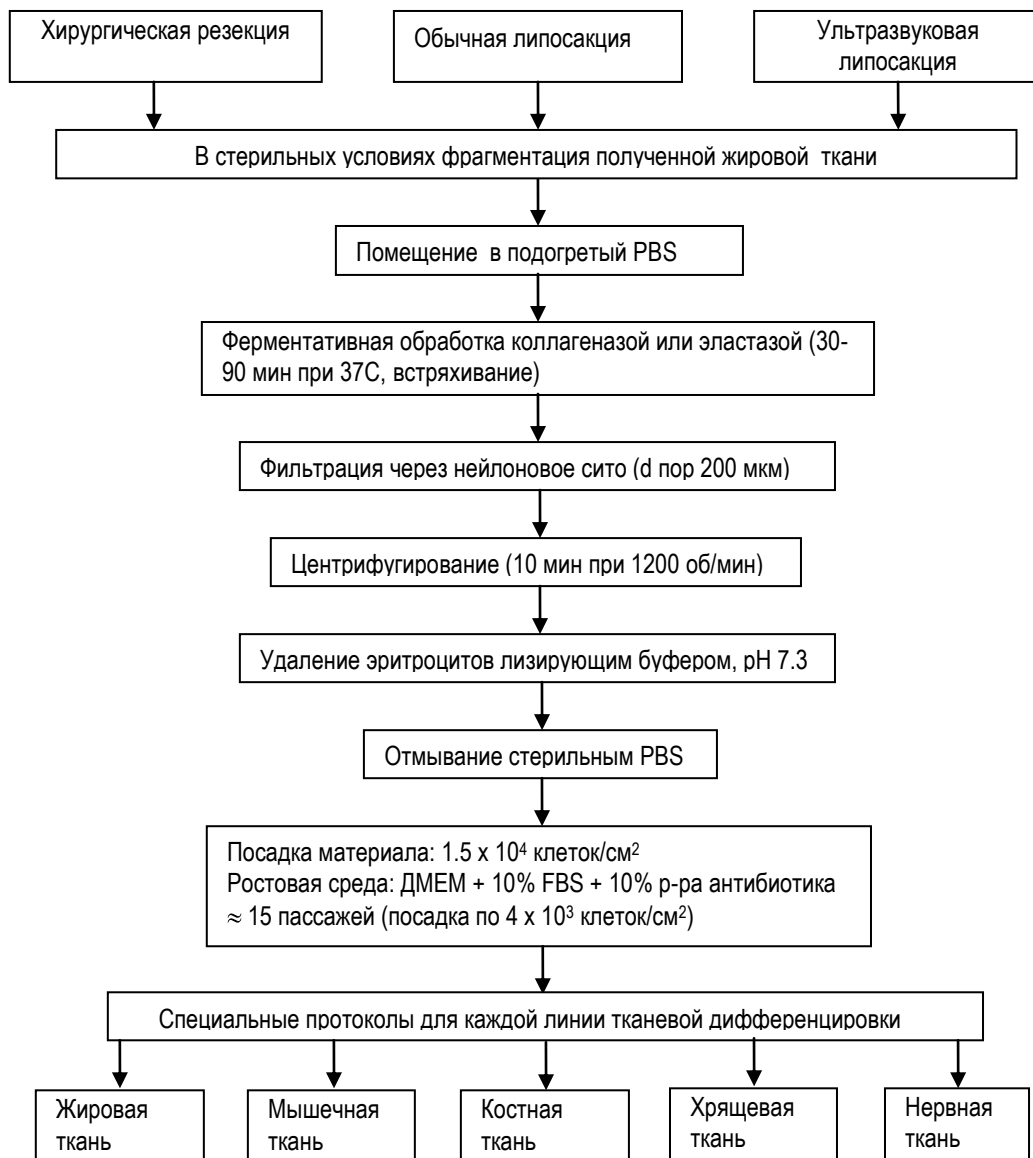
Представляет интерес способность СКЖТ продуцировать сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста гепатоцитов (HGF) и инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) (26), а фактор некроза опухоли-L может существенно увеличивать секрецию VEGF, HGF и IGF-1 СКЖТ за счет p38 митогенактивированного протеин-киназозависимого механизма. Предполагается, что дальнейшее углубление знаний о молекулярных механизмах, регулирующих пролиферацию СКЖТ, будет способствовать совершенствованию методов их

изоляции и культивирования.

Известно, что СКЖТ способны дифференцироваться в мезодермальные клетки: адипоциты, фибробласты, миоциты, остеоциты и хондроциты путем рядоспецифической дифференцировки (27). В то же время накапливается все больше данных о способности СКЖТ дифференцироваться в нейроны, эндокринные клетки, гепатоциты, эндотелиоциты и кардиомиоциты. Таким образом, СКЖТ обладают перекрестно-ростковой пластичностью (7). Клетки с нейроноподобной морфологией, полученные в результате направленной дифференцировки из СКЖТ, экспрессируют некоторые маркеры, в том числе нейронспецифичные белки NSE, NeuN и нестин, подтверждающие их нейрональный фенотип (9, 28). Как известно, нейрогенная дифференцировка СК различного генеза сопровождается повышением экспрессии специфических генов и появлением в них таких белков цитоскелета, как нестин (маркер ранних нейральных предшественников), нейрональная форма тубулина - 3, глиальный кислый фибриллярный белок GFAP (маркер астроцитарной глии), белок, взаимодействующий с микротрубочками MAP2, специфичная для нейронов энолаза Eno2 и некоторые другие маркеры нейрогенной дифференцировки. Индукция нейрогенной дифференцировки СКЖТ возможна также с помощью ретиноевой кислоты (29) и нейротрофических факторов (30).

Нейрогенные эффекты ретиноевой кислоты *in vitro* могут быть оценены и по экспрессии гена Wnt-13 (31), при этом она стимулирует образование функционально незрелых нейронов с недоразвитой сетью синапсов при отсутствии электровозбудимости их мембраны. Прединкубация таких незрелых форм в кондиционированной среде после культивирования зрелых астроцитов завершала дифференцировку цитоплазматических тел нейронов и их медиаторную специализацию. Однако, несмотря на то, что полученные *in vitro* нейроны человека из ЭСК уже начали использоваться в клинических испытаниях, научная база рестрикционного созревания ЭСК в нейроны только формируется. Детали программы лабораторного нейрогенеза строго засекречены и приватизированы частными фирмами. По-видимому, от идеи «один сигнал - один фенотип» приходится отказаться. Известно лишь, что рестрикционное созревание любой соматической линии клеток находится под контролем множества сигналов (31). В табл.2 приведен схематичный протокол рациональной процедуры получения СК (7).

Таблица 2. Протокол рациональной процедуры получения СК из ЖТ



Полученные после липосакции или хирургического вмешательства образцы ЖТ подвергаются ферментативной обработке коллагеназой (9) или эластазой (5). Из суспензии отдельных клеток путем центрифугирования выделяется осадочная фракция клеток стромально-васкулярного фенотипа, состоящая в основном из CD34+ клеток с примесью CD45+ лейкоцитарных клеток и эритроцитов (10, 32). Примесь эритроцитов удаляется из осадочной фракции с помощью инкубации клеток в лизирующем эритроциты буфере, при последующем культивировании клеток стромально-васкулярного фенотипа элиминируются CD45+ лейкоцитарные клетки крови за счет их слабой адгезии к необработанному пластику. В зависимости от источника и методики выделения из 1 г ЖТ удается получить 10^5 - 10^6 клеток (5). Полученные клетки способны дифференцироваться в клетки с нейроноподобной

морфологией и экспрессируют некоторые маркеры (нейронспецифичные белки NSE, NeuN и нестин), подтверждающие их нейрональный фенотип (9, 28).

Описана также нейрональная дифференцировка азацитидином СК, полученных из липоасpirата человека (33). СК, полученные из жира мочки уха человека, также поддерживали способность к самообновлению и дифференцировке в разные клеточные линии в специфических условиях культивирования. Последующая инкубация *in vitro* человеческих СКЖТ в присутствии bFGF и форсколина вызывала их дифференцировку в нейроны и глию (34).

Anghileri E. и соавторы (35) исследовали потенциал нейрогенной дифференцировки СКЖТ человека по протоколу, который включал формирование нейросфер и последующее культивирование с мозговым нейротрофическим фактором (BDNF) в сочетании с ретиноевой кислотой. Через 30 дней у 57% СКЖТ были выявлены морфологические, иммуноцитохимические и электрофизиологические признаки начальной нейрогенной дифференцировки. Клетки приобрели удлинённую форму с протрузией двух или трех клеточных отростков, селективно экспрессировали нестин и нейронные молекулы (включая рецептор GABA и тироксин гидроксилазу) при отсутствии глиальных фенотипичных маркеров.

Лопатина Т.В. и соавторы (36) СКЖТ второго пассажа культивировали с различными агентами: изобутилметилксантином (Isobutylmethylxanthine, IBMX), b-меркаптоэтанолом, глиа-производным нейротрофическим фактором (glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF), мозговым нейротрофическим фактором (brain-derived neurotrophic factor; BDNF), ретиноевой кислотой (retinoic acid, RA), 5-азацитидином, а также с сочетанием этих веществ. Эффективность нейральной индукции оценена на основе повышения транскрипции маркерных генов нейральной дифференцировки: нестина, 3-тубулина, MAP2 и нейрон-специфической энлазы (Epo2). Экспрессию маркерных белков нейральной дифференцировки тестировали с помощью вестерн-блот анализа. При добавлении в индуцирующую среду RA или BDNF в сочетании с 5-азацитидином и культивировании СКЖТ с этими индукторами в течение недели повышалось содержание мРНК и белка нестина, тубулина и Epo2. При трансплантации в головной мозг мыши индуцированных в нейроны мышинных СКЖТ увеличивалась продолжительность жизни этих клеток, а также наблюдалась их миграция из области введения в смежную ткань мозга реципиента. Авторы заключили, что воздействие на СКЖТ ретиноевой кислоты и BDNF в сочетании с 5-азацитидином повышает уровень транскрипции нейральных маркеров, а также жизнеспособность и интеграцию

трансплантированных клеток в головном мозге мыши.

Описана также нейроноподобная дифференцировка человеческих МСК, полученных из КМ, ЖТ, селезенки и тимуса, индуцированная либо химическими факторами, либо кокультивированием со шванновскими клетками человека (37). В кондиционированной среде для нейрального дифференцирования большинство МСК из КМ, ЖТ, селезенки и тимуса приобретали фенотипические особенности клеток астроцитарно/нейронального и олигодендроглиального генеза, однако процесс был переходным и обратимым, поскольку МСК возвращались к первоначальной морфологии и фенотипу. Авторы предположили, что химические факторы являются главным стимулом для нейрального дифференцирования МСК, инициируя нестрогие специфические изменения. В отличие от этого, кокультивирование МСК различного гистогенеза со шванновскими клетками приводило к длительной, более устойчивой дифференцировке в шванновские клетки с экспрессией белков миелина на протяжении 12 дней. Авторы считают, что эти результаты могут иметь большое значение в разработке терапевтических подходов к лечению хронических нейропатий.

Wilkison W.O. и Gimble J.M. (1) предложен многостадийный способ получения предназначенной для трансплантации популяции СКЖТ, индуцированных к нейральной дифференцировке ретиноевой кислотой в сочетании с нейротрофическим фактором BDNF (35). Способ предусматривает культивирование популяции стромальных СКЖТ человека в стандартных условиях в течение 3-5 недель, затем 2-х этапную индукцию нейральной дифференцировки: в течение 3 дней культивирование клеток в бессывороточной среде с наличием bFGF (20нг/мл) и hEGF (20нг/мл), что приводит к образованию нейросфер, и затем в течение 30 дней - в присутствии 10 нг/мл BDNF и 0,75 мМ ретиноевой кислоты (RA). Недостатками способа являются его длительность и недостаточная эффективность, т.к. морфологические и иммуноцитохимические признаки нейральной дифференцировки проявляются примерно у половины клеток.

Способ Парфеновой Е.В. и соавторов (38) позволяет повысить этот показатель путем увеличения суммарной популяции из ЖТ TrkB-позитивных клеток, чувствительных к воздействию индукторов нейральной дифференцировки. Выделение субпопуляции TrkB-позитивных клеток в культуре осуществлялось с помощью иммуномагнитной селекции или иммуносортинга с использованием антител против рецептора TrkB, а последующая индукция нейральной дифференцировки обеспечивалась нейротрофическим фактором BDNF или ретиноевой кислотой в сочетании с 5-азациитидином. Этот способ повышает выход клеток с

эффективной индукцией нейральной дифференцировки и сокращает общие сроки подготовки культуры к трансплантации.

В настоящее время активно обсуждается вопрос о применении МСК, полученных из ЖТ, для лечения расстройств нервной системы, повреждений спинного мозга, а также возрастных нейродегенеративных заболеваний ЦНС и др. (35, 39, 40). Использование МСК из ЖТ с предварительной дифференцировкой в нейральном направлении *in vitro* и их дальнейшая алло- или ауто трансплантация гистосовместимым пациентам считается перспективным при деструкции межпозвонковых дисков, при рассеянном склерозе, травмах спинного мозга, дегенеративных изменениях периферических нервов, болезни Хантингтона, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, деменции, глиобластоме, нейробластоме, ДЦП, реакции «трансплантат против хозяина» и ряде других заболеваний (1, 41).

Введение СКЖТ человека в боковой желудочек мозга крыс через сутки после инсульта заметно улучшало поведенческие функции животных уже на 7 сутки. Это сопровождалось миграцией имплантированных клеток в различные области мозга и их выживание в течение не менее 30 дней (33). Это отражает тропность СКЖТ к очагу поражения в мозге.

Изучается возможность дифференцировки СКЖТ в олигодендроциты и шванновские клетки для дальнейшего их использования в лечении болезней периферической и центральной нервной системы. На модели повреждения спинного мозга крысы показано улучшение моторных функций после внутривенной трансплантации олигодендроцитарных клеток-предшественников, полученных из СКЖТ крысы. После 4-5 недель 30-35% имплантированных клеток-предшественников олигодендроцитов выжили, активно мигрировали в область травмы и были частично дифференцированы в нейроны и олигодендроциты (42).

