

**АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ**

**ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

---

**ISSN 2077 - 6055**

**КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ**

**ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЮЛЛЕТЕНЬ**

**ВЫПУСК 30**

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ**

**2014**

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

ISSN 2077-6055

**Клеточные культуры.** Информационный бюллетень. Выпуск 30.

Отв. ред. М.С. Богданова. — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2014. — 99 с.

Настоящий выпуск посвящен памяти Георгия Петровича Пинаева — выдающегося ученого, доктора биологических наук, профессора, Заслуженного деятеля науки РФ, зав. Отделом клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), Президента Межрегиональной общественной научной организации «Ассоциации специалистов по клеточным культурам». Выпуск содержит информацию об основных направлениях и итогах научной работы, выполненной в последние годы в специализированных коллекциях культур клеток человека, животных и растений.

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

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: М.С. Богданова  
Г.Г. Полянская  
А.М. Кольцова

© Авторы статей, указанные в тексте, 2014

© Составление. Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН, 2014



**ГЕОРГИЙ ПЕТРОВИЧ ПИНАЕВ**

**29.01.1929 – 22.11.2013**

Редакционная коллегия сборника «Клеточные культуры» приняла решение посвятить настоящий выпуск памяти Георгия Петровича Пинаева — основателя и рецензента сборника, профессора, д.б.н., Заслуженного деятеля науки РФ, Заслуженного деятеля культуры РСФСР.

Георгий Петрович обладал неиссякаемой энергией, огромным организаторским талантом, высоким профессионализмом в области клеточной биологии и способностью преодолевать любые трудности для достижения поставленной цели. Поражает многообразие его научных интересов и масштабы организаторской деятельности. До последних дней жизни Г.П. Пинаев руководил созданным в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург) Отделом клеточных культур, был основателем и координатором Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур. По инициативе Г.П. Пинаева и при его активном участии в Институте цитологии РАН проводились Всероссийские симпозиумы и школы-конференции для молодых ученых по биологии клетки в культуре. Под редакцией Георгия Петровича изданы три учебно-методических пособия: «Методы культивирования клеток» (2008), «Клеточные технологии для

ренеративной медицины» (2011) и «Роль цитоскелета в жизнедеятельности культивируемых клеток» (2013).

Профессор Георгий Петрович Пинаев читал лекции по разработанным им курсам в Санкт-Петербургском государственном университете и Санкт-Петербургском государственном политехническом университете. Он старался привлекать наиболее способных и заинтересованных студентов к научной работе в Отделе клеточных культур. Под его руководством защищались дипломные работы, магистерские и кандидатские диссертации. Г.П. Пинаев был руководителем и постоянным участником многочисленных научных экспедиций на Дальний Восток и Белое море.

Неоценимой заслугой Г.П. Пинаева было создание им Межрегиональной общественной научной организации «Ассоциации специалистов по клеточным культурам» (АСКК), Президентом которой он оставался до конца своих дней. Целью создания этой организации было объединение научных работников страны, занимающихся теоретическими и прикладными исследованиями на клеточных культурах. Информационная деятельность АСКК состояла в ежегодной публикации сборника «Клеточные культуры», который рассылался в центральные библиотеки РФ и всем членам АСКК. Только благодаря Георгию Петровичу, при его профессиональной и материальной поддержке, смогли увидеть свет 29 выпусков этого сборника.

В настоящем 30-м выпуске представлены личные воспоминания о Георгии Петровиче Пинаеве его коллег, а также статьи об основных направлениях и итогах научной работы, выполненной в последние годы в специализированных коллекциях культур клеток человека, животных и растений. В выпуске опубликована, также, информация Ассоциации специалистов по клеточным культурам.

Члены редакционной коллегии сборника «Клеточные культуры» с чувством незаменимой утраты и с большой благодарностью всегда будут помнить Г.П. Пинаева — светлого, мудрого, разносторонне одаренного человека, посвятившего свою жизнь служению науке.

М.С. Богданова

Г.Г. Полянская

## **ВЕХИ ТВОРЧЕСКОГО ПУТИ ГЕОРГИЯ ПЕТРОВИЧА ПИНАЕВА**

***М.И. Блинова***

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [mira.blinova@mail.ru](mailto:mira.blinova@mail.ru)

Георгий Петрович Пинаев сочетал в себе огромный исследовательский потенциал, организаторские способности и педагогический дар. Он был отличным педагогом — любил и умел образно и доходчиво читать лекции студентам, разработал для магистров Факультета медицинской физики и инженерии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета курс лекций по клеточной биологии и биотехнологии. Под его руководством защищено большое количество кандидатских диссертаций, несколько докторов наук были его учениками.

По специальности полученного в Ленинградском государственном университете образования Г.П. Пинаев был биохимиком. На первых этапах своей научной деятельности он занимался фундаментальными проблемами биологической подвижности. Результаты этих исследований были представлены в книге «Биохимия мышц», написанной И.И. Ивановым и Б.Ф. Коровкиным в соавторстве с Г.П. Пинаевым. Книга заслужила признание специалистов. В 1978 году она была удостоена премии имени В.С. Гулевича Академии медицинских наук СССР.

Логика дальнейших исследований привела Георгия Петровича Пинаева к необходимости использования в работе клеточных культур. Его деятельность по развитию работ с использованием культивируемых клеток началась с создания в Институте цитологии РАН, сотрудником которого он являлся, Отдела клеточных культур (постановление Президиума Академии наук СССР 1974 г.). До последнего дня жизни в течение 40 лет Георгий Петрович руководил Отделом. За это время подготовлен целый ряд высоко квалифицированных специалистов, одни из которых работают по-прежнему в Институте цитологии, другие — в разных учреждениях страны и за рубежом. На базе Отдела клеточных культур постоянно проходят стажировки специалисты из разных институтов, обучаются и выполняют свои первые исследования студенты СПбГПУ и СПбГУ.

В 1978 году, главным образом, по инициативе Георгия Петровича была создана Всесоюзная (Российская) коллекция клеточных культур (ВСКК) путем организационного объединения девяти уже имевшихся в отдельных институтах специализированных коллекций клеток человека, животных и растений. Центральным банком ВСКК стала организованная на

базе Отдела клеточных культур Коллекция культур клеток позвоночных. Координатором работы ВСКК являлся Георгий Петрович Пинаев. Заслугой Георгия Петровича было создание отсутствующей в стране инфраструктуры для обеспечения на высоком методическом уровне работы коллекций и фундаментальных исследований с использованием культивируемых клеток.