Показано также, что ЖТ содержит пул регенераторных СК, способных дифференцироваться в фенотип шванновских клеток, которые можно было бы применять в лечении травматических повреждений периферических нервов (43).

Ху Y. и соавторы (44) индуцировали СКЖТ крысы в нейросферы с дальнейшей дифференцировкой в нейронально- и глиальноподобные клетки, а также в шванноподобные клетки с характерными морфологическими и иммуноцитохимическими признаками. Они обнаружили также способность шванноподобных клеток эффективно индуцировать дифференцировку клеток нейробластомы SH-SY5Y предположительно за счет секреции растворимых веществ. Более того, эти клетки формировали *in vitro* миелиновые структуры нейритов клеток PC12. Это указывает на возможность использования полученных из СКЖТ

шванноподобных клеток в лечении неврологических болезней.

Куликовым А.В. с соавторами (31) изучена способность СКЖТ восстанавливать нарушенные функции мозга крыс при хорее Хантингтона, индуцированной внутрибрюшинным введением 3-нитропропионовой кислоты. Этот нейротоксин вызывает стойкий окислительный стресс и гибель нейронов базальных ядер в мозге, что ведет к развитию когнитивных расстройств, сходных с клиникой хорей Хантингтона у человека. Одноразовое внутривенное введение таким животным суспензии активированных мультипотентных МСК, полученных из ЖТ человека, снижало выраженность неврологической симптоматики, улучшало активность животных с почти полным восстановлением утраченной способности к обучению. Это подтверждено морфологически – было выявлено восстановление формы нейронов хвостатого ядра головного мозга крыс. По мнению авторов, эффективное лечение клинических проявлений при хорее Хантингтона у человека возможно также с помощью СК, полученных из собственной ЖТ пациента (31).

Lee D.H. и соавторы (45), исходя из положения о тропности НСК и МСК к опухолям головного мозга, сравнили миграционные способности НСК человека и МСК, полученных из КМ, ЖТ и пуповинной крови человека. При оценке направленной миграции НСК и МСК к глиоме ствола мозга крыс (F98) *in vivo* и *in vitro* показано, что тропная миграционная способность МСК различного происхождения подобна таковой у генетически модифицированных НСК, проявляющих терапевтическую эффективность против глиом ствола мозга. Аналогичные данные сообщили Choi S.A. и соавт. (46).

В то же время, ряд авторов напоминают о необходимой осторожности в применении терапии СК, поскольку они могут спонтанно дифференцироваться в разнородные клеточные линии *in vivo* или нежелательные типы клеток в месте имплантации (47). Так, трансплантация недифференцированных МСК в пораженный миокард может приводить к дифференцировке значительной их части в фибробласты, что усугубляет формирование рубцовой ткани и значительно снижает благоприятный результат лечения (48).

Кроме того, при системном введении СК могут оседать не только в органе-мишени, но и в тканях внутренних органов и дифференцироваться в хондроциты, адипоциты, стромальные клетки КМ, а также могут приобретать фенотип нейронов и астроцитов (49). Kang S.K. и соавторы (42) сообщили, что при внутривенном введении клеток-предшественников олигодендроцитов, полученных из СКЖТ крыс при экспериментальном повреждении спинного мозга крысы, после 4-5 недель клетки, частично дифференцировавшиеся в нейроны и

олигодендроциты, выживали и мигрировали в область травмы. В то же время, некоторые из клеток-предшественников олигодендроцитов мигрировали в ткани почек, мозга, легкого и печени по ходу венозной системы.

Наряду с этим, взрослые мультипотентные прогениторные клетки могут вовлекаться в процесс ангиогенеза растущих опухолей. Существование феномена дедифференцирования взрослых СК при длительном культивировании с приобретением ими свойств ЭСК (50), риск накопления генетических мутаций вследствие манипуляций *in vitro*, а также склонность СК к формированию гибридных клеток вследствие *fusion*-феномена говорят о том, что такие клетки после трансплантации могут являться очагом генетической нестабильности и давать начало неконтролируемому клеточному росту (51).

Таким образом, в приведенном обзоре литературы отражены основные достижения исследований биологии МСК взрослого организма. В настоящее время эта сложная многоплановая проблема переживает этап накопления экспериментальных данных, требующих подтверждения и осмысления. Важно учитывать, что наряду с перспективами применения МСК в комплексном лечении заболеваний ЦНС, возможны нежелательные последствия использования клеточной терапии и опасность неконтролируемой спонтанной дифференцировки МСК в разнородные клеточные линии. Это обосновывает необходимость дальнейших поисков в разработке ряда нерешенных вопросов в биологии МСК.

Список литературы

1. **Wilkison W.O., Gimble J.M.** Adipose tissue-derived stromal cell that expresses characteristics of a neuronal cell. US Patent 7078230, Appl.N: 09/793173, 07/18/2006.
2. **Kim S.S., Yoo S.W., Park T.S., Ahn S.C., Jeong H.S., Kim J.W., Chang D.Y., Cho K.G., Kim S.U., Huh Y., Lee J.E., Lee S.Y., Lee Y.D., Suh-Kim H.** Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain. *Stem Cells* 2008, 26, 9: 2217-2228.
3. **Кругляков П.В., Лохматова Е.А., Климович В.Б., Зарицкий А.Ю.** Мезенхимные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006, 3, 5: 36-41.
4. **Космачёва С.М., Волк М.В., Потапнев М.П.** Стволовые клетки взрослых: проблемы получения, дифференцировки *in vitro*, перспективы клинического применения. Медицинские новости. 2008, 9: 5-9.
5. **Трактеев Д.О., Марч К.Л., Ткачук В.А., Парфенова Е.В.** Стромальные клетки жировой ткани - мультипотентные клетки с терапевтическим потенциалом для стимуляции ангиогенеза при ишемии тканей. Кардиология. 2006, 46: 53-63.
6. **Рябцева Е.С., Кривенко С.И., Левин В.И., Луц Л.С., Белевцев М.В., Усс А.Л., Змачинский В.А.** Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани: характеристика и аспекты использования при трансплантации гемопоэтических клеток. Известия НАН Беларуси. 2006, 1: 81-87.

7. **Schaffler A., Buchler Ch.** Consise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells – Basic and Clinical Implication for Novel Cell-Based Therapies. *Stem.Cells.* 2007, 25, 4: 818-827.
8. **Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering.* 2001, 7, 2: 211–228.
9. **Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 2002, 13: 4279–4295.
10. **Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L.** Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004, 109,10: 1292-1298.
11. **Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U., Blake J., Schwager C., Eckstein V., Ansorge W., Ho A. D.** Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Exp.Hematol.* 2005, 33: 1402-1416.
12. **Oedayrajsingh-Varma M., van Ham S., Knippenberg M.** Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy.* 2006, 8: 166-177.
13. **Smith P., Adams W.P., Lipschitz A.H.** Autologus human fat grafting: Effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte gragt survival. *Plas.Reconstr.Surg.* 2006, 117: 1836-1844.
14. **Prunet-Marcassus B., Cousin B., Caton D.** From heterogeneity to plasticity in adipose tissue: Site-specific differences. *Exp.Cell.Res.* 2006, 312: 727-736.
15. **Peptan I.A., Hong L., Mao J.J.** Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast.Reconstr.Surg.* 2006, 15: 1462–1470.
16. **De Ugarte D.A., Alfonso Z., Zuk P.A., Elbarbary A., Zhu M., Ashjian P., Benhaim P., Hedrick M.H., Fraser J.K.** Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters.* 2003, 89: 267 – 270.
17. **Shi Y.Y., Nacamuli R.P., Salim A.** The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging, *Plas.Reconct.Surg.* 2005, 116: 1686 – 1696.
18. **Pu L.L., Cui X., Fink B.F.** Adipose aspirate as a source for human processed lipoaspirate after optimal cryopreservation. *Plast.Reconstr.Surg.* 2006, 117: 1845-1850.
19. **Lin T.M., Tsai J.L., Lin S.D.** Accelerated growth and prolonger lifespan of adipose tissue – derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev.* 2005, 14: P.92-102.
20. **Chion M., Xu Y., Longaker M.T.** Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2006, 343: 644-452.
21. **Jeon E.S., Song H.Y., Kim M.R., Moon H.J., Bae Y.C., Jung J.S., Kim J.H.** Sphingosylphosphorylcholine induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via activation of JNK. *The Journal of Lipid Research.* 2006, 47: 653-664.
22. **Kang Y.J., Jeon E.S., Song H.Y.** Role of c-Jun N-terminal adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J.Cell.Biochem.* 2005, 95: 1135-1145.

23. **Song H.Y., Jeon E.S., Jungs J.S.** Oncostatin M includes proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Int.J.Biochem.Cell.Biol.* 2005, 37: .2357-2365.
24. **Jun E.S., Lee T.H., Cho H.H., Suh, S. Y. and Jung, J. S.** Expression of telomerase extends longevity and enhances differentiation in human adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Physiol Biochem*, 2004, 14,4-6: 261-268.
25. **Zaragosi L.E., Ailhaud G., Dani C.** Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells*. 2006, 24: 2412-2419.
26. **Wang M., Crisostomo P., Herring C.** Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 2006, 291: 880-884.
27. **Lin Y., Chen X., Yan Z.** Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice. *Mol.Cell Biochem.* 2006, 285: 69-78.
28. **Fujimura, J., Ogawa R., Mizuno H., Fukunaga Y., Suzuki H** Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2005, 333, 1: 116-121.
29. **Безбородов Н.С., Криевиня Г.А., Бабрыкин Д.А.** Ретиноиды: индукторы нейрогенной или адипогенной дифференцировки культуры костномозговых мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) крысы. *Цитология*. 2008, 50, 9: 795.
30. **Rivera, F.J., Sierralta W.D., Minguell J.J., Aigner L.** Adult hippocampus derived soluble factors induce a neuronal-like phenotype in mesenchymal stem cells. *Neurosci.Let.* 2006 406, 1-2: 49-54.
31. **Куликов А.В., Ржанинова А.А., Гольдштейн Д.В., Болдырев А.А** Экспрессия NMDA-рецепторов в мультипотентных стромальных клетках жировой ткани человека в условиях дифференцировки, индуцированной ретиноевой кислотой. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2007, 4: .216-220.
32. **Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B. Andre M., Nibbelink M., Tamarat R. Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M., Tedgui A., Levy B., Pénicaud L., Casteilla L.** Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004, 109: 656.
33. **Kang S.K., Lee D.H., Bae Y.C., Kim H.K., Baik S.Y., Jung J.S.** Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp.Neurol.* 2003, 183: 355-366.
34. **Sujeong J., Hyong-Ho Ch., Yong-Bum Ch., Jong-Seong P., Han-Seong J.** Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biology*. 2010, 11, 25
35. **Anghileri, E., Marconi S., Pignatelli A., Cifelli P., Galie M., Sbarbati A., Krampera M., Belluzzi O., Bonetti B.** Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008, 17: 909-916.
36. **Лопатина Т.В., Калинина Н.И., Ревущин А.В., Беме А.А., Спирова И.А., Павлова Г.В., Парфенова Е.В.** Индукция нейральной дифференцировки стромальных клеток жировой ткани. *Клеточная трансплантология*. 2008, III, 4: 50-54.
37. **Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galiè M, Rigotti G, Mosna F, Tinelli M, Lovato L, Anghileri E, Andreini A, Pizzolo G, Sbarbati A, Bonetti B.** Induction of neural-like

differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*. 2007, 40, 2: 382-390.

38. **Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Рубина К.А., Калинина Н.И., Лопатина Т.В., Павлова Г.В., Ревущин А.В.** Способ получения популяции стромальных клеток жировой ткани, индуцированных к нейральной дифференцировке. Патент на изобретение №2396345 RU, 15.12.2008.

39. **Рябцева Е.С., Кривенко С.И., Левин В.И., Луц Л.С., Белевцев М.В., Усс А.Л., Змачинский В.А.** Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани: характеристика и аспекты использования при трансплантации гемопоэтических клеток. *Известия НАН Беларуси*. 2006, 1: 81-87.

40. **Hou L, Hong T.** Stem cells and neurodegenerative diseases. *Sci.China C.Life Sci*. 2008, 51, 4: 287-294.

41. **Wilkison W.O., Gimble J.M., Vanguri P.** Adipose tissue derived stromal cells for the treatment of neurological disorders. US Patent 7582292, Appl.N: 11/286900, 09/01/2009.

42. **Kang S.K., Shin M.J., Jung J.S., Kim Y.G., Kim C.H.** Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev*. 2006, 15, 4: 583-594.

43. **Kingham P.J., Kalbermatten D.F., Mahay D., Armstrong S.J., Wiberg M., Terenghi G.** Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp.Neurol*. 2007, 207, 2: 267-274.

44. **Xu Y., Liu Z., Liu L., Zhao C., Xiong F., Zhou C., Li Y., Shan Y., Peng F., Zhang C.** Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells in vitro. *BMC Neurosci*. 2008, 12, 9: 21.

45. **Lee D.H., Ahn Y., Kim S.U., Wang K.C., Cho B.K., Phi J.H., Park I.H., Black P.M., Carroll R.S., Lee J., Kim S.K.** Targeting rat brainstem glioma using human neural stem cells and human mesenchymal stem cells. *Clin.Cancer. Res*. 2009, 15: 4925-4934.

46. **Choi S.A., Hwang S.K., Wang K.C., Cho B.K., Phi J.H., Lee J.Y., Jung H.W., Lee D.H., Kim S.K.** Therapeutic efficacy and safety of TRAIL-producing human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against experimental brainstem glioma. *Neuro.Oncol*. 2011, 13, 1: 61-69.

47. **Космачёва С.М., Волк М.В., Потапнев М.П.** Стволовые клетки взрослых: проблемы получения, дифференцировки in vitro, перспективы клинического применения. *Медицинские новости*. 2008, 9: 5-9.

48. **Yang S. E., Ha C. W., Jung M., Jin H. J., Lee M., Song H., Choi S., Oh, W., Yang Y.S.** Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. *Cytotherapy*. 2004, 6, 5: 476-486.

49. **Gao J., Dennis J.E., Muzic R.F. Lundberg M., Caplan A.I.** The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*. 2001, 169: 12-20.