В связи с организацией ВСКК встали вопросы взаимодействия специалистов, работающих в области культивирования клеток. С этой целью в начале 80-х годов прошлого века была создана Межрегиональная общественная научная организация «Ассоциация специалистов по клеточным культурам», бессменным президентом которой был Г.П. Пинаев. При участии Ассоциации регулярно организовывались Всероссийские симпозиумы по биологии клетки в культуре и школы-конференции для молодых ученых. Г.П. Пинаев стал инициатором издания ежегодного сборника «Клеточные культуры», содержащего информацию о направлениях исследований в различных учреждениях страны с использованием клеточных культур, о новейших достижениях в этой области, о новых методах исследования клеток *in vitro*, о научных конференциях и школах.

Результаты выполняемых под руководством Георгия Петровича фундаментальных исследований по биологии клеток в культуре, их адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировке, явились основой для развития исследований и разработок по клеточной биотехнологии. Результаты этих исследований имели непосредственный выход в клиническую практику. В частности, одни из первых гибридом, являющихся продуцентами антител, были разработаны в Отделе Пинаева. Проводились исследования по созданию искусственных сосудистых протезов с внутренней поверхностью, покрытой эндотелием, а также исследования по культивированию кардиомиоцитов. Кроме того, когда в США и Европе с конца 70-х годов начали применять для лечения ожогов выращенные *in vitro* многослойные пласты кератиноцитов, именно к Г.П. Пинаеву с просьбой создать подобные клеточные продукты для внедрения в медицинскую практику обратились сотрудники Клиники термических поражений Военно-медицинской академии в Санкт-Петербурге. По Гособоронзаказу Главного военно-медицинского управления МО РФ такая задача была успешно решена. На основе культивируемых кератиноцитов и дермальных фибробластов человека в Отделе клеточных культур был разработан ряд клеточных продуктов — аналогов дермы, эпидермиса и структуры полной кожи. Эти продукты успешно используются в клинической практике для восстановления кожной поверхности, утраченной или

поврежденной в результате ожогов разной степени (вплоть до сверхкритических), трофических язв, пролежней, свищей различного происхождения (в том числе и при болезни Крона) и в результате различных травм кожи.

Помимо работ с культивируемыми клетками кожи стали развиваться исследования по выделению, культивированию и направленной дифференцировке стволовых клеток разного типа. В частности, проводятся исследования по направленной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в хондрогенном и остеогенном направлениях с целью разработки на их основе клеточных продуктов, способствующих регенерации поврежденных тканей.

Возможность культивирования дифференцированных клеток различных органов и тканей (кожи, кости, хряща, сердечной мышцы, эндотелия) и применения их в клинической практике поставила задачу создания комплексных продуктов на основе этих клеток с белками внеклеточного матрикса (в частности, коллагена I типа), применение которых повышало эффективность регенерации тканей. Фундаментальные исследования роли белков внеклеточного матрикса инициировались Георгием Петровичем еще раньше, в период изучения механизмов клеточной подвижности и роли цитоскелета в адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировке клеток. В Отделе клеточных культур специалистами биохимиками были разработаны способы выделения ряда белков внеклеточного матрикса — желирующего коллагена I типа, ламинина, фибронектина, матригеля. На основе этих белков и некоторых природных полимеров (полилактиды, хитозаны) разработаны резорбируемые матрицы. Матрицы, заселенные культивируемыми клетками, успешно используются в регенеративной медицине. Как показало время, подобная комплексность исследований и взаимодействие разных специалистов в одной и той же области расширяет возможности достижения эффективных результатов.

Давние интересы Г.П. Пинаева к исследованиям клеточной подвижности на морских беспозвоночных и развитие методов культивирования клеток этих видов способствовали созданию по его инициативе в Институте биологии моря ДВО РАН Лаборатории биофизики клетки, работающей с культивируемыми клеткам беспозвоночных.

Исследовательская и организаторская деятельность Георгия Петровича Пинаева отмечена присвоением ему звания Заслуженного деятеля науки Российской Федерации.

Многогранная личность Георгия Петровича отразилась и в другой сфере его интересов — в хореографии. Он был солистом и балетмейстером балетной труппы Дворца культуры

им. А.М. Горького в Ленинграде. За заметный вклад в нашу культуру он удостоен звания Заслуженного деятеля культуры РСФСР. В течение многих лет Г.П. Пинаев был вдохновителем, постановщиком и главным режиссером великолепных новогодних спектаклей «Самодеятельного балета ученых Санкт-Петербурга», состоявшихся в Институте цитологии.

## **ПРОФЕССОР ГЕОРГИЙ ПЕТРОВИЧ ПИНАЕВ. СТРАНИЦЫ ПАМЯТИ**

***В.М. Семенова***

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины»,  
Лаборатория культивирования тканей , Киев, [seveme22@rambler.ru](mailto:seveme22@rambler.ru)

Уходят люди. Их не вернуть.  
Их тайные миры не возродить.  
И каждый раз мне хочется опять  
От этой невозвратности кричать.  
(Евг. Евтушенко)

В невыразимо скорбное время после ухода из жизни профессора Георгия Петровича Пинаева — выдающегося ученого и яркого незаурядного человека, не оставляют настойчивые раздумья о том, что же значит для меня его личность. Оказалось, что с деятельностью Георгия Петровича как основателя и Президента Межрегиональной общественной научной организации «Ассоциации специалистов по клеточным культурам» (АСКК) связан более чем 20-летний период работы Лаборатории культивирования тканей, существующей в Киевском институте нейрохирургии Национальной академии наук Украины с 1963 г. В настоящее время я заведу этой лабораторией.