50. **Orkin S.H., Morrison S.J.** Biomedicine: stem-cell competition. *Nature*. 2002, 418: 25-27.

51. **Dawson L., Bateman-House A.S., Mueller Agnew D. Bok H., Brock D.W., Chakravarti A., Greene M., King P.A., O'Brien S.J., Sachs D.H., Schill K.E., Siegel A., Solter D., Suter S.M.** Safety issues in cell-based intervention trials. *Fertil. Steril*. 2003, 80: 1077-1085.

СТВОЛОВЫЕ И ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА: УСЛОВИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И НАКОПЛЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ, МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Н.Г. Антоневиц ¹, З.Б. Квачева ¹, В.Л. Чекан ², И.В. Сидоренко ², Е.С. Лобанок ³

Государственное учреждение «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»¹, ГУО Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования², ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»³

antonevich.n@gmail.com

Получение и культивирование стволовых и прогениторных клеток обонятельной выстилки (ОВ) человека является актуальным направлением для разработки протоколов лечения травматических и дегенеративных повреждений нервной системы. В настоящем исследовании оптимизированы условия выделения жизнеспособных клеток ОВ, обладающих высоким пролиферативным потенциалом, для приготовления гетерогенной первичной культуры. Охарактеризован морфофункциональный и фенотипический состав культивируемых клеток. Идентифицировано две популяции стволовых и прогениторных клеток ОВ.

Ключевые слова: обонятельная выстилка человека, культура клеток, экто-мезенхимальные стволовые клетки, цитосферы.

Заместительная терапия поврежденных органов и тканей с использованием клеточных технологий - бурно развивающаяся область трансплантологии. Одним из многообещающих направлений в лечении травматических повреждений и дегенеративных заболеваний нервной системы является применение биопрепаратов на основе культивируемых нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК) и их дифференцированных потомков (1). В настоящее время периферический отдел обонятельного анализатора, обонятельная выстилка (ОВ), рассматривается как перспективный источник НСПК (2, 3). Ткань ОВ состоит из двух слоев: нейроэпителия и подлежащей рыхлой соединительной ткани (*lamina propria*), которые представлены большим числом различных типов клеток, находящихся в сложных иерархических взаимодействиях (4). ОВ содержит обонятельные рецепторные нейроны разной степени дифференцировки, глиальные обкладочные, эпителиальные, поддерживающие клетки и фибробласты (5). Рецепторные нейроны обонятельной области после завершения

жизненного цикла или вследствие гибели замещаются новыми клетками того же типа в течение всей жизни. Постнатальный нейрогенез возможен благодаря присутствию в ткани ОБ пула цитокератин-5/6 позитивных стволовых клеток, располагающихся на базальной мембране нейроэпителия (5; 6, 7, 8, 9, 10; 11, 12). Показано, что при культивировании эти клетки формируют нейросферы, экспрессируют глиальные и нейрональные маркеры и способны к дифференцировке в клетки тканей других типов (13). Установлен положительный клинический эффект трансплантации культивируемых базальных стволовых и прогениторных клеток в сочетании с обкладочными глиальными (14; 15; 16) и фрагментов ткани обонятельной выстилки (17) у пациентов с травмами спинного мозга.

Недавно идентифицирована вторая популяция стволовых клеток ОБ мезенхимального происхождения, ниша которой находится в *lamina propria* (18). Показано, что клетки данной популяции обладают нейрогенным дифференцировочным потенциалом (18). При моделировании повреждений нервной системы у животных продемонстрировано положительное влияние их трансплантации на восстановление утраченных функций (19, 20). Таким образом, стволовые и прогениторные клетки ОБ представляются достаточно перспективными кандидатами для использования в нейротрансплантологии.

В настоящее время приготовление культур клеток ОБ и накопление их биомассы, ввиду отсутствия единого протокола, представляет определенные сложности. Это частично связано с невозможностью стандартизировать условия получения биопсийного материала от доноров. Существующие методики выделения и культивирования стволовых клеток не всегда воспроизводимы, недостаточно описан фенотипический состав и биология развития клеток ОБ в культуре. В связи с этим, целью исследования явилась оптимизация условий выделения и накопления биомассы стволовых и прогениторных клеток ОБ, обладающих высоким пролиферативным потенциалом, и изучение их фенотипических и морфофункциональных особенностей.

Материал и методы

Источники ткани ОБ. Образцы ткани ОБ были получены из операционного материала области верхнего и среднего носового ходов, посылаемого на гистологическое исследование при проведении плановых хирургических вмешательств (БелМАПО, РНПЦ отолорингологии) у 12 пациентов с патологией носа и околоносовых пазух (искривление носовой перегородки). Возраст пациентов 18-45 лет, мужчины и женщины. Площадь образцов - 5-25 мм² (суммарно). Образцы ткани транспортировали и хранили при +4⁰С не более суток в питательной среде

DMEM/F12 (1:1) (Sigma), содержащей антибиотики: гентамицин (100мкг/мл) и амфотерицин Б (10 мкг/мл) (Sigma).

Подготовка клеток для посева, приготовление первичных культур, субкультур. Ткань ОВ промывали в течение нескольких минут в фосфатном буфере, содержащем антибиотики. Ткань механически измельчали на фрагменты размером 1-2 мм², далее подвергали ферментативной обработке растворами 0,5% диспазы1 (Sigma), 0,5% коллагеназы панкреаса краба (Биолот), 0,05% трипсина (Gibco) и их сочетаниями в течение 30-90 мин. Для ткани размера 10 мм² использовали 1 мл раствора ферментов. К дезагрегированной ткани добавляли 5-7 мл среды DMEM/F12, отмывали клетки от ферментов центрифугированием (~200g), резуспензировали в ростовой среде. Клетки культивировали в ростовой среде на основе DMEM/F12, с добавлением эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone), выращивали в пластиковых культуральных флаконах 12,5 см² (BD bioscience) в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при +37°C и влажности 95%. Смену среды осуществляли каждые 3-4 дня. При пассировании культур клетки отделяли от поверхности флакона раствором 0,05% трипсина и 0,02% ЭДТА, пересеивали в дозе 150-200 тыс/мл среды.

Фенотипирование клеток косвенным методом флуоресцирующих антител. В постановке косвенного метода флуоресценции использовали первичные моноклональные антитела в разведении 1:50-1:100 к: нестину; глиальному кислому фибриллярному белку (ГФКБ), цитокератину 18 (K18) (Stem Cell Technologies, Канада), фибронектину (Sigma, США); вторичные антитела, разведение 1:100: козы антикроличьи (AMCA) (Stem Cell Technologies, Канада); кроличьи антимышиные (FITC) (Sigma, США). На покровные стекла наносили 20 мкл суспензии клеток в фосфатном буферном растворе, фиксировали в смеси 4% раствором параформа – 30 мин при комнатной температуре. Стекла промывали фосфатным буферным раствором pH 7,2 (Sigma), просушивали, затем обрабатывали 0,3% раствором тритона X-100 – 5 мин, снова промывали фосфатным буфером. Наносили первичные антитела, инкубировали 2 ч при 37°C, затем после промывки антител, наносили вторичные антитела, инкубировали 30 мин при 37°C, промывали в фосфатном буфере. Клетки в опытных и контрольных препаратах исследовали под люминесцентным микроскопом (Nikon eclipse TS-1000, Япония).

Фенотипирование клеток с помощью метода проточной цитофлуориметрии. В постановке метода проточной цитофлуориметрии использовали антитела к: CD90(FITC), CD105(PE), CD45(PE-Cy7), CD34(APC) (Beckman Coulter), нестину (FITC) (RD system). Клетки в количестве 200-300 тыс. центрифугировали в фосфатном буфере (1000 об/мин) в течение 5

минут, повторяли 2 раза. Клетки резуспендировали в 0,5 мл фосфатного буфера. Для определения экспрессии поверхностных молекул 50 мкл суспензии клеток смешивали с антителами и инкубировали 30 мин при 4°C. Отмывали несвязавшиеся антитела с помощью центрифугирования в фосфатном буфере. Клетки резуспендировали в 400 мкл фосфатного буфера для анализа. Для определения экспрессии цитоплазматических маркеров клетки последовательно фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида (10 мин), пермеализировали в 0,1% растворе сапонины (15 мин), инкубировали с антителами 30 мин при 4°C. Отмывали несвязавшиеся антитела с помощью центрифугирования в фосфатном буфере, резуспендировали в 400 мкл фосфатного буфера. Флуоресценцию регистрировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, США). При анализе проб выделяли регион по параметрам прямого и бокового светорассеяния, в котором анализировали не менее 10000 событий. Для анализа данных использовали программное обеспечение Weasel 3.0. (WEHI, Австралия).

Результаты и обсуждение

Согласно данным литературы, способы накопления биомассы различных типов клеток ОБ имеют свои особенности в зависимости от поставленной на начальном этапе приготовления первичной культуры задачи: выделить популяции, обогащенные обкладочными глиальными, стволовыми и другими типами клеток, или получить гетерогенную по клеточному составу первичную культуру и при дальнейшем пассировании произвести избирательное накопление биомассы определенных типов клеток при создании селективных условий. Важным этапом получения первичной культуры является способ диссоциации исходной ткани на отдельные клетки. Данные литературы свидетельствуют о том, что для этого используют различные протеолитические ферменты и их смеси: коллагеназу, диспазу (13) раствор трипсина и ЭДТА в сочетании с дезоксирибонуклеазой (5) и др. Для повышения степени адгезии клеток различные авторы применяют флаконы, покрытые белками внеклеточного матрикса: коллагеном, ламинином, фибронектином, полиаминокислотами (10, 13). Для последующего культивирования применяют разные по составу питательные среды на основе DMEM, DMEM/F12, альфа-MEM и др. с добавками: сывороткой крупного рогатого скота, ростовыми факторами (EGF, bFGF, NGF, LIF и др.), гормонами (инсулин, трийодтиронин). В наших исследованиях мы использовали среду DMEM/F12 богатую по составу (гормоны, микроэлементы и др.), обеспечивающую питательные потребности, жизнеспособность и высокую пролиферативную активность различных типов клеток.

При получении первичной культуры нами была избрана стратегия получения культур клеток из биоптатов ОБ области средних и верхних носовых ходов человека без направленного выделения определенных типов клеток. С целью оптимизации условий выделения жизнеспособных клеток, имеющих высокий пролиферативный потенциал, были проведены сравнительные исследования диссоциации ткани с использованием следующих ферментов: диспазы 1, коллагеназы панкреаса краба, трипсина и их сочетаний. Установлено, что для диссоциации образцов ткани ОБ на отдельные клетки и их небольшие группы для последующего их прикрепления и пролиферации оптимальными являются условия ферментативной обработки механически измельченной ткани смесью диспазы 1 и коллагеназы панкреаса краба с конечной концентрацией 0,5% в течение 30 мин при 37°C с периодическим пипетированием. В условиях мягкой ферментативной обработки жизнеспособность клеток составляет $87 \pm 5\%$, при этом клетки и фрагменты ткани хорошо (65-75%) адгезируют к поверхности культурального флакона. Увеличение времени инкубации образцов более 30 мин (40-60 мин) приводит к снижению жизнеспособности клеток ($71 \pm 7\%$). Использование трипсина в концентрации 0,5% ведет к наиболее полной диссоциации ткани в течение 30 мин, однако снижает жизнеспособность клеток ($63 \pm 8\%$) и их способность к прикреплению к поверхности флакона.

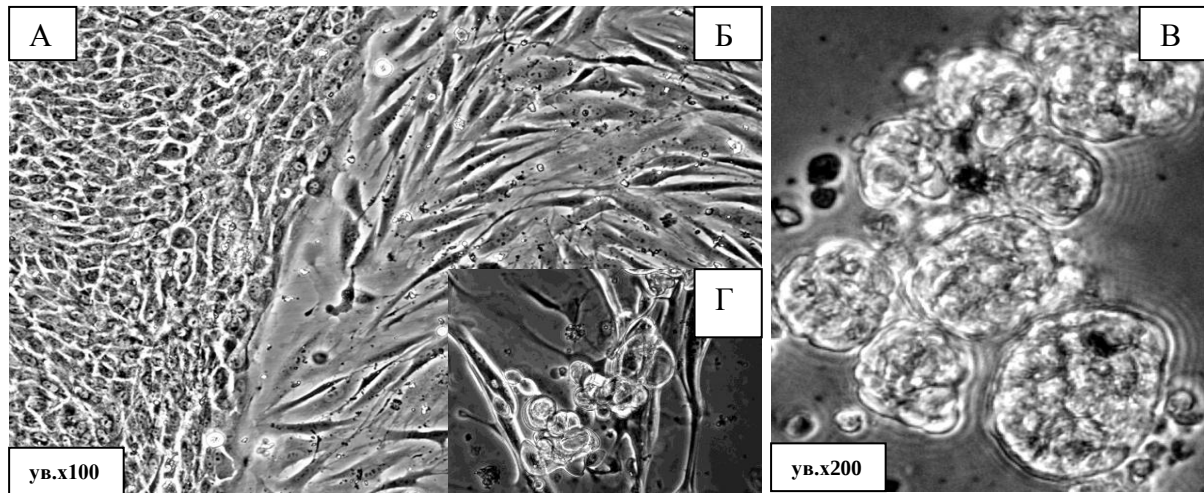
При первичном посеве клеток в количестве не менее 500 тыс в объеме 1 мл ростовой среды DMEM/F12 с добавлением 30% сыворотки адгезия клеток и эксплантатов происходила в течение 1-2 суток. Затем в течение 5 суток ежедневно добавляли свежую ростовую среду, содержащую 10% сыворотки, довели объем до 5 мл. Данные условия обеспечили поддержание высокого пролиферативного потенциала клеток и образование монослоя, который формировался в течение 10- 14 суток.

Морфологический состав первичных культур ОБ был представлен следующими типами клеток: крупными эпителиоподобными клетками с маленьким ядром и одним-двумя ядрышками (рис.1, А), клетками небольших размеров полигональной формы с длинными ветвящимися отростками и крупным ядром, морфологически сходными с глиальными и фибробластоподобными, веретеновидными клетками (рис.1, Б).

В процессе роста в части культур (5 из 12) на 5-7 сутки выявлялась популяция клеток, формирующая флотирующие структуры в виде цитосфер двух типов. Начало первому их типу давали неприкрепившиеся клетки, растущие в условиях суспензии (рис. 1, В), второму типу – очаги быстро делящихся фибробластоподобных клеток в монослое (рис. 1, Г), единичные из

которых или их кластеры с течением времени отделялись от поверхности и далее пролиферировали в суспензии, формируя цитосферы.

Рис. 1. Морфология культивируемых клеток ОВ человека (первичная культура, 7-е сутки *in vitro*), фазово-контрастная микроскопия.



А - клетки эпителиоподобного морфотипа; Б - фибробластоподобные клетки; В - флотирующие в суспензии цитосферы; Г - очаг быстро делящихся фибробластоподобных клеток в монослое.

В результате фенотипирования популяции культивируемых клеток первичных культур выявлены ГФКБ-, цитокератин 18-, фибронектин - и нестин -положительные клетки. Эти данные свидетельствуют о присутствии в культурах клеток глиальной природы, клеток-предшественников эпителия и фибробластов. Наличие нестин-положительных клеток было характерно для флотирующих цитосфер, что свидетельствует о пролиферации в культуре стволовых и прогениторных клеток.

Таким образом, в течение 10-14 суток культивирования клеток ОВ происходит образование равновесной системы из монослойной и суспензионной частей. При отдельном культивировании клеток цитосфер наблюдается снижение степени их пролиферации в субпассажах, что подтверждает зависимость их функциональной и пролиферативной активности от присутствия других типов клеток ОВ, являющихся продуцентами факторов роста. Это согласуется с данными других исследователей, которые показали, что для культивирования популяции сферообразующих клеток требуется дополнительное внесение ряда ростовых факторов в питательную среду (13).

Установлено, что при субпассировании эпителиоподобные клетки замедляют деление, не пролиферируют более 1-2 пассажей, что свидетельствует о их возможной дифференцировке. Фибробластоподобные клетки ведут себя по иному, при пассировании происходит постепенная селекция клеток по пролиферативной активности и адгезивной способности. Уже на первом пассаже можно отметить, что монослой представлен практически одним морфотипом фибробластоподобных клеток. При фенотипировании клеток 3-его пассажа было установлено, что практически все они экспрессируют маркеры мезенхимальных стволовых клеток CD90 ($98,4 \pm 0,7\%$), CD105 ($95,3 \pm 3,2\%$) (рис. 2, А, В), белок промежуточных филаментов недифференцированных клеток – нестин ($98,7 \pm 0,6\%$ (рис. 2, С). При этом до 25-38% клеток экспрессируют маркер гематопозитических стволовых клеток – CD34 (рис. 2, А), в то же время все клетки отрицательны на CD45 – пан-лейкоцитарный маркер (рис. 2, А). Экспрессия гематопозитического маркера CD34 при отсутствии на поверхности клеток CD45 исключает возможность контаминации исходного образца ткани гематопозитическими стволовыми клетками и позволяет идентифицировать 2-й тип стволовых клеток ОВ.

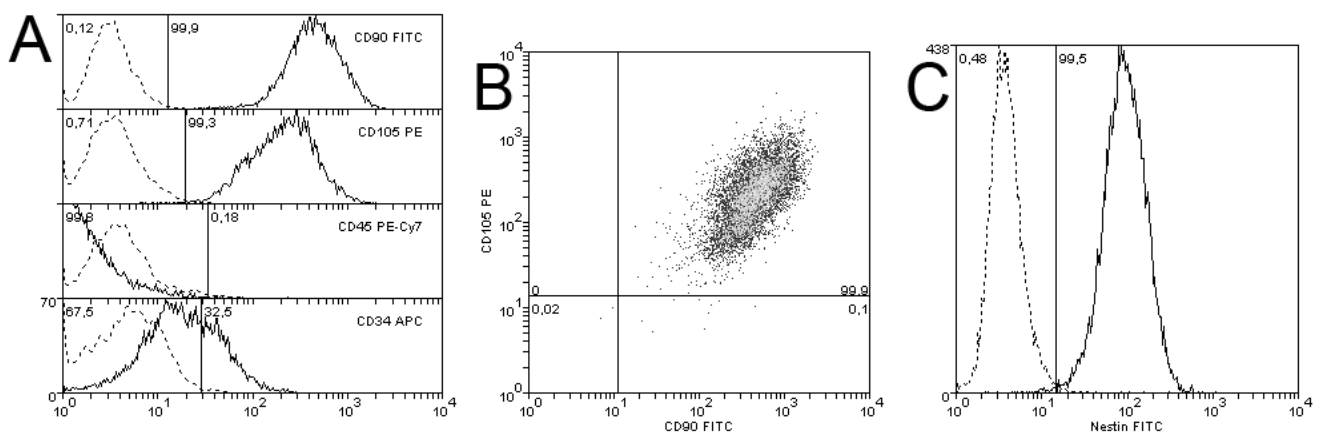


Рис. 2. Экспрессия маркеров мезенхимальных стволовых клеток популяций

фибробластоподобных клеток ОВ человека (3-й пассаж, 5-е сутки). А - экспрессия маркеров: CD105, CD90, CD45, CD34; В- экспрессия маркеров: CD90, CD105; С- экспрессия нестина.

Представляют интерес данные о том, что при трансплантации в куриный эмбрион CD34-негативных стволовых клеток ОВ другой популяции, а именно стволовых клеток нейросфер нейроэпителиального происхождения, они через некоторое время начинают экспрессировать данный маркер (13). Вероятно, экспрессия CD34 частью клеток популяции является

приобретенным свойством, вызванным условиями микроокружения и взаимным влиянием различных типов клеток ОБ в процессе культивирования.

На основании выше изложенных данных популяцию фибробластоподобных клеток можно отнести к недавно идентифицированным обонятельным эктомезенхимальным стволовым клеткам (ЭМСК) (18). Установлено расположение ЭМСК в ОБ, а именно - в *lamina propria*, и они, как полагают, ведут свое происхождение из нервного гребня и имеют сходство по характеристикам с мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга, обладают остеогенным и нейрогенным дифференцировочным потенциалом (18, 21).

Результаты наших исследований показали, что ЭМСК были получены во всех случаях из биоптатов области как верхнего, так и среднего носового ходов. Эти данные свидетельствуют о том, что область локализации популяции ЭМСК клеток шире по сравнению с базальными стволовыми клетками и они присутствуют в соединительной ткани как нейро-, так и респираторного эпителия. Общая площадь, занимаемая ОБ у человека, составляет около 500 мм² или 3% площади слизистой оболочки носовой полости, что относительно меньше, чем у других млекопитающих. Обонятельный нейроэпителий человека располагается отдельными участками и не представляет собой непрерывный однородный пласт ткани, а перемежается респираторным эпителием и имеет вид «шахматной доски». Как установлено, площадь нейроэпителия зависит от индивидуальных особенностей и может сокращаться в течение жизни человека под воздействием внешних факторов, перенесенных вирусных инфекций и др. и замещаться респираторным эпителием (22). Поэтому довольно сложно получить образец ткани нейроэпителия без примеси респираторного. Указанные ограничения следует принимать во внимание при получении культур разных популяций стволовых клеток из тканей обонятельной области для их накопления *in vitro* и последующего использования при трансплантации.

Выводы

Разработана технология выделения и культивирования клеток из области средних и нижних раковин носовой полости человека, охарактеризованы фенотипические и морфофункциональные свойства клеток ОБ:

1. Оптимальными условиями дезагрегации биоптатов ОБ на отдельные клетки и фрагменты для их последующего прикрепления и пролиферации является обработка ткани смесью диспазы 1 и коллагеназы панкреаса краба в конечной концентрации 0,5% в течение 30

мин, которые позволяют выделять жизнеспособные клетки с высокой адгезивной способностью.

2. Ростовая среда на основе DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10-% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота позволяет поддерживать рост в культуре различных морфо- и фенотипов клеток ОБ с высокой пролиферативной активностью. Первичная культура клеток ОБ представляет собой гетерогенную популяцию клеток эпителиальной, фибробластной, глиальной природы, а также стволовых и прогениторных клеток.

3. Установлена пролиферация в субкультурах ОБ двух популяций стволовых и прогениторных клеток, получение которых возможно из области верхних и средних носовых ходов: нестин-положительные клетки, формирующие цитосферы; фибробластоподобные ЭМСК, обладающие высоким пролиферативным потенциалом, которые экспрессируют маркеры мезенхимальных стволовых клеток -CD90, CD105, а также CD34 и нестин.

4. Возможность выделения и накопления в условиях культуры биомассы стволовых и прогениторных клеток двух популяций (нейральных и эктомезенхимальных) из ОБ является основой для разработки протоколов лечения при травматических повреждениях и дегенеративных заболеваниях ЦНС, а также других патологиях, путем трансплантации аутологичного клеточного материала.

Список литературы

1. **Викторов И.В., Сухих Г.Т.** Медико-биологические аспекты применения стволовых клеток. Вестник РАМН, 2002, 4: 24–30.
2. **Викторов И.В., Савченко Е.А., Ухова О.В., Алексеева Н.Ю., Чехонин В.П.** Мультипотентные стволовые и прогениторные клетки обонятельного эпителия. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2006, 4: 185–193.
3. **Lindsay S.L., Riddell J.S., Barnett S.C.** Olfactory mucosa for transplant-mediated repair: a complex tissue for a complex injury? Glia, 2010, 2, 58: 125–134.
4. **Beites C.L., Kawauchi S., Crocker C.E., Calof A.L.** Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. Exp. Cell Res. 2005, 30: 3309–3316.
5. **Roisen F.J., Klueber K.M., Lu C.L.** Human adult olfactory stem cells. Brain Res., 2001, 890:11-22.
6. **Abrous D., Koehl M., Le Moal. M.** Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiology. Physiol. Rev. 2005, 85: 523-569.
7. **Wolozin B., Sunderland T., Zheng B.B., Resau J., Dufy B., Barker J., Swerdlow R., Coon H.** Continuous culture of neuronal cells from adult human olfactory epithelium. J. Mol. Neurosci., 1992, 3:137-146.
8. **Calof A., Mumm J.S., Pim P.C., Shou J.** The neuronal stem cells of the olfactory epithelium. J.Neurobiol., 1998, 36:190-205.
9. **Schwob J.E.** Neural regeneration and the peripheral olfactory system. Anat. Rec., 2002, 269: 33–49.

10. **Hahn C-G, Han L-Y, Rawson NE, Mirza N, Borgmann-Winter K, Lenox RH, Arnold SE.** In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *J Comp Neurol*, 2005, 483:154–163.
11. **Mackay-Sim A.** Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. *Archives Italiennes de Biologie*, 2010, 148: 47-58.
12. **Carter L.A. MacDonald J.L., Roskams A.J.** Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conservative multipotent progenitor phenotype. *J. Neuroscience.*, 2004, 24: 5670–5683.
13. **Murrell W., Feron F., Wetzig A. et all.** Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Develop. Dynam.* 2005; 233(2): 496-515.
14. **Feron F, Perry C, Cochrane J, Licina P, Nowitzke A, Urquhart S, Geraghty T, Mackay-Sim A.** Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain*, 2005, 128: 2951-2960.
15. **Huang H, Chen L, Wang H, Xi H, Gou C, Zhang J, Zhang F, Liu Y.** Safety of fetal olfactory ensheathing cell transplantation in patients with chronic spinal cord injury. A 38-month follow-up with MRI. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* , 2006, 20: 439–443.
16. **Mackay-Sim A., Feron F., Cochrane J, Bassingthwaite L., Bayliss C., Davies W., Fronek P., Gray C., Kerr G., Licina P., Nowitzke A., Perry C., Silburn P. A. S., Urquhart S.** Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. *Brain*, 2008, 131: 2376-2386.
17. **Lima C., Patas-Vital J., Escada P., Hasse-Ferreira A., Capucho C., Peduzzi J.D.** Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J. Spinal Cord Med.*, 2006, 29: 191–203.
18. **Tomé M., Lindsay S.L., Riddell J.S., Barnett S.C.** Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa. *Stem Cells*, 2009; 27(9): 2196-2208.
19. **Nivet N., Vignes M., Girard S.D., Pierrisnard C., Baril N., Devèze A., Magnan J., Lanté F., Khrestchatisky M., Féron F., Roman F.S.** Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(7): 2808–2820.
20. **Pandit S. R, Sullivan J. M, Egger V., Borecki A. A, Oleskevich S.** Functional Effects of Adult Human Olfactory Stem Cells on Early-Onset Sensorineural Hearing Loss. *STEM CELLS*, 2011, 6: 670–677.
21. **Delorme B., Nivet E., Gaillard J., Häupl T., Ringe J., Devèze A., Magnan J., Sohier J., Khrestchatisky M., Roman F.S., Charbord P., Sensebé L., Layrolle P., Féron F.** The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev.*, 2010, 19(6): 853-66.
22. **Feron F., Perry C., McGrath J.J., Mackay-Sim A.** New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998, 124:861–866.

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В ВИРУСОЛОГИИ

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗНЫХ СУБТИПОВ ВИРУСА ГРИППА А В ПРИСУТСТВИИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ИНДУКЦИЮ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА А-549 И ECV-304

***Т.Д. Смирнова, Д.М. Даниленко, М.А. Плотникова, Р.А. Кадырова,
А.В. Слита, М.Ю. Еропкин***

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

Продолжено изучение стимулирующего действия низких доз вируса гриппа А при заражении перевиваемых клеточных линий человека. В настоящем исследовании показано, что клетки эндотелия человека линии ECV-304 отвечали усилением пролиферации не только на субтипы вируса пандемического гриппа А (H1N1pdm) и субтипы вируса эпидемического гриппа А (H3N2, H1N1 и H2N2), но не реагировали на вирус птичьего гриппа H5N1. В отличие от клеток эндотелия, пневмоциты линии А-549 отвечали усилением пролиферации только на вирусы пандемического гриппа А H1N1pdm и на вирус гриппа субтипа H2N2. Слабая биологическая активность клеток А-549 в отличие от клеток ECV-304 отмечена, также, в отношении экспрессии фактора некроза опухоли (ФНО), одного из важнейших провоспалительных цитокинов, играющих определяющую роль в патогенезе инфекции вируса гриппа А. Изучение влияния противовирусных препаратов различной направленности на вирус-индуцированную пролиферацию клеток и экспрессию ФНО не обнаружило корреляции воздействия препаратов на изучаемые эффекты: только ремантадин одновременно ингибировал как вирус-индуцированную пролиферацию клеток, так и экспрессию ФНО. Полученные данные свидетельствуют о различной чувствительности клеток линий ECV-304 и А-549 к вирусам разных субтипов и о различной способности клеток к экспрессии цитокина ФНО. Обсуждается необходимость введения дополнительных критериев для оценки взаимоотношения вируса гриппа А и клеток-хозяина, а также для понимания механизмов действия противовирусных препаратов различной направленности.