Листаю страницы памяти, начиная с 1992 года, когда мне в первый раз пришлось приехать в Санкт-Петербург на Ленинградский оптико-механический завод (ЛОМО) для покупки инвертированного микроскопа. Тогда я уже знала о существовании Ассоциации специалистов по клеточным культурам. И в этот свой приезд мне, наконец, представилась возможность осуществить свою давнюю мечту — побывать во всемирно известном Институте цитологии Российской академии наук, чтобы познакомиться с исследованиями большого научного коллектива этого института — Отдела клеточных культур, возглавляемого доктором биологических наук, профессором Г.П. Пинаевым. Тогда же в 1992 г. я была принята в члены

АСКК, а затем и в члены Российского отделения Европейского общества тканевых культур. В 1997 г. я была избрана в члены Правления АСКК как полномочный представитель от Украины. С тех пор я получила уникальную возможность регулярно посещать организуемые АСКК и Институтом цитологии РАН научные симпозиумы и школы для молодых ученых, посвященные разноплановым исследованиям на клеточных культурах. В профессиональном отношении эти события оказались для меня исключительно значимыми, т.к. позволили постоянно знакомиться с новейшими методами и достижениями в области биологии культивируемых клеток и тканей.

Со временем, постоянно принимая участие в работе научных симпозиумов Ассоциации, слушая доклады и общаясь с Георгием Петровичем и его сотрудниками, я поняла, как много я приобретаю новых специальных знаний, методических подходов и новых идей. Достаточно вспомнить, что начало многолетних исследований в нашей лаборатории по биологии нейральных стволовых клеток (эмбриональных и постнатальных) в немалой степени было индуцировано научной информацией, почерпнутой из докладов на тематических симпозиумах Ассоциации, посвященных проблемам биологии стволовых клеток различного гистогенеза и разработке методических подходов их применения в клеточной терапии различных заболеваний.

Я убеждена в том, что своими успехами АСКК, объединяющая большое количество специалистов, работающих с клеточными культурами в России, СНГ, в ближнем и дальнем зарубежье, безусловно обязана, прежде всего, ее основателю — профессору Георгию Петровичу Пинаеву, увлеченному своей работой, обладающему громадным организаторским талантом, могучей энергией и глубинными знаниями во всех областях клеточной биологии. С моей точки зрения, именно эти личностные качества Георгия Петровича в сочетании с высоким профессионализмом послужили основой плодотворной многолетней научной деятельности членов Ассоциации специалистов по клеточным культурам, обеспечили ее авторитет, а также включение в состав Европейского общества тканевых культур в качестве его Российского отделения. В связи с этим вспоминается моя поездка совместно с группой членов Ассоциации — сотрудников Института цитологии во главе с Георгием Петровичем — на Международный Конгресс Европейского общества тканевых культур в 1994 г. в г. Верону (Италия). Очень хорошо помню выступление Георгия Петровича с докладом на одной из тематических секций. Помимо содержания его сообщения меня приятно удивило тогда и его свободное владение английским языком.

Тогда же впервые мне представилась возможность пообщаться с Георгием Петровичем в неформальной обстановке. С искренней заинтересованностью он расспрашивал меня о нашем институте, о работе Лаборатории культивирования тканей и о направлениях научных исследований на клеточных культурах, и уже тогда очень помог мне своими советами и рекомендациями. И в последующие годы во время каждого из моих посещений Института цитологии РАН Георгий Петрович, несмотря на свою крайнюю загруженность, непременно находил возможность уделить мне внимание и побеседовать о работе. Такие эпизоды общения с ним производили неизгладимое впечатление и надолго оставались в моей памяти.

В 2007-м году мне посчастливилось побывать в Санкт-Петербурге на праздновании 50-летнего юбилея Института цитологии РАН. В торжественных докладах неоднократно отмечались выдающиеся заслуги профессора Г.П. Пинаева и значимость его вклада в развитие фундаментальных биологических наук.

Не могу не вспомнить ввиду яркости впечатления, что в заключение этого торжества всех ожидал необыкновенно приятный сюрприз от Георгия Петровича — поставленное им театрализованное романтическое представление. Силами молодежного состава института был разыгран танцевальный сюжет. Исполненный номер вызвал всеобщий восторг как самобытным замыслом режиссера-постановщика, так и оригинальным исполнением участников балета. Этот эпизод раскрыл для меня новую грань таланта и артистичности Георгия Петровича как творчески одаренного человека.

Перебирая переписку с Георгием Петровичем, я обнаружила его рецензию на нашу статью, направленную в редакцию сборника «Клеточные культуры», издаваемого АСКК совместно с Институтом цитологии РАН. В этом письме помимо деликатных советов о необходимости сокращения и внесения изменений в текст статьи Георгий Петрович выразил также одобрение и похвалу моей лекции, прочитанной ранее в Институте цитологии РАН на очередной школе-конференции для молодых ученых, приехавших из разных регионов РФ и стран СНГ. Этот автограф Георгия Петровича мне особенно дорог и я всегда его буду бережно хранить.

Трогательным эпизодом стало для меня обращение Георгия Петровича с просьбой проанализировать автореферат кандидатской диссертации одной из его учениц и подготовить отзыв. Конечно, я безоговорочно согласилась, посчитав это большой честью и свидетельством доверия и уважения со стороны Георгия Петровича.

Вспоминается также совершенно удивительная внимательность Георгия Петровича к запросам и просьбам, которую я ощутила на собственном опыте. Так, в 2009 г. по моей

инициативе и просьбе для слушателей школы для молодых ученых Георгием Петровичем была организована и успешно осуществлена ознакомительная экскурсия по Отделу клеточных культур, его подразделениям и вспомогательным службам. Припоминается, что эта обзорная экскурсия вызвала большой интерес и всеобщее одобрение всех ее участников.

Хочется особо подчеркнуть, что при наличии многочисленных заслуг и званий, наград и международного признания Георгий Петрович всегда оставался благожелательным и доступным человеком, готовым прийти на помощь всем и каждому. По моему мнению, именно эти качества Георгия Петровича как благородного человека высокой культуры и гуманности вызывали всеобщее уважение всех, кто с ним общался, с ним работал или пользовался его советами.

Убедиться в этом в полной мере мне довелось благодаря присутствию на юбилейном заседании по случаю 80-летия со дня рождения Георгия Петровича. На этом торжестве в адрес юбиляра звучали не дежурные традиционные приветствия, а по-настоящему душевные слова искренней благодарности, любви и признательности за его научные и профессиональные достижения, а также за личностные качества доброго достойного человека. Я горжусь тем, что в тот торжественный день мне также удалось публично поздравить Георгия Петровича со славным юбилеем, пожелать ему крепкого здоровья и всего самого доброго в жизни и профессии, а также озвучить поздравительное послание руководства нашего Института нейрохирургии.