Ключевые слова: вирусы гриппа А, клеточные линии А-549, ECV-304, экспрессия ФНО, пролиферация.

В последние годы для изучения вируса гриппа *A in vitro* широко используются клеточные линии человеческого происхождения. Основной мишенью вируса гриппа являются клетки эпителия верхних и нижних дыхательных путей, поэтому наибольшее распространение получила клеточная линия карциномы легких человека A-549, представляющая собой пневмоциты. В клетках A-549 происходит репродукция вируса гриппа А, но титры вируса ниже, чем в клетках почки собаки линии МДСК из-за пониженного синтеза вирусного гемагглютинина (ГА) в результате замедления его транспорта из эндоплазматического ретикулума в транс-Гольджи сеть, где созревание и фолдинг ГА также снижены; цитопатическое действие (ЦПД) вируса в этих клетках выражено слабо (1). Клеточная линия A-549 широко используется для изучения особенностей метаболизма клетки под воздействием вируса гриппа на молекулярном уровне: изучение индукции цитокинов, хемокинов и анализа вовлеченных в репродукцию вируса клеточных белков и генов (2, 3).

Другой мишенью, играющей важную роль в вирусном патогенезе, особенно при инфекции высоко патогенным вирусом птичьего гриппа, являются клетки эндотелия (4, 5). Первичная культура эндотелия сосудов пупочного канатика человека (HUVEC) достаточно давно используется для изучения репродукции вируса гриппа в эндотелиоцитах. Несмотря на невысокую перmissивность клеток HUVEC к вирусу гриппа, показана коагулянтная активность и продукция различных цитокинов в этих клетках при вирусной инфекции (6, 7, 8, 9). Поскольку первичная культура клеток HUVEC имеют ряд недостатков для исследования: сложность получения, низкий клеточный пул, ограниченный жизненный срок и индивидуальные различия полученных клеточных культур (10), мы использовали для своих исследований постоянную клеточную линию эндотелия человека ECV-304, полученную Takahashi с соавт. (11) из спонтанно трансформированных эндотелиоцитов пуповинной вены человека. Многочисленные морфологические, иммунохимические и биохимические исследования, а также проведенная цитогенетическая характеристика показали, что клетки ECV-304 могут быть использованы в качестве эндотелиальной клеточной модели для решения ряда медико-биологических вопросов (12, 13, 14). Известно, что клетки ECV-304 широко используются для изучения фармакологических препаратов, однако, эти клетки пока редко используются при изучении вируса гриппа (15, 16).

В связи с возможностью появления новых штаммов с пандемическим потенциалом, таких как вирус пандемического гриппа 2009 г. A(H1N1)pdm, а также с постоянной регистрацией новых случаев заболеваемости птичьим гриппом, возникает необходимость более

углубленного изучения взаимодействия вируса гриппа А с клетками человека. Ранее нами было обнаружено, что вирус гриппа А субтипов H3N2 и H1N1pdm при низких дозах заражения оказывает стимулирующее действие не только на клетки человека лимфобластоидного происхождения (17), но и на клетки эндотелия человека линии ECV-304 (15). В настоящем исследовании было продолжено изучение влияния низких заражающих доз других подтипов вируса гриппа А как на клетки ECV-304, так и на клетки A-549.

По-прежнему остается актуальным вопрос о рекомендации противовирусных препаратов для лечебного и профилактического применения. Несмотря на то, что все штаммы пандемического гриппа *in vitro* являются ремантадин-резистентными, в клинической практике существуют противоречивые данные об эффективности применения ремантадина в качестве противовирусного препарата при лечении гриппа.

Традиционный метод оценки противовирусной активности препарата *in vitro* состоит в оценке его способности подавлять ЦПД вируса в пермиссивных клетках почки собаки линии МДСК, однако, этот метод не применим для большинства клеточных линий человеческого происхождения, в которых вирус гриппа А не вызывает ЦПД (18). Более того, существует ряд препаратов, которые не демонстрируют антивирусной активности *in vitro*, тем не менее, в условиях *in vivo* оказываются эффективными. В этой связи, необходимо вводить дополнительные критерии для оценки действия противовирусных препаратов.

Ранее нами была исследована активность ряда противовирусных препаратов по их воздействию на транслокацию вирусного нуклеопротеина (НП) из клеточного ядра в цитоплазму, а также на эффекты, оказываемые вирусом на клетку: пролиферацию и апоптоз. Нами было показано, что исследуемые препараты (триазавирин, ремантадин, рибавирин) как в случае резистентности к ним вирусов, так и в отсутствии противовирусной активности в стандартном тесте *in vitro* на клетках МДСК, проявляют либо ингибирующие свойства (в виде подавления транслокации вирусного РНП из ядра в цитоплазму и подавления пролиферации клеток и апоптоза, индуцированных вирусом), либо стимулирующие действие (усиление апоптоза в присутствии рибавирина) (19).

В задачу настоящего исследования входило изучение влияния разных субтипов вируса гриппа А на пролиферацию клеток линий A-549 и ECV-304 при разных дозах заражения вирусом и на экспрессию в этих условиях фактора некроза опухоли, являющегося одним из основных цитокинов, индуцируемых вирусом гриппа, а также оценка влияния на эти критерии

противовирусных препаратов различной направленности действия (подавляющих и не подавляющих ЦПД вируса, индукторов апоптоза, иммуномодуляторов).

Материал и методы

Вирусы. В работе использовали следующие вирусы гриппа А: Санкт-Петербург/5/09 (H1N1pdm), Санкт-Петербург/2/10 (H1N1pdm), Брисбен/10/07 (H3N2), Сингапур/1/57 (H2N2), Хабаровск/74/77 (H1N1), Курица/Курган/5/05 (H5N1). Вирус-содержащим материалом являлась аллантоисная жидкость от инфицированных 9-дневных куриных эмбрионов. Титр цитопатического действия (ТЦД), характеризующий инфекционную активность вируса, определяли на клетках МДСК и, который, как правило, составлял 6-7 lg ТЦД₅₀. Используемые нами обозначение «доза заражения» соответствует наибольшему десятикратному разведению вируса, т.е. разведение вируса 10^{-7} равно 1 дозе заражения, 10^{-6} -10 дозам, 10^{-5} -100 дозам и т.д..

Клеточные линии. Перевиваемые клеточные линии карциномы легких человека А-549 и эндотелия человека ECV-304 получены из Коллекции клеточных культур ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития. Для пересева перевиваемых клеточных линий использовали питательную среду альфа MEM (без антибиотиков) с добавлением 2% фетальной сыворотки (ф.с.). Питательные среды и фетальная сыворотка получены из фирмы «БИОЛОТ».

Противовирусные препараты. Триазавирин (отечественный препарат, разработанный в Институте органического синтеза Уро РАН, находится на II фазе клинических испытаний), использовали в концентрации 50 мкг/мл. Ремантадин (Sigma, Германия) - в концентрации 20 мкг/мл. Рибавирин (ICN, США) - в концентрации 100 мкг/мл. Ингавирин (аптечный препарат фирмы ОАО «Валента Фармацевтика») - в концентрации 100 мкг/мл. Все препараты разводили в среде альфа MEM.

Проведение опыта. Методика определения влияния вируса гриппа на пролиферацию клеток описана в статье Смирновой с соавт. 2011. Опыт проводили в 24-луночных пластинах. Для проведения опыта по определению экспрессии ФНО методика заражения клеток вируса была несколько изменена. Заражение клеток вирусом проводили в суспензии, для чего 1×10^5 клеток /мл соединяли с 1 мл вируса соответствующего разведения, с контактом 1 час при $+37^{\circ}$ С, после чего клетки освобождали от вирусосодержащей жидкости центрифугированием, осадок клеток ресуспендировали среде альфа MEM+2% ф.с. с добавлением 2 мкг/мл трипсина и разливали в лунки по 1мл. Подсчет выросших клеток проводили в камере Фукса-Розенталя 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.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Оценку уровня экспрессии ФНО проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров, синтезированных фирмой «ДНК-синтез», Россия (согласно инструкции). Все используемые реагенты получены от фирмы «Promega». Результаты амплификации регистрировали в реальном времени с последующим анализом ампликонов по кривой плавления и электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием. Анализ данных проводили прямым сравнением графиков накопления. Уровень экспрессии ФНО определяли как $2^{-\Delta n}$, где n-значение порогового цикла C(t), Δn – разность между значениями C(t) анализируемого образца и C(t) контроля.

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

Результаты

Изучение пролиферации клеток ECV-304 и A-549 при заражении высокими и низкими дозами вирусов гриппа А разных субтипов.

Ранее нами было обнаружено, что в эндотелиальных клетках человека линии ECV-304 происходит увеличение пролиферации при заражении их очень низкими дозами эпидемического вируса гриппа А Брисбен/10/07 (H3N2) и пандемического вируса гриппа А СР6/56/09 (H1N1)pdm (15).

В настоящем работе мы продолжили эти исследования с другими подтипами вируса гриппа А: Хабаровск /74/77 (H1N1), Сингапур/1/57 (H2N2) и Курица/Курган /5/05 (H5N1) не только на клетках эндотелия человека ECV-304, но также на клеточной линии пневмоцитов человека A-549. Данные, представленные в табл. 1 свидетельствуют, что все исследуемые подтипы вируса гриппа А, за исключением вируса птичьего гриппа Курица/Курган/5/05 (H5N1), были способны стимулировать пролиферацию клеток эндотелия человека ECV-304 при очень низкой дозе заражения, тогда как клетки пневмоцитов человека A-549 реагировали усилением пролиферации только при заражении пандемическим вирусом (H1N1)pdm и вирусом Сингапур/1/57 подтипа H2N2. Ремантадин подавлял как цитотоксическое действие вирусов на клетки, вызываемое высокими дозами заражения вирусов, на что указывает увеличение их

количества (но не выше, чем в контроле), так и ингибировал пролиферацию клеток, стимулированных низкими дозами вирусов (табл.1).

Таблица 1. Влияние разных подтипов вируса гриппа А на пролиферацию клеток человека А-549 и ECV-304 при заражении разными дозами в присутствии и отсутствии ремантадина.

	А/СПб/5/09 H1N1pdm		А/Брисбен/10/07 H3N2		А/Хабаровск/74/77 H1N1		А/Сингапур/1/57 H2N2		А/Курица/Курган/5/ 05 H5N1	
Дозы заражения										
	100 доз	1 доза	100 доз	1 доза	100 доз	1 доза	100 доз	1 доза	100 доз	1 доза
Клетки А-549. Доля выросших клеток, % от контроля										
Без препарата	69,4 ±5,9	135,5 ±10,4	62 ±4,8	98,1 ±7,2	61,1 ±5,2	95,8 ±7,8	67,3 ±4,9	127,7 ±11,3	14,9 ±0,9	100 ±8,6
Ремантадин	75 ±6,7	77,3 ±6,1	70,4 ±5,8	74,5 ±5,1	71,3 ±6,4	99,3 ±8,3	92,5 ±8,2	98,5 ±7,7	68,3 ±4,7	88,7 ±5,9
Клетки ECV-304. Доля выросших клеток, % от контроля										
Без препарата	64,3 ±5,3	120,9 ±10,2	54,4 ±4,0	127,5 ±10,2	48,4 ±3,8	120 ±9,7	75,2 ±5,6	124 ±8,9	2,3 ±0,1	79,3 ±5,7
Ремантадин	80 ±6,8	89 ±5,9	84,5 ±6,3	98,9 ±7,4	90,5 ±7,4	99 ±6,9	89,8 ±6,6	93 ±6,5	9,8 ±0,7	91,9 ±7,2

Изучение экспрессии ФНО в клетках ECV-304 и А-549 при заражении высокими и низкими дозами вируса гриппа А/СПб/02/10 (H1N1pdm).

В следующей серии опытов мы попытались проследить влияние репродукции вируса гриппа СПб/2/10 (H1N1)pdm в клетках А-549 и ECV-304 при высокой и низкой дозах заражения (100 и 1 доза соответственно) на пролиферацию клеток и индукцию экспрессии в них фактора некроза опухоли (ФНО) в присутствии противовирусных препаратов: триазавирина, ингавирина, ремантадина и рибавирина.

Как уже было показано выше, высокие дозы вируса пандемического гриппа вызывали снижение пролиферации клеток, тогда как при низких дозах заражения наблюдалось усиление пролиферации как эндотелиоцитов (ECV-304), так и пневмоцитов (А-549). Действие противовирусных препаратов было сходным на обеих клеточных линиях: стимулированную вирусом пролиферацию клеток подавляли триазавирин, ремантадин и рибавирин, в то время

как ингавирин усиливал пролиферацию клеток ECV-304 и A-549, зараженных низкими дозами вируса (рис.1 и 2).

Рис.1. Влияние противовирусных препаратов на вирус-индуцированную пролиферацию клеток A-549.

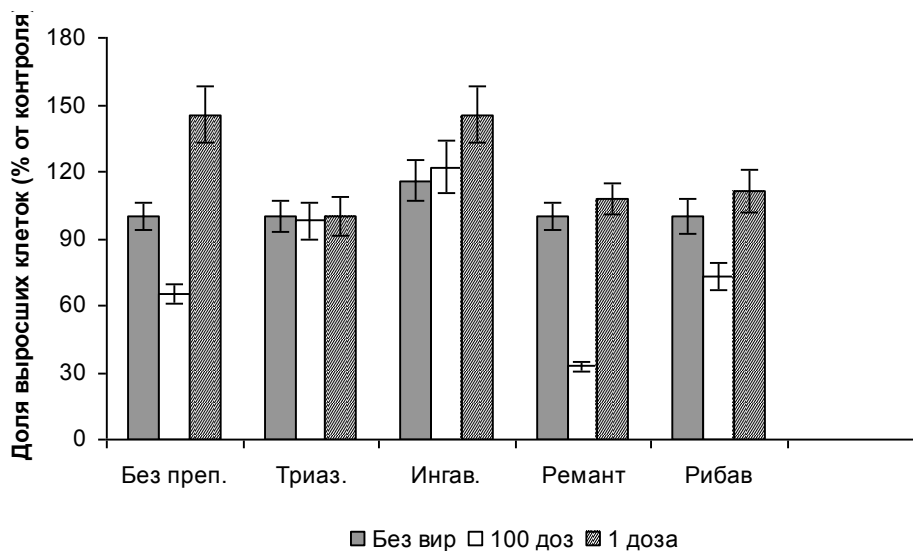


Рис. 2. Влияние противовирусных препаратов на вирус-индуцированную пролиферацию клеток ECV-304.

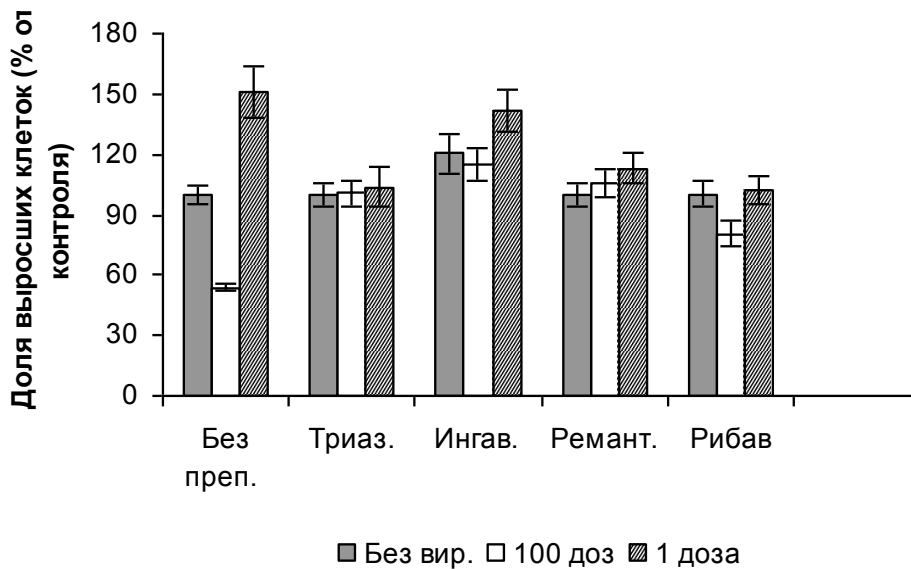


Рис.3. Влияние противовирусных препаратов на вирус-индуцированную экспрессию ФНО в клетках А-549.

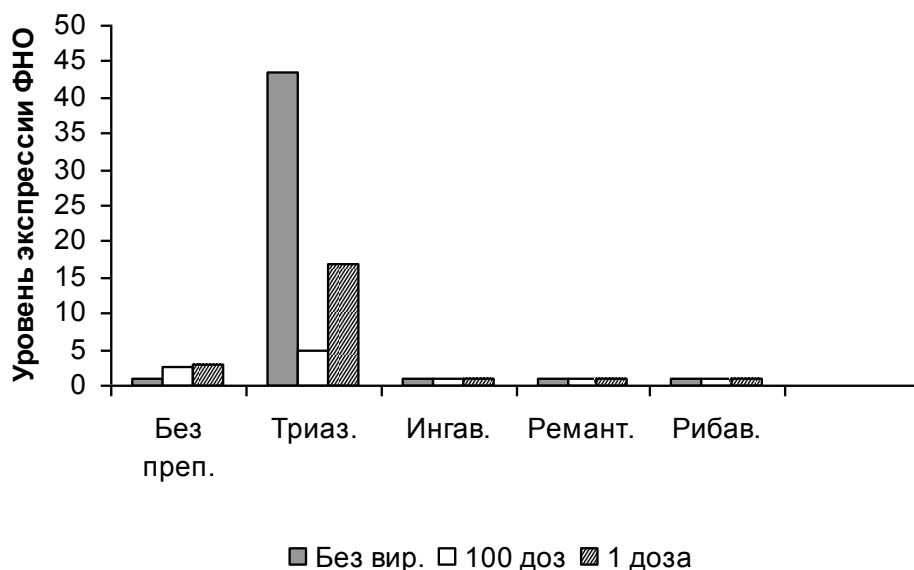
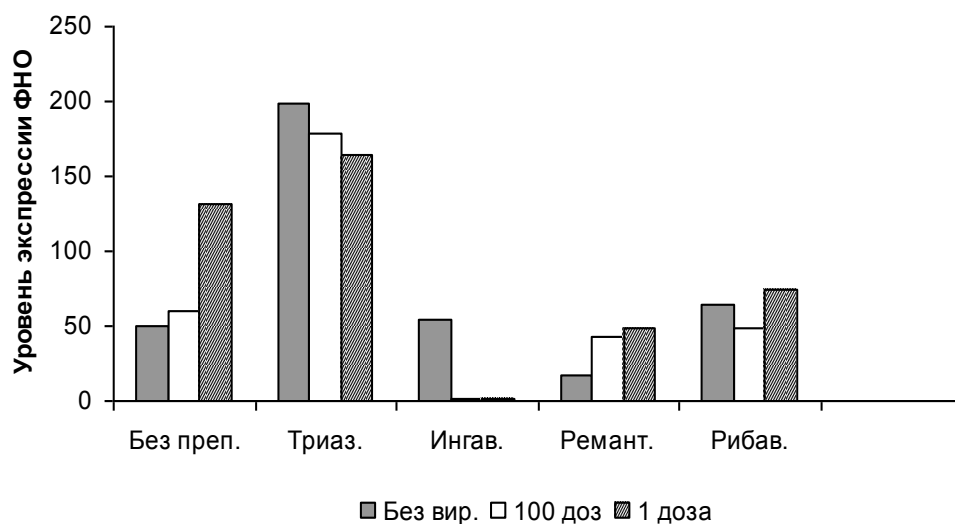


Рис. 4. Влияние противовирусных препаратов на вирус-индуцированную экспрессию ФНО в клетках ECV-304



По отношению к экспрессии ФНО клетки ECV-304 и А-549 обнаружили различную биологическую активность. В клетках эндотелия активность цитокина определялась как в контрольных, незараженных вирусом клетках, так и зараженных вирусом гриппа, причем экспрессия ФНО возрастала по мере снижения дозы вируса, что соответствовало изменению

пролиферации клеток. В то же время в контрольных клетках A-549 экспрессия ФНО отсутствовала, а в присутствии вируса отмечался очень низкий ее уровень. Из всех изучаемых препаратов только триазавирин индуцировал высокую экспрессию ФНО в контрольных клетках, как эндотелия, так и в пневмоцитах человека. В присутствии вируса в клетках ECV-304 триазавирин вызывал снижение экспрессии ФНО при уменьшении дозы заражения вирусом, тогда как в клетках A-549 экспрессия ФНО была значительно снижена при высокой дозе заражения, но повышалась при низкой дозе заражения. Другие препараты показали в незараженных вирусом клетках ECV-304 очень невысокий уровень экспрессии ФНО: ингавирин примерно на уровне контроля, ремантадин несколько ниже, а рибавирин не намного выше. В зараженных вирусом клетках добавление ингавирина полностью подавляло экспрессию ФНО, а в присутствии ремантадина и рибавирина экспрессия этого цитокина оставалась низкой. В клетках A-549 при добавлении ингавирина, ремантадина или рибавирина экспрессия ФНО не отмечалась ни в контроле, ни при заражении вирусом.

Обсуждение

Различия между клеточными линиями эпителиального (A-549) и эндотелиального (ECV-304) происхождения проявились прежде всего в их реакции на заражение очень низкими дозами вируса гриппа А различных субтипов. Клетки эндотелия отвечали усилением пролиферации практически на все субтипы вируса гриппа А, за исключением вируса птичьего гриппа, тогда как только вирусы пандемического гриппа (H1N1)pdm и вирус Сингапур1/57 подтипа H2N2 были способны вызвать стимуляцию пролиферации клеток A-549.

Клетки ECV-304 и A-549 обнаружили также большое различие в способности экспрессировать ФНО, как контрольными незараженными вирусом клетками, так и в присутствии разных доз вируса, и, особенно, при добавлении противовирусных препаратов: наблюдалась активная экспрессия ФНО в клетках ECV-304 и либо слабая, либо полное отсутствие экспрессии ФНО в клетках A-549.

По данным He et. al. (20) вирус гриппа вызывает в зараженных клетках задержку прохождения клеточного цикла в фазе $G_0 - G_1$, при этом происходит уменьшение количества гиперфосфорилированного белка ретинобластомы, необходимого для прохождения через позднюю фазу G_1 в S фазу, а также изменяется количество других ключевых молекул, участвующих в регуляции клеточного цикла (p21, циклин E, циклин D1). Фаза $G_0 - G_1$ клеточного цикла наиболее благоприятна для репродукции вируса гриппа, после чего клетка может подвергаться апоптозу или цитолизу (20). Известно, что в процессе вирусной инфекции

происходит увеличение активности белка p53, который вовлекается не только в остановку клеточного цикла, но и в индукцию гибели клетки через апоптоз. Апоптоз в клетках, инфицированных вирусом гриппа, может индуцироваться многими факторами, из них основными являются цитокины ФНО и интерферон (ИФН) 2 типа, и обнаружена тесная связь этих цитокинов с белком p53 (21, 22). Указанные выше работы проведены, в основном, на клетках A-549, инфицированных вирусом гриппа с очень высокой множественностью инфекции (МОИ). В наших опытах при дозе заражения вирусом 100, МОИ соответствовала 0,001, а при 1 дозе заражения МОИ=0,00001. При МОИ 0,001 нами наблюдалось проявление вирусной инфекции в виде апоптоза, цитолиза, ЦПД, но при очень низких дозах заражения (МОИ 0,00001) происходила стимуляция пролиферации клеток как лимфобластоидных, с последующим увеличением апоптоза (17), так и некоторых монослойных клеточных линий ECV-304, T-98 (15), а также, как показано в настоящей работе, под воздействием только некоторых подтипов вируса гриппа А (H1N1pdm и H2N2), в клетках A-549. По нашим данным усиление пролиферации в клетках ECV-304 и A-549 сопровождалось усилением экспрессии ФНО, уровень которой был намного выше, чем при более высокой дозе заражения клеток вирусом.

Исследуемые нами противовирусные препараты (триазавирин, ремантадин, рибавирин) оказывали одинаковое – ингибирующее - действие на стимулированную вирусом гриппа А пролиферацию клеток ECV-304 и A-549, тогда как ингавирин, являющийся иммуномодулятором, в наших опытах показал усиление пролиферации контрольных, незараженных вирусом клеток ECV-304 и A-549, как при заражении высокими, так и низкими дозами вируса гриппа. Апоптоз, индуцируемый вирусом гриппа А в клетках ECV-304 и A-549 только высокими дозами заражения, подавлялся исследуемыми препаратами (триазавирин, ремантадин, ингавирин), за исключением рибавирина, который повышал апоптоз в зараженных вирусом гриппа клетках (19).

Результаты, полученные нами при изучении экспрессии одного из важнейших провоспалительных цитокинов - фактора некроза опухоли, играющего также значительную роль в патогенезе гриппозной инфекции, оказались интересными и неоднозначными. Отмечены также значительные различия в биологической активности между пневмоцитами (A-549) и эндотелиоцитами (ECV-304): разная чувствительность к различным субтипам вируса гриппа А, а также активная экспрессия ФНО в клетках эндотелия в отсутствии вируса и еще более усиливающаяся в его присутствии, особенно при очень низких дозах вируса, и полное

отсутствие экспрессии ФНО в клетках А-549 без вируса и очень низкая экспрессия с вирусом. Наши результаты о различной биологической активности клеток разного происхождения только подтверждают данные, полученные другими авторами, свидетельствующие о низкой экспрессии ФНО в клетках А-549, зараженных вирусом гриппа, которая усиливалась после предобработки этих клеток ФНО или ИФН (23) и активной экспрессии этого цитокина в эпителиальных клетках легкого свиньи (24).

Полученные нами данные по влиянию противовирусных препаратов (триазавирина, ремантадина, рибавирина и ингавирина) на пролиферацию, апоптоз и индукцию ФНО в клетках, зараженных разными дозами вируса, не дают какого-либо определенного ответа о механизмах противовирусного действия этих препаратов. Повышение экспрессии ФНО в инфицированных вирусом гриппа клетках в присутствии триазавирина невозможно связать с ингибирующим действием препарата как на апоптоз, так и на усиленную пролиферацию вирус-инфицированных клеток. Так же как и снижение экспрессии ФНО в присутствии рибавирина, трудно согласовать с его влиянием на повышение апоптоза в зараженных вирусом клетках. В то же время, подавление экспрессии ФНО в клетках, зараженных вирусом в присутствии ингавирина, вполне согласуется с усилением их пролиферации и подавлением апоптоза (неопубликованные данные). Ингибирующее влияние ремантадина на апоптоз, индуцированный вирусом, вполне согласуется с понижением экспрессии ФНО, но не объясняет его ингибирующего действия на пролиферацию клеток.

Таким образом, изучение участия только одного ФНО в исследуемых нами процессах совершенно недостаточно. Полученные нами данные свидетельствуют, что для понимания механизмов взаимоотношения вируса гриппа А различных субтипов с клетками человека в разных условиях инфицирования, а также, действия противовирусных препаратов, необходимо вводить дополнительные критерии и клеточные тест-системы, в частности, изучение экспрессии и продукции интерферона, в дополнение к традиционным методам *in vitro* определения подавления ЦПД вируса гриппа на клетках МДСК и *in vivo* на мышах. Используемые нами клетки эндотелия человека ECV-304 являются подходящей клеточной моделью для изучения экспрессии различных цитокинов в инфицированных вирусом гриппа клетках и определения их роли в механизме действия антивирусных препаратов.