Эти короткие воспоминания о профессоре Георгии Петровиче Пинаеве — лишь малая дань благодарности этому человеку за то, что я имела честь с ним общаться, слушать его доклады, пользоваться его советами и поддержкой на протяжении более 20 лет. Я бесконечно благодарна судьбе за то, что в моей профессиональной жизни существовал такой выдающийся ученый, подлинный представитель передовой науки и удивительный человек, о котором светлые воспоминания неизменно будут сопровождать меня всю оставшуюся жизнь, согревая душу и сердце.

## БЕЛОМОРСКАЯ ЭКСПЕДИЦИЯ: НАУКА И ЖИЗНЬ

**О.А. Петухова**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [petukhova@yandex.ru](mailto:petukhova@yandex.ru)

В статье, посвященной памяти Георгия Петровича Пинаева, описываются некоторые события из жизни сотрудников Отдела клеточных культур ИНЦ РАН, имевшие место во время экспедиций на Беломорскую биологическую станцию «Картеш». Приводятся результаты одного из направлений научной работы.

**Ключевые слова:** культивирование клеток морских беспозвоночных, целомоциты, целомический эпителий, *Asterias rubens*, пролиферация, регенерация.

Середина августа, мы (сотрудники Отдела клеточных культур Института цитологии РАН, зав. Отделом — Георгий Петрович Пинаев, профессор, д.б.н., Заслуженный деятель науки РФ) вышли из отпуска и готовимся к экспедиции. Еще весной был определен состав участников, обсуждены планы каждого на предстоящие три недели, послана заявка на Биостанцию, где оговорены сроки и число приезжающих. Чуть позже куплены билеты. А сейчас необходимо подготовить все реактивы, максимально приготовить растворы и среды, взять все необходимое оборудование, инструменты, стеклянную посуду и пластик и многое другое. Составляются списки, валяются коробки.... И еще надо закупить продукты. Ибо едем мы на Биостанцию Зоологического Института РАН, что расположена на берегу Белого моря в 32-х километрах от поселка городского типа Чупа и в 37-и километрах от железнодорожной станции Чупа Октябрьской железной дороги. Связь летом с Чупой только по воде, раз в неделю, по магазинам за продуктами не набегаешься, а если забудешь что-то необходимое для работы, то ждать надо неделю, когда коллеги из Института перешлют с оказией.

История экспедиций на Белое море начинается с поздней осени 1994 года, когда Георгий Петрович Пинаев и Миральда Ивановна Блинова (ведущий научный сотрудник Отдела) приехали в первую ознакомительную поездку на Картеш. Беломорская Биологическая Станция «Картеш» (ББС) — это морской стационар Зоологического Института РАН (Санкт-Петербург), расположенный в Карелии, в губе Чупа Кандалакшского залива Белого моря, в 30 км от Северного Полярного Круга. Они хотели выяснить, можно ли на Белом море продолжить исследования, которые Миральда проводила до этого на Дальнем Востоке, на Биостанции «Витязь», расположенной на берегу Японского моря. Работа была связана с

культивированием клеток морских беспозвоночных. Поездки на Дальний Восток пришлось прекратить из-за неблагоприятной финансовой обстановки в академических институтах, да и прочих проблем в стране в общем. Между тем, наработок было сделано очень много, и будущее сулило много интересного.

После обсуждений с картешанским руководством (биостанцию в то время возглавлял Виктор Яковлевич Бергер) было принято положительное решение и с 1995 года экспедиции на биостанцию «Картеш» стали ежегодными осенними событиями в жизни Георгия Петровича и сотрудников Отдела клеточных культур. Забот также прибавилось: помимо всех проблем, связанных с заведением Отделом, руководством многочисленными учениками, чтением лекций, научными поездками в Швецию, надо было организовать вывоз оборудования на биостанцию. Оборудование немаленькое, для обеспечения работы по культивированию и анализу клеток нужны габаритные вещи: ламинар, автоклав, сухожаровой шкаф, люминесцентный микроскоп, спектрофотометр, центрифуги, термостаты. На этом фоне инвертированный микроскоп, рН метр и прочая мелочевка не заслуживали обсуждений, все это можно перевозить на себе. Конечно же, неуемной энергии Георгия Петровича хватило на все. И когда я в 2000-м году впервые приехала на Картеш, все стояло на местах, почти все работало, у каждого был свой участок работы и на станции нас ждали.

Я работаю в Отделе с ноября 1998 года, и в экспедицию просто напросилась. Георгий Петрович даже обрадовался, полагая, что человек, имеющий биохимическое и молекулярно-биологическое прошлое, может быть полезен, а туристическая закалка позволяла предположить, что обузой я не стану. Рекомендация Коли Шубина (Николай Аркадьевич Шубин, ведущий инженер), старинного участника экспедиции, также сыграла свою роль.

Встречи с картешанскими знакомыми начинаются уже в поезде № 22 Санкт-Петербург— Мурманск, который отправляется с вокзала, сначала это был Московский, а затем Ладожский. Это всегда четверг, потому что ехать чуть больше 19 часов, а судно встречает и провожает гостей по пятницам. Позади погрузка в вагон с помощью провожающих, распределение огромного багажа по ящикам и полкам и первый совместный перекус, нельзя сказать, чтобы легкий, так как все захватили из дома много всего вкусного. Георгий Петрович, только что лично деятельно поруководивший укладкой каждого рюкзака и каждой коробки, свежий и бодрый, собирает нас всех на поездной семинар-совещание. Последние уточнения планов и намерений с критическими замечаниями от Георгия Петровича, беседы с Миральдой о важных проблемах Отдела и рассказы о работе в Швеции, так как в течение многих лет

Пинаев отправлялся в экспедицию сразу же после возвращения из Стокгольма. Это были конкретные доклады о проделанной работе, с показом картинок и общим обсуждением. А пассажиры нашего плацкартного вагона смиренно наблюдали за всеми этими процессами.

Утром некогда было расслабляться. После завтрака задолго до приезда в Чупу начинаем готовиться к выходу, вытаскиваем все вещи обратно, каждому указано его место, порядок действий определен Пинаевым четко, и попробуй только схватить не тот мешок или не ту коробку, которая тебе предназначена! Сухое слово «выговор» лишь слабо отражает сущность последующей реакции. Но выгружались мы всегда быстро, минуты стоянки хватало.

«Чупа — посёлок городского типа в Лоухском районе Карелии. Население — 2923 жителя (перепись 2010-го года). Расположен на северо-востоке республики, на берегу Чупинской губы Белого моря, в 4 км к востоку от железнодорожной станции Чупа (на линии Санкт-Петербург — Мурманск). Расстояние до районного центра Лоухи — 48 км. Старинное поморское село Чупа впервые упоминается в 1574-м году в письменах Соловецкого монастыря, тогда в нём насчитывалось 8 домов. Название предположительно происходит от карельского «чуппу» (угол). Веком спустя Чупа стала центром слюдяного промысла. Статус посёлка городского типа — с 1943 года». Так написано в Википедии. А в реалии это смесь бараков и многоэтажных каменных зданий, расположенных в великолепном ландшафте на нескольких улицах, вытянутых вдоль узкого залива моря. Поселок знавал лучшие времена.

До пристани, где нас уже ожидает станционное судно, добираемся на микроавтобусе — «буханке», также принадлежащем Биостанции. Обычно микроавтобус делает несколько рейсов между вокзалом и пристанью, чтобы перевезти отъезжающих и приехавших.

Из Чупы так просто не уехать — надо еще докупить продуктов. Первые годы мы ходили по магазинам все вместе, иногда забредая в доступный общепит. Но чаще всего Георгий Петрович оставался на причале и наслаждался разговорами с картешанами. А мы гонялись по хорошо известным магазинам, количество коих менялось со временем, ассортимент тоже колебался, очень жалели об исчезнувшей пекарне, с ее свежим хлебом и вкуснейшими булочками.

В мои времена на Станции два судна: научно-исследовательское судно «Профессор Владимир Кузнецов», длина 27 м, и судно «Беломор», рассчитанное на прибрежное плавание в пределах Кандалакшского залива, длина 14.6 м. Понятно, что на «Беломоре» не разгуляешься. И в редкие теплые дни, и в обычный холод большую часть времени проводили

на палубе, все-таки Белое море завораживает. Георгий Петрович предпочитал беседы с зоологами.

Переход до Картеша длится около двух часов, иногда наперегонки с судном, отвозящим людей на о. Средний, биостанцию СПбГУ. На причале «циников» в числе прочих встречают все сотрудники Биостанции и все живущие на Станции собаки. И видно, что Пинаеву все рады. Но если вы думаете, что этот день заканчивается привальной, то ошибаетесь. Праздничный ужин, конечно, но нам надо рассортировать коробки — домой или в лабораторию, убрать все по холодильникам, морозилкам или теплым местам, разобрать все продукты, взять реактивы, которые хранились в теплой комнате целый год, и переделать кучу других мелочей, например, поселиться в свою комнату и сбегать в баню. А в первые годы, когда работали на станции с культурами клеток человека, надо было срочно в этот же вечер вымыть ламинар, прожарить его и пересеять привезенные клетки, для которых надо было подготовить термостат на 37°C.

Порядок на Станции заведен давно, порядок в группе Пинаева тоже известен: 1. Работаем без выходных; 2. Едим три раза в день, в 9.00, в 15.00 и в 20.00. В промежутках по желанию чай и кофе; 3. Ты либо готовишь, либо моешь посуду. Мужчинам можно выбирать, у женщин выбора не было. Готовят все по очереди; 4. Никакой эксперимент не повод не приготовить еду в свое дежурство, можешь поменяться или чуть задержаться. Георгий Петрович дежурил в общей очереди готовящих И мы точно знали, что в его день на завтрак будет геркулес, на обед не будет щей, а на ужин будет нечто фантастическое. Порой он позволял себе мечтать, что по выходе на пенсию откроет свой ресторанчик.

Сначала нам была отведена в лабораторном корпусе одна комната под номером 6, в ней стоял ламинар и прочее оборудование. Соседнюю веранду оборудовали под центрифужную с уличной температурой и использовали как хранилище животных. В первую поездку мне была выделена для работы половина письменного стола. На другой половине работал Пинаев. Позднее мы разбрались и по другим комнатам, пользуясь тем, что в сентябре появляются свободные рабочие места.

Георгий Петрович очень тщательно организовывал свое рабочее место, все должно было быть под рукой. И еще он очень любил работать с кем-либо вместе, особенно с молодежью — обсуждать, объяснять, то и дело он звал всех посмотреть удачное сокращение целомоцитов морской звезды или хвастался каким-то удачным результатом, потирая руки от удовольствия характерным, пинаевским способом.

Порядок на станции означает еженедельные четверговые субботники, и только последние года три Пинаев не принимал в них участие. Порядок на станции означал, что Георгия Петровича и нас всех вместе с ним пригласят в гости старые знакомые, и угостят беломорскими изысками, мидиями копчеными или треской, наливками из местных ягод с интригующими названиями и, конечно, попотчуют многочисленными картешанскими историями. А потом мы позовем гостей и приготовим для них пирог. А Георгий Петрович покажет желающим запись своего последнего балета. И еще, лично завяжет каждую коробку во время сборов перед отъездом в город.

К моменту моего первого появления на станции коллеги работали по нескольким научным направлениям. Миральда Блинова занималась культивированием клеток бластемы пескожила, *Arenicola marina*. Ирина Воронкина (Ирина Владимировна Воронкина, с.н.с.Отдела) работала на морской звезде *Asterias rubens*, анализировала изменения состава целомической жидкости (ЦЖ) в процессе регенерации звезды. ЦЖ была ею фракционирована. Анализ влияния фракций на клетки млекопитающих и беспозвоночных выполняли несколько человек (Татьяна Горячая, Галина Сакута, Александра Аре, Наталья Николаенко), при мне это делала Наталья Шарлаимова. Коля Шубин вместе с Георгием Петровичем занимались замораживанием клеток ЦЖ звезды. Помимо этого, Георгий Петрович уже тогда увлекся исследованием механизмов образования тромба целомоцитами морской звезды *in vitro*. А Лева, Лев Николаевич Саломатин, обеспечивал техническую поддержку и сбор материала.

Сбор материала заключался в копании пескожилов и собирании звезд. Выливалось это в большие экспедиции. Больше всего пескожила можно было накопать в губе Медвежьей, на Ивановом Наволоке. Во время максимального отлива не меньше четырех человек с лопатами и ведрами шли два километра по лесной тропе до обширной литорали в заливе, там разбивались на пары, мужчины копали, а женщины должны были ловить проворного зверя. Червяков нужно было набрать порядка двух сотен. Звезд, которых для биохимии надо было немало, Коля и Лева собирали в сентябрьском море, ходя по пояс в холодной воде. Согревались потом чаем. Намного позже в экспедиции появился неопреновый гидрокостюм, ласты и маска.

В рамках общей научной задачи — культивирование клеток морских беспозвоночных, мне предлагалось применить какие-либо молекулярные подходы для возможного продвижения вперед. И пескожил, и морская звезда — совсем не общепринятые объекты молекулярных исследований. В то время был охарактеризован клеточный состав ЦЖ пескожила и морской

звезды, и имелась одна гистологическая работа по включению бромдезоксигуанидина в ткани морской звезды (1—3). Для начала я решила просто выделить РНК и белки из клеток разных тканей пескожила и целомоцитов звезды. А пока что делала все, что надо. Одной из обязанностей было ухаживание за пескожилами: отмывка от грунта с помощью зубной щетки, сортировка по размеру.

Через 3 года были получены даже кое-какие результаты. Например, с помощью метода торможения в геле было показано присутствие транскрипционных факторов, подобных SRF (serum response factor) и NFκB, в ядерных экстрактах этих животных. Кроме того, вестерн-блот анализ показал, что антитела против белков человека узнают в клеточных экстрактах целомоцитов звезды белки-регуляторы клеточного цикла — ретинобластома и циклин D. Сразу скажу, что до сих пор мы не можем объяснить и понять значение этих ранних находок. Почему в клетках, которые не делятся, так активны белки, связанные с клеточным циклом? Одно стало ясно, что прежде, чем проводить какие-то молекулярные исследования, надо изучить объект, выбрать экспериментальную модель регенерации, приемлемую для кратковременных экспериментов (это диктовалось временем пребывания в экспедиции — 3 недели) и охарактеризовать пролиферирующие клетки. Последнее соображение, во всяком случае, было в русле основной задачи по культивированию клеток морских беспозвоночных. К этому моменту мы все сосредоточились на работе с морской звездой, дабы не распыляться.

Короче, надо было отступать в сторону морфологических и гистологических исследований. «Вот ты этим и займись», — сказал Георгий Петрович, чем поверг меня в уныние. Помощь пришла со стороны в лице Александра Михайловича Горбушина, ныне ведущего научного сотрудника Института эволюционной физиологии и биохимии им. Сеченова РАН. Он рассказал, как надо брать ЦЖ звезды для анализа клеточного состава, как готовить препараты, показал, как выглядят клетки ЦЖ звезды после окрашивания гематоксилином, любезно предоставил собственный протокол по выявлению пролиферирующих клеток у моллюсков с помощью бромдезоксигуанидина (BrdU). Я могу продолжить этот список важных методических тонкостей, знакомых биохимику по образованию с опытом работы по исследованию малых РНК в клетках млекопитающих. И вторым важным событием стало появление студентки кафедры цитологии и гистологии СПбГУ Александры Козловой.

Определились также с экспериментальной моделью. Собственные наблюдения, а также исследования других авторов показали, что травмирование звезды *A. rubens* приводит через 6

часов к увеличению числа клеток в её целомической полости в 3—4 раза (4). Восстановление пула целомоцитов — наша экспериментальная модель физиологической регенерации.

Предполагается, что у морских звезд регенерация протекает по типу морфаллаксиса, когда клетки существующих тканей мигрируют к месту заживления, дедифференцируются и/или трансдифференцируются, причем процессы деления клеток менее интенсивны и более локализованы (5). В качестве таких тканей-депо предположительно рассматривались целомический эпителий (4) и эпидермальный слой шнура радиального нерва (6), тидемановы тельца и аксиальный орган (7). Независимо от того, какая гипотеза окажется правильной, можно ожидать, что следствием ранения животного будет изменение клеточного состава ЦЖ.

Эксперименты были направлены на поиск условий, при которых происходят максимальные изменения клеточного состава ЦЖ. В ЦЖ морской звезды *A. rubens* было обнаружено три основных типа клеток: агранулоциты, которые различаются по размеру и форме, гранулоциты и мелкие клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Ядра в каждом из этих типов клеток различались по степени конденсации хроматина. Реакция звезды на травмирование зависела от степени потери ЦЖ. Изменений клеточного состава ЦЖ в ответ на незначительную её потерю не наблюдалось. Общим ответом звезд на значительную потерю ЦЖ являлось возрастание доли мелких, предположительно молодых клеток, и увеличение доли клеток с деконденсированным хроматином и ядрышком. После ранения звезды целомоциты приобретали способность к образованию сетей при контакте с инородным субстратом (8).

В первые годы работы мы много обсуждали все проблемы вместе, в лаборатории и за обеденным столом, и постепенно мы с Наташей Шарлаимовой поняли, что у нас есть общие интересы, и мы можем помочь друг другу в достижении своих целей. Так что все последующие работы были выполнены совместно. А в 2005 году она поступила ко мне в аспирантуру.

Установленный факт увеличения в ЦЖ доли клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением в ответ на травмирование определил следующий вопрос для исследования. Так как пролиферативная активность целомоцитов чрезвычайно мала, можно предположить, что восполнение популяции целомоцитов происходит за счет малодифференцированных клеток, поступающих из других тканей, в частности, целомического эпителия, аксиального органа или тидемановых телец. Для изучения вопроса, происходит ли восполнение клеток за счет делений, была исследована пролиферативная активность клеток этих тканей *in vivo*.

Показано, что воспроизводимое включение BrdU, аналога тимидина, характеризующее ДНК-синтетическую активность клеток, присуще клеткам целомического эпителия, тогда как в других тканях наблюдались колебания значений включения, от отрицательных до значительных. Для анализа пролиферативной активности *in vitro* были отработаны методы выделения и культивирования клеток различных тканей, при этом опирались на опыт Миральды. Методика выделения ткани целомического эпителия от начала и до конца разработана Наташей Шарлаимовой. Самое важное, мы выяснили, что через 2 месяца культивирования для целомического эпителия было характерно образование колониеподобных скоплений клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, включающих BrdU. Таким образом, наиболее перспективным объектом для исследований оказался целомический эпителий, а выявление пролиферативной активности именно малых клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением усилило интерес к этому типу клеток (9).

В ходе работы было выявлено, что поверхность стекла является неподходящим субстратом для культивирования клеток *A. rubens* — клетки, первоначально прикрепившиеся к покровному стеклу, через 1 сутки культивирования мигрировали на поверхность лунки, не давая возможность проведения иммунофлуоресцентного анализа. Таким образом, встал вопрос выбора субстрата для культивирования клеток ЦЖ и целомического эпителия. Кроме того, было необходимо определить, какие морфологические типы клеток гетерогенных популяций целоцитов и клеток целомического эпителия (эпителиоцитов) могут встретиться при культивировании. С этой целью анализировали морфологию прикрепленных и распластанных клеток ЦЖ и целомического эпителия при посадке на иммобилизованные лиганды — фибронектин, ламинин 2/4 и на неспецифические субстраты — полилизин и стекло. Аналоги фибронектина и ламинина человека были обнаружены у морского ежа (*Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006*), поэтому мы сочли возможным использовать эти лиганды. Мы выявили морфологически сходные клетки для этих двух видов тканей, две из которых являются вероятными кандидатами на роль клеток-предшественников целоцитов — целоцитоподобные и малые эпителиоциты с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Важными оказались результаты, демонстрирующие обогащение популяции прикрепленных клеток целомического эпителия малыми клетками при посадке на ламинин и сохранение жизнеспособности эпителиоцитов при культивировании на ламинине в течение 1 месяца (10).

В дальнейшем был исследован состав популяций клеток ЦЖ и целомического эпителия морской звезды *A. rubens* после гистологического окрашивания азур-эозином, предложена собственная классификация клеток, причем состав суспензий клеток целомического эпителия был охарактеризован впервые. Выявлены типы клеток, которые занимают пограничное положение между целомическим эпителием и целомической полостью. Это крупные агранулоциты, гранулоциты и малые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, характеризующиеся дискретно окрашенным ядром (эпителиоциты 1-го типа). Выявлены значительные изменения доли именно этих клеток в составе целомического эпителия и ЦЖ, вызванные травмированием. Более того, была обнаружена новая субпопуляция клеток, слабо связанных с целомическим эпителием, обогащенная на 50 % малыми эпителиоцитами 1-го типа. Показана возможность миграции малых эпителиоцитов 1-го типа из состава целомического эпителия в ЦЖ. Эти данные позволили предположить, что малые эпителиоциты, клетки без выраженных признаков цитодифференцировки, занимают пограничное положение между целомическим эпителием и ЦЖ, и могут служить предшественниками клеток целомической жидкости, целомоцитов (11).

Анализ локализации малых эпителиоцитов в случайно выбранных фрагментах целомического эпителия выявил несколько позиций: в соединительной ткани, подлежащей целомическому эпителию, в участках целомического эпителия, не содержащих жгутиковых клеток, а также в виде больших скоплений клеток в участках эпителия, обедненных жгутиковыми клетками. С помощью сканирующей электронной микроскопии и окрашивания тотальных препаратов целомического эпителия (Whole-mount) ядерным красителем ДАПИ и антителами против альфа-тубулина был подтвержден факт пограничного положения малых и зрелых клеток на поверхности целомического эпителия (11).

Иммунофлуоресцентный анализ показал, что только незначительная часть малых эпителиоцитов характеризуется пролиферативной активностью. Следовательно, в целомическом эпителии присутствует значительный пул клеток, готовых к выходу в целомическую полость и к дальнейшей дифференцировке. В наших экспериментах малые эпителиоциты при культивировании на ламинине сохраняли пролиферативную активность, по крайней мере, в течение 1 месяца. Таким образом, морфология малых эпителиоцитов, их пролиферативная активность *in vivo* и *in vitro*, способность к миграции из состава эпителия в ЦЖ говорит о том, что эти клетки обладают характеристиками стволовых клеток (11).

Что-то удалось сделать на пути решения основной задачи, еще больше вопросов предстоит разрешить. С 2000 года изменился состав экспедиции, с нами больше не ездит Лев Саломатин, перестала ездить и Миральда Блинова. Очень редко приезжают Коля Шубин и Ира Воронкина. Появилась молодежь: сотрудник нашего Отдела Данила Бобков, который занимался с Пинаевым сокращением целомоцитов, Сережа Шабельников из Лаборатории морфологии клетки, мастер на все руки — два прекраснейших приобретения; Коля Шуйский, бывший студент Ольги Подгорной, который помогал Георгию Петровичу с заморозками. И теперь никогда не будет с нами Георгия Петровича Пинаева. Чем дальше, тем яснее понимаешь, что появилась пустота рядом, которая ничем и никем не заполняется. Никто не расскажет за столом историй из жизни героического поколения, и не будет больше Георгий Петрович потирать руки от удовольствия и громко смеяться, и забирать на себя все внимание, и некому готовить свои доказательства и возражения. И не будет рядом бушевать энергия созидания. И с этим придется смириться. И научиться ценить рядом живущих людей, пока не станет поздно.

#### Список литературы

1. **Персинина М., Чага О.** Обновление и дифференцировка клеток целомической жидкости у полихеты *Arenicola marina*. I Морфология и классификация целомоцитов. Цитология, 1994, 36: 261—267.
2. **Jangoux M., Vanden Bossche J.P.** Morphology and dynamics of the coelomocytes of *Asterias rubens* L. (*Echinodermata, Asteroidea*). Forma Functio, 1975, 8: 191—208.
3. **Moss C., Hunter A.J., Thorndyke M.C.** Patterns of bromodeoxyuridine incorporation and neuropeptide immunoreactivity during arm regeneration in the starfish *Asterias rubens*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 1998, 353: 421—436.
4. **Vanden Bossche J.P., Jangoux M.** Epithelial origin of starfish coelomocytes. Nature, 1976, 261: 227—228.
5. **Morgan T.H.** Regeneration. Macmillan, New York. 1901, 348 p.
6. **Candia Carnevali M. D., Bonasoro F.** Microscopic overview of Crinoid regeneration. Micr. Res. Technique, 2001, 55 : 403—426.
7. **Догель В. А.** Зоология беспозвоночных. М.: Высшая школа. 1975, 560 с.
8. **Козлова А.Б., Петухова О.А., Пинаев Г.П.** Анализ клеточных элементов целомической жидкости на ранних сроках регенерации морской звезды *Asterias rubens* L. Цитология, 2006, 48: 175—183.
9. **Шарлаимова Н.С., Пинаев Г.П., Петухова О.А.** Сравнительный анализ поведения и пролиферативной активности в культуре клеток целомической жидкости и клеток различных тканей морской звезды *Asterias rubens* L. полученных из нормальных и травмированных животных Цитология, 2010, 52: 317—325.
10. **Шарлаимова Н.С., Петухова О.А.** Характеристика популяций клеток целомической жидкости и целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L., способных прикрепляться и распластываться на различных субстратах. Цитология, 2011, 53: 891—902.

11. **Sharlaimova N., Shabelnikov S., Petukhova O.** Small coelomic epithelium cells of starfish *Asterias rubens* L. that are able to proliferate in vivo and in vitro. Cell Tissue Res., 2014, DOI 0.1007/s00441-013-1766-8.

## **ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ПОЗВОНОЧНЫХ ИНЦ РАН В 2011—2013 гг.**

**Г.Г. Полянская**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [poljansk@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:poljansk@mail.cytspb.rssi.ru)

Дана краткая историческая справка о создании Российской коллекции клеточных культур и основополагающей роли в этом процессе профессора, Заслуженного деятеля науки РФ Георгия Петровича Пинаева. Изложены основные результаты научных исследований в 2011-2013 гг., свидетельствующие о продолжающемся развитии Коллекции культур клеток позвоночных (КККП) ИНЦ РАН. Описаны свойства вновь полученных клеточных линий человека. Показано, что полученные в системе фидерного и во вновь созданной системе бесфидерного культивирования линии эмбриональных стволовых клеток человека соответствуют статусу плюрипотентных стволовых клеток. Новые фибробластоподобные линии, полученные из разных источников: из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека (линия SC5-MSC), костного мозга раннего эмбриона (линия FetMSC) и крайней плоти ребенка (линия FRSN), соответствуют статусу мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека. Эти неиммортиализованные клеточные линии МСК человека включены в фонды КККП. Для них, согласно международным требованиям, разработаны паспорта, которые размещены на сайте Института цитологии РАН в разделе «Коллекции и каталоги» по адресу: [www.cytspb.rssi.ru](http://www.cytspb.rssi.ru)

**Ключевые слова:** коллекция культур клеток позвоночных, эмбриональные стволовые клетки человека, мезенхимные стволовые клетки человека.

Всесоюзная (Российская) коллекция клеточных культур (РККК) была создана в 1978 году. Основоположником создания РККК был профессор Георгий Петрович Пинаев. На протяжении 35 лет он являлся координатором работы РККК. Он основал ежегодный сборник «Клеточные культуры» (информационный бюллетень). Сборник содержит информацию о новых направлениях фундаментальных и прикладных исследований на клеточных культурах, о

деятельности созданной Г.П. Пинаевым Межрегиональной общественной научной организации «Ассоциация специалистов по клеточным культурам», Президентом которой он являлся до последнего дня жизни, о научных совещаниях и конференциях.

Перед Всесоюзной коллекцией была поставлена задача сбора и сохранения клеточных культур человека, животных и растений и обеспечения ими научных учреждений СССР. Главным учреждением по проблеме был определен Институт цитологии АН СССР. В настоящее время Российская коллекция клеточных культур человека, животных и растений (РККК) состоит из 9 специализированных коллекций, включающих разные по происхождению клеточные линии человека, позвоночных и беспозвоночных животных, а также растений. Коллекция культур клеток позвоночных ИНЦ РАН (КККП) является Центральным банком РККК. По своим функциональным задачам, КККП является наименее специализированной коллекцией, т.е. в фондах Коллекции представлены клеточные культуры человека и различных животных для широкого спектра фундаментальных и прикладных исследований в различных областях биологии.

Одной из основных задач любой Коллекции является ее постоянное развитие, которое в большой степени связано с расширением фондов Коллекции, т.е. с получением новых клеточных культур. Расширение фондов Коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН всегда определялось запросами фундаментальных исследований и практическими задачами здравоохранения. В связи с этим в последнее время большое внимание уделяется получению и характеристике клеточных линий, перспективных для использования в диагностике и биомедицинских технологиях. Последнее десятилетие наиболее ярко представлено развитием исследований в области стволовых клеток разного происхождения, которые дали огромный импульс для развития клеточной и молекулярной биологии, а также для решения прикладных задач в области регенеративной медицины и фармакологии.

За последние несколько лет в Коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН получено несколько постоянных линий ЭСК человека. ЭСК, выделенные из ранних эмбрионов млекопитающих, включая человека, на стадии не позднее бластоцисты, являются носителями информации развития всего организма в онтогенезе. ЭСК являются уникальными плюрипотентными клеточными популяциями. К основным свойствам ЭСК относятся способность к самообновлению, т.е. к неограниченной пролиферации, и одновременно способность к дифференцировке во все типы соматических клеток и в линию половых клеток. Линии ЭСК являются уникальной экспериментальной моделью для фундаментальных

исследований в разных областях клеточной и молекулярной биологии, а также для прикладных исследований в области регенеративной медицины, фармакологии и токсикологии.

Полученные из предимплантационных бластоцист новые постоянные линии ЭСК (SC5, SC6, SC7) прошли более 120 удвоений клеточной популяции, сохранили нормальный диплоидный кариотип и способность дифференцироваться *in vitro* в производные трех зародышевых листков. Эти линии экспрессируют