Список литературы

1. **Ueda M., Yamate M., Du A., Daidoji T., Okuno Y., Ikita K., Nakaya T.** Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus. *Virus Res.* 2008, 136, 1-2: 91-97.
2. **Vester D., Rapp E., Gade D., Genzel Y., Reichi U.** Quantitative analysis of proteome alterations in human influenza A virus-infected mammalian cell lines. *Proteomics.* 2009, 9: 3316-3327.
3. **Zang C., Yang Y., Zhou X., Liu X., Song H., He Y., Huang P.** Highly pathogenic avian A virus H5N1 NS1 protein induces caspase-dependent apoptosis in human alveolar basal epithelial cells. *Virol J.* 2010, 7: 51-57.
4. **Swayne D.** Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis.* 2007, 51(1 Suppl): 242-249.
5. **Yao L., Korteweg C., Hsueh W., Gu J.** Avian influenza receptor expression in H5N1-infected and noninfected human tissues. *FASEB J.* 2008, 22 (3): 733-740.
6. **Visseren F., Verkerk M., Bouter K., Diepersloot R., Erkelens D.** Interleukin-6 production by endothelial cells after infection with influenza virus and cytomegalovirus. *J Lab Clin Med.* 1999, 134 (6): 623-630.
7. **Visseren F., Bouwman J., Bouter K., Diepersloot R., de Groot P., Erkreman D.** Procoagulant activity of endothelial cells after infection with respiratory viruses. *Thromb Haemost.* 2000, 84 (2): 319-324.
8. **Ishiguro N., Takada A., Yoshioka M., Ma X., Kikuta H., Kobayashi K.** Induction of interferon-inducible protein-10 and monokine induced by interferon-gamma from human endothelial cells infected with influenza A virus. *Arch Virol.* 2004; 149(1): 17-34.
9. **Sumikoshi M., Hashimoto K., Kawasaki Y., Sakuma H., Suzutani T., Suzuki H., Hosova M.** Human influenza virus infection and apoptosis induction in human vascular endothelial cells. *L. Med Virol.* 2008, 80 (6): 1072-1078.
10. **Склянкина Н.Н., Болдырева Н.В., Щегловитова О.Н.** Различия в функциональной активности культивируемых клеток эндотелия кровеносных сосудов человека, полученных от разных доноров. *Цитология.* 2011, 53 (4): 341-346.
11. **Takahashi K., Sawasaki Y., Hata J., Mukai K., Goto T.** Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In vitro Cell Develop.* 1990, 26: 265-274.
12. **Functional characterization of spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV-304: use in an in vitro model of angiogenesis.** *Exp Cell Res.* 1996, 225: 171-185.
13. **Гильяно Н.Я., Семенова Е.Г., Федорцева Р.Ф., Коневега Л.В.** Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304. *Цитология.* 2008, 50 (7): 576-584.
14. **Ярцева Н.М., Федорцева Р.Ф.** Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304. *Цитология.* 2008, 50 (7): 568-575.
15. **Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Гудкова Т.М., Писарева М.М., Кадырова Р.А., Слита А.М.** Влияние различных инфицирующих доз вирусов гриппа А на пролиферацию перевиваемых клеток человека. *Клеточные культуры. Информационный бюллетень.* 2011, 27: 3-12.
16. **Kido H., Okumuro Y., Takahashi E., Pan H-Y., Wang S., Yao D., Yao M., Chida J., Yano M.** Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012, 1824: 186-194.
17. **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 противовирусных препаратов. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2009, 24: 25-34.

18. 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 человека. Вопросы вирусологии. 2011, 56 (6): 14-19.

19. Даниленко Д.М., Смирнова Т.Д., Еропкин М.Ю., Деева Э.Г., Киселев О.И. Изучение влияния ремантадина, рибавирина и триазавирина на репродукцию вирусов гриппа А в монослойных и лимфобластоидных клеточных линиях человеческого происхождения. Вопросы вирусологии. 2012 (в печати).

20. He Y., Xu K., Keiner B., Zhou J., Czudai V., Li T., Chen Z., Liu J., Klenk H-D., Shu Y., Sun B. Influenza A virus replication induces cell cycle arrest in G₀/G₁ phase. J. Virol. 2010, 84 (24): 12832-12840.

21. Turpin E., Luke K., Jones J., Tumpey T., Konan K., Schultz-Cherry S. Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. J. Virol. 2005, 79(14): 8802-8811.

22. Rivas C., Aaronson S., Munoz-Fontela C. Dual role of p53 in innate antiviral immunity. Viruses. 2010, 2 : 298-313.

23. Veckman V., Osterland P., Fagerland R., Melen K., Matikainen S., Julkinen I. TNF- α and IFN- α enhance influenza-A-virus-induced chemokine gene expression in human A-549 lung epithelial cells. Virillogy. 2006, 345: 96-104.

24. Seo S., Webster R. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells. J.Virol.2002, 76(3): 1071-1076.

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ТРАНСФОРМАЦИЙ КЛЕТОЧНОГО МОНОСЛОЯ VERO-V В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВРЕМЕНИ РЕПРОДУКЦИИ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ

Д.В. Роменская, Т.Б. Манин, Б.Л. Манин

Федеральный центр охраны здоровья животных, ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир,

romenskaya@arriach.ru

Представлены результаты взаимодействия метапневмовируса птиц с клетками перевиваемой культуры почки африканской зеленой мартышки Vero-V на разных сроках культивирования. Проведена корреляция между степенью поражения клеток и монослоя с количеством вирусного агента, выявленного титрованием.

Ключевые слова: репродукция вируса, метапневмовирус птиц, Vero-V, синцитий, симпласт.

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

Репродукция вирусов животных и птиц на чувствительных клеточных линиях является основой получения антигенов для производства вакцин. Исследование взаимодействия вирусов и клеток позволяет изучить этапы и динамику этого процесса, а также получить информацию о вероятных изменениях, происходящих в тканях и клетках при патологических процессах *in vivo*.

Метапневмовирусная инфекция (МПВИ) – высококонтагиозное вирусное заболевание индеек, кур и других видов домашней и дикой птицы; характеризуется воспалительными процессами верхних дыхательных путей и инфраорбитальных синусов, сопровождается затрудненным дыханием, чиханием, хрипами и назальными выделениями. Возбудителем заболевания является РНК-содержащий вирус рода *Metapneumovirus*, семейства *Paramyxoviridae* (1, 2, 3, 4). Применение вакцин, полученных на основе культурального вируса, создаёт полноценный иммунитет от заболевания метапневмовирусной инфекцией птиц (5, 6). В доступной литературе практически нет сведений о цитоморфологических изменениях в клетках и тканях при поражении метапневмовирусом *in vivo*.

Целью наших исследований было изучить цитоморфологические трансформации клеток и клеточного монослоя постоянной линии Vero-V и определить время максимального накопления вируса.

Материал и методы

Вирусный материал. Мы использовали изолят метапневмовируса птиц подтипа В.

Культура клеток. Культивирование метапневмовируса птиц и определение его инфекционной активности проводили в перевиваемой культуре клеток почки африканской зеленой мартышки Vero-V. Температура инкубации нормальной и зараженной клеточной культуры равнялась 37,5-38°C. Клетки Vero-V, выращенные на покровных стеклах в пенициллиновых флаконах, окрашивали 0,001%-ным раствором флуоресцирующего красителя акридинового оранжевого в течение 2 минут, после чего анализировали под люминесцентным микроскопом МЛ-26. Неокрашенные клетки исследовали с помощью фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Olympus CKX-4.

Питательные среды и растворы. В качестве ростовой среды для линии клеток Vero-V использовали питательную среду синтетическую ПСС (аналог распространенной среды DMEM) с добавлением 10% сыворотки крови КРС, pH среды 7,0 -7,2.

В качестве поддерживающей среды для вируса использовали питательную среду ПСС с 2% инаktivированной при 56°C в течение 30 мин сывороткой крови КРС, pH среды 7,3-7,5. Монослой клеток Vero-V отмывали солевым раствором Хенкса - pH 7,1 – 7,2. Коррекцию величины pH среды проводили 7,5% раствором бикарбоната натрия.

Для предотвращения бактериального пророста сред и раствора Хенкса добавляли антибиотики в общепринятой концентрации.

Культуральные сосуды и аппараты. Лабораторное культивирование метапневмовируса птиц проводили во флаконах емкостью 50 см³ фирмы «Costar», а также в роллерных сосудах емкостью 3,0 дм³ и полезной площадью 620 см². Материал во флаконах культивировали стационарно, а для выращивания в сосудах использовали роллерную установку промышленного типа с барабанами на 12 сосудов и скоростью вращения 8-12 об/час.

Определение инфекционной активности. Инфекционную активность метапневмовируса птиц определяли титрованием в 48-часовой культуре клеток Vero-V. Вирус титровали в десятикратном разведении от 10⁻¹ до 10⁻⁹. Чтобы получить последовательное 10-кратное разведение, брали по 1,0 см³ вирусной суспензии и последовательно вносили в пенициллиновые флаконы, содержащие по 9,0 см³ питательной среды. Материалом каждого разведения заражали по 4 флакона с культурой клеток путем внесения в поддерживающую среду по 1,0 см³ соответствующего разведения суспензии инфицированных клеток в поддерживающей среде. В качестве контроля при титровании оставляли 4 флакона с

незараженной культурой клеток. Учет цитопатического действия вируса (ЦПД) проводили через каждые 24 часа. Титр вируса выражали в $\lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$ и рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина.

Результаты и обсуждение

Нами были изучены стадии взаимодействия штамма метапневмовируса подтипа В с клетками Vero-V в процессе получения культурального антигена для производства вакцины против данной инфекции. Цитопатическое действие вируса изучалось с помощью фазово-контрастной микроскопии и цитохимического метода (окрашивание нативных препаратов флуоресцирующим красителем акридиновым оранжевым и дальнейшее их изучение с помощью люминесцентной микроскопии).

Интakтный монослой культуры клеток Vero-V представлен эпителиоподобными клетками. В сформированном монослое мембраны клеток плотно прилегают, образуя псевдосинцитий (рис.1). Акридиновый оранжевый окрашивает ядра клеток в зелёный цвет, а ядрышки и цитоплазму – в различные оттенки оранжевого.

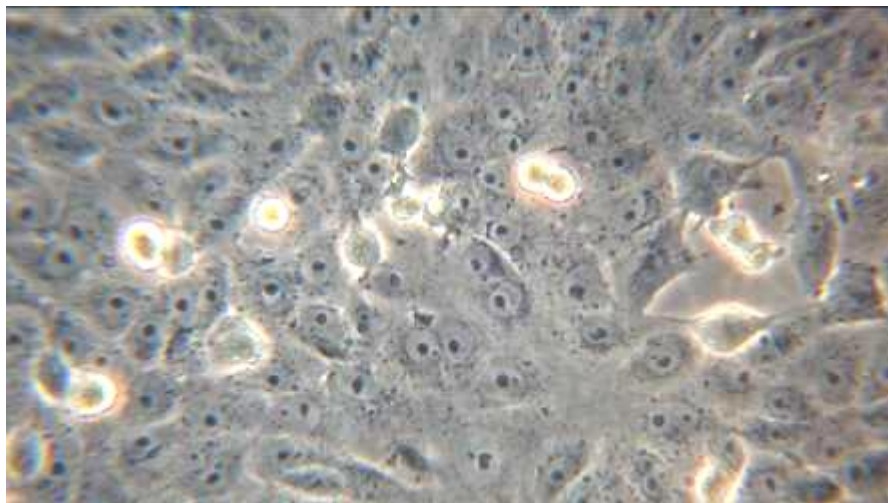


Рис.1. Интактная культура клеток Vero–V (фазово-контрастная микроскопия).

Патологические изменения в клетках Vero-V наблюдаются через 20-24 часа после заражения вирусом. Основным морфологическим признаком репродукции вирусов служит образование многоядерных клеток. Через 36 часов культивирования начинают формироваться симпласты, в которых может находиться до 50 и более ядер. При нормальной репродукции вируса симпласты формируются на 70% площади монослоя (рис.2). По

морфологическим признакам симпласты на этой стадии имеют неразрушенную наружную мембрану.

В поле зрения люминесцентного микроскопа внутри симпласта в цитоплазме наблюдается усиление оранжевого свечения, что является признаком накопления РНК. Ядра клеток также имеют неразрушенную оболочку, чёткую структуру; в то же время усиливается оранжевое свечение ядрышек.

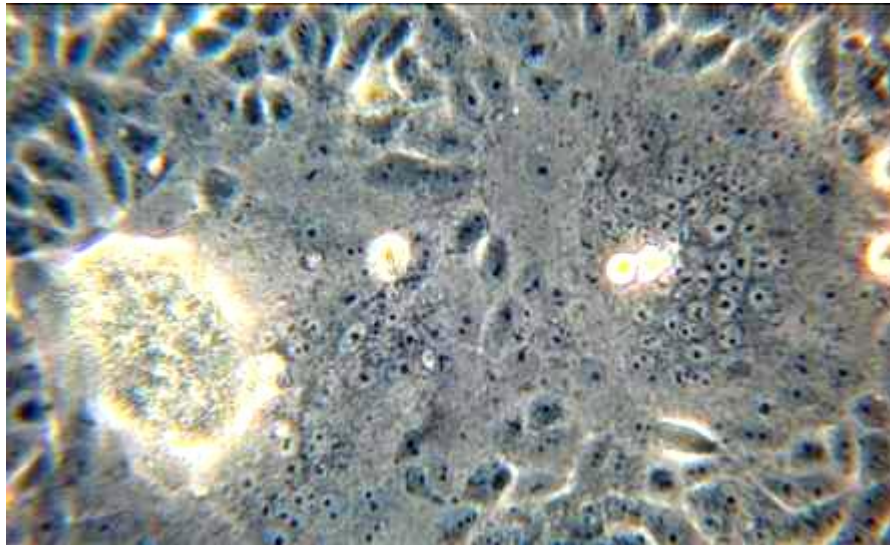


Рис. 2. Формирование симпластов в культуре клеток Vero-V (48 часов, фазовый контраст).

На третьи сутки культивирования в симпластах формируются однородные сферические структуры, которые хорошо видны в фазовом контрасте (рис.3). По морфологии они аналогичны ядрам, но их размеры примерно в 2-3 раза меньше.

На препаратах, окрашенных акридиновым оранжевым, выявляется их яркое зелёное свечение с оранжевой центральной частью. После разрушения симпластов сферические структуры окрашиваются в оранжевый цвет. Они полностью лизируются только после промораживания.

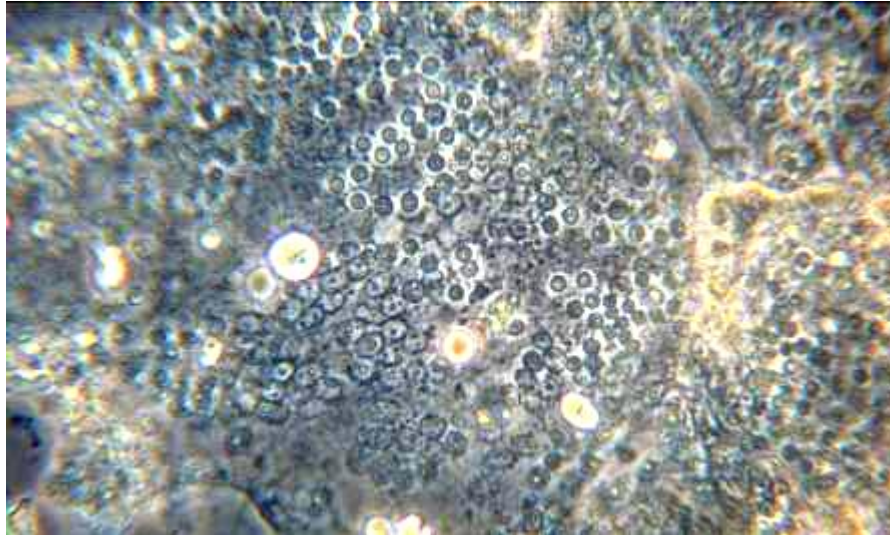


Рис. 3. Дегенерация цитоплазмы и ядер в симпластах культуры клеток Vero-V (72 часа, фазовый контраст).

Формирование таких сферических структур коррелирует с высоким титром метапневмовируса. Основная масса сформировавшихся симпластов на конечной стадии репродукции вируса может отслаиваться от субстрата и формировать трёхмерные структуры без разрушения общей наружной клеточной мембраны. На начальных стадиях инфекционного процесса (до 10 часов) в клетках Vero-V ещё наблюдаются митозы, но уже к концу первых суток все клетки вовлекаются в процесс формирования симпластов и репродукции вируса.

Морфологические изменения в клетках при репродукции метапневмовируса птиц, вероятно, аналогичны патологическому процессу воздействия микобактерий на альвеолярный эпителий животных.

Таким образом, в результате изучения репродукции штамма метапневмовируса подтипа В в клетках Vero-V было выявлено, что деструктивные изменения проявляются в слиянии клеток и образовании симпластов. Также мы наблюдали в гигантском симпласте наряду с ядрами нормального размера и ядра в несколько раз меньшие, что свидетельствует о трансформации ядер в сторону сверхспирализации ДНК. Динамика деструктивных изменений (или цитопатическое действие) находилась в прямой зависимости от инфекционной активности культивируемого вируса, что доказывают результаты титрования.

Пробы репродуцированного вируса отбирали через 24, 48, 72 и 96 часов после заражения и определяли инфекционную активность вируса методом титрования в перевиваемой культуре клеток Vero-V. Результаты исследований представлены в таблице.

Таблица. Динамика накопления инфекционной активности
метапневмовируса птиц в культуре клеток Vero-V.

Вирус	Продолжительность инкубирования, часы			
	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³			
	24	48	72	96
Метапневмовирус птиц подтипа В	4,5 – 5,0	7,0 – 7,25	7,5 – 7,75	6,75 - 7,0

Из таблицы видно, что с увеличением времени культивирования вируса его инфекционная активность повышалась и достигала максимума к 72 часам, титр вируса составлял 7,5 - 7,75 lg ТЦД₅₀/см³.

Выводы

Таким образом, установлено, что максимальное поражение клеток и монослая Vero-V наступает через 72 часа инкубирования с метапневмовирусом птиц подтипа В, при этом титр инфекционной активности вируса достигает наивысшего значения - 7,5 – 7,75 lg ТЦД₅₀/см³.

Список литературы

1. **Хлебовец З.Б., Пронин А.С., Борисова И.А., Старов С.К., Дрыгин В.В.** Выявление и типирование метапневмовирусов птиц в Российской Федерации. Материалы III международного ветеринарного конгресса по птицеводству, Москва, 2007 г.
2. **Cook, J. K. A.** Avian pneumovirus infections in turkeys and chickens. Vet. J., 2000, 160, 2: 118-123.
3. **Gough R, Collins M.S., Cox W.J. & Chettle N.J.** Experimental infections of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. Vet. Rec., 1988, 123: 58-59.
4. **Jones, R. C.** Avian pneumovirus infection: questions still unanswered. Avian Pathol., 1996, 25: 639-648.
5. **Борисова И.А., Старов С.К., Сарбасов А.Б.** Изучение иммунобиологических свойств инаktivированной эмульсионной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной болезни птиц. Вет. Патология. 2007, 4: 137-141.
6. **Сергеев В.А.** Репродукция и выращивание вирусов животных. М.: Колос, 1976: 281 – 296.

Х Р О Н И К А

КОНФЕРЕНЦИИ И ШКОЛЫ, ПРОВЕДЕННЫЕ В 2011 ГОДУ

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

На конференции обсуждались следующие проблемы: эмбриональные, тканеспецифичные и индуцированные стволовые клетки 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.

2. Научный совет РАН по клеточной биологии и иммунологии, Институт цитологии РАН, Ассоциация специалистов по клеточным культурам провели в Санкт-Петербурге в октябре 2011 г. **Школу-конференцию для молодых ученых «Клеточные технологии для регенеративной медицины»**. В программу школы были включены 18 лекций, посвященных следующим проблемам: 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. Материалы лекций опубликованы в сборнике: «Клеточные технологии для регенеративной медицины» под ред. Г.П.Пинаева, М.С.Богдановой, А.М.Кольцовой. – СПб.: Изд-во Политехнического ун-та, 2011, 335 стр.

Помимо лекций на конференции были представлены 54 стендовых сообщения сотрудников научно-исследовательских учреждений России, Украины и Беларуси. Тезисы этих сообщений опубликованы в журнале «Цитология», том 53, № 9, стр. 724-755.

Все лекции и стендовые сообщения активно обсуждались на круглых столах в конце каждого заседания.

3. В октябре 2011 г. в Санкт-Петербурге в Институте цитологии РАН была проведена **1-я Всероссийская конференция «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет»**. Конференция проводилась при участии ООО «Русбиолинк» (Москва).

К О Н Ф Е Р Е Н Ц И И 2012

1.17-18 мая 2012 года в г. Уфа в ФГБУ Всероссийском центре глазной и пластической хирургии состоится **5-й Всероссийский симпозиум с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»**. Организаторы: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, ФГБУ ЦИТО им. Н.Н.Пирогова, ФГБУ Всероссийский центр глазной и пластической хирургии (сайт – www.alloplant.ru).

Информационная поддержка: научно-информационный и аналитический журнал «Клеточная трансплантология и тканевая инженерия».

Научная программа: организация и деятельность тканевых и клеточных банков России; правовые и этические аспекты деятельности тканевых и клеточных банков; вопросы разработки, технологии изготовления и хранения биологических материалов; тканевая инженерия; клеточные технологии; экспериментальные исследования; клинические аспекты тканевых и клеточных технологий.

Контакты: Шангина Ольга Ратмировна, e-mail: alloolga@mail.ru; тел.: 8(3472)328-889;

2. Институт стволовых клеток (Москва) приглашает принять участие в работе **5-го ежегодного международного симпозиума: «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий»**, который состоится **28 мая 2012 года**.

Контакты: Роман Деев, e-mail: romdey@gmail.com; тел: 8- 965-147-13 - 64.

3. **4-5 июня 2012 г.** в Медицинском центре МГУ им. М.В.Ломоносова состоится международная конференция **«Программируемая гибель клеток в биологии и медицине»**. Основные вопросы конференции: молекулярные механизмы программируемой гибели клеток; роль программируемой гибели клеток в патогенезе различных заболеваний; иммунная система и гибель клеток; современные методы исследования программируемой гибели клеток. Официальный язык конференции – английский.

Председатель Оргкомитета – проф. Б.Д.Животовский. Информация на сайте: <http://www.fbm.msu.ru/sci/conf> ; e-mail: infj@fbm.msu.ru Тел: (495) 932-88-14.

4. С **16 по 20 июня 2012 г.** в Германии (Wilsede) состоится симпозиум: **«Modern Trends in human leukemia and cancer»**. Одна из обсуждаемых проблем: “Norman Stem Cells, Ageing, and Cancer”. Контакты: Martina Hintz, tel.: 8-49-40-480- 51-350.

E-mail: martina.hintz@hpi.uni-hamburg.de

5. Общество клеточной биологии, Научный совет РАН по клеточной биологии и иммунологии, Институт цитологии РАН и Совет по молекулярной и клеточной биологии Санкт-Петербургского научного центра проводят в Санкт-Петербурге **16-18 октября 2012 г. 3-й Съезд Общества клеточной биологии**. На съезде предполагается обсудить следующие проблемы: динамика хроматина и хромосом; внутриклеточная сигнализация, везикулярный транспорт, цитоскелет; роль ионных каналов в регуляции клеточных функций; механизмы клеточной дифференцировки, иммунитета и онкогенеза.

Контактные телефоны: (812) 297-18-59, (812) 297-18-29.

6. **18-19 октября 2012 г.** в Харькове состоится научная конференция с международным участием **«Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины»**. Материалы конференции будут опубликованы в журнале «Проблемы криобиологии».

Информация на сайте: <http://www.cryo.org.ua/conference>; e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Контактные телефоны: (057) 373-41-43, (057) 373-38-07, (057) 373-30-79

7. **26-28 октября 2012 г.** в Китае (Wuhan) состоится **Международная конференция “Биомедицинская инженерия и биотехнология»**.

Контакты: www.engii.org/cet2012/ContactUs.aspx ; секретариат: e-mail: cet@engii.org

РАЗНОЕ

Вышел из печати сборник материалов 2-й Всероссийской школы-конференции для молодых ученых: **«Клеточные технологии для регенеративной медицины»** под ред. Г.П.Пинаева, М.С.Богдановой, А.М.Кольцовой. – СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2011. – 335 с.

В сборнике рассматриваются общие принципы создания клеточных технологий восстановления поврежденных тканей и органов человека, а также возникающие проблемы использования этих технологий и перспективы их дальнейшего развития. Специальное внимание уделяется изменению свойств стволовых клеток в результате их культивирования вне организма и необходимости создания адекватного микроокружения, способствующего выполнению ими восстановительных функций. Подробно рассматриваются технологии создания клеточных продуктов для лечения критических ожогов, трофических язв и других ран кожного покрова, а также для восстановления костной, хрящевой и нервной тканей. Приводятся данные об успешном восстановлении кровеносных сосудов в ишемизированных нижних конечностях в результате имплантации стволовых клеток костного мозга, о восстановлении тканей десны и роговицы глаза с помощью клеточных технологий. Рассматриваются вопросы о перспективности применения методов тканевой инженерии с использованием биорезорбируемых полимерных конструкций на основе натуральных или искусственно созданных материалов. Специальное внимание уделяется генно-инженерным подходам к получению плюрипотентных стволовых клеток из зрелых клеток человека, использованию стволовых клеток для биобезопасности фармакологических веществ, а также в качестве модуляторов иммунного ответа при имплантации клеточных продуктов в органы и ткани, что значительно расширяет возможности практического использования клеточных технологий.

Сборник предназначен для биологов и врачей разных специальностей, для студентов и аспирантов медицинских институтов и биологических факультетов университетов, а также для молодых исследователей, интересующихся возможностью использования культивируемых клеток в своей работе.

Книга может быть выслана по почте наложенным платежом по заявкам, присланным по электронной почте Кольцовой А.М.: koltsova.am@mail.ru В заявке необходимо указать фамилию, имя и отчество (полностью), почтовый адрес с индексом и количество экземпляров.

Международный он-лайн конкурс молодых ученых: Alexander A. Maximov Award for Cellular Therapy and Transplantation - 2011/ 2012” на лучшие научные работы, отражающие достижения в области клеточной трансплантологии, а также инновационные идеи в регенеративной медицине, способствующие прогрессу человечества, был проведен с 15 декабря 2011 г. по 21 января 2012 г. Результаты подведения итогов конкурса представлены на сайте журнала «Клеточная трансплантология и тканевая инженерия»: <http://www.celltranspl.ru>

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 обонятельной луковицы совместно с макропористым гидрогелем.

Библиографический 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

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Шашкова О.А., Самойлович М.П., Пиневич А.А., Вартанян Н.Н., Климович В.Б.

Влияние мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на пролиферацию
лимфобластоидной линии Namalva.....3

Семенова В.М., Егорова Д.М.

Возможности использования мезенхимальных стволовых клеток из жировой
Ткани в восстановительном лечении заболеваний ЦНС (обзор литературы).....12

Антоневич Н.Г., Квачева З.Б., Чебан В.Л., Сидоренко И.В., Лобанок Е.С.

Стволовые и прогениторные клетки обонятельной выстилки человека:
условия выделения и накопления в культуре, морфофункциональная
и фенотипическая характеристика.....27

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В ВИРУСОЛОГИИ

**Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Плотникова М.А., Кадырова Р.А.,
Слита А.В., Ерошкин М.Ю.**

Изучение влияния разных субтипов вируса гриппа А в присутствии
противовирусных препаратов на пролиферацию и индукцию фактора
некроза опухоли в клеточных линиях человека A-549 и ECV-304.....37

Роменская Д.В., Манин Т.Б., Манин Б.Л.

Изучение цитоморфологических трансформаций клеточного монослоя
Vero-V в зависимости от времени репродукции метапневмовируса птиц.....50

Х Р О Н И К А

Конференции и школы, проведенные в 2011 году.....56

Конференции 2012.....57

Р А З Н О Е59

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ..... 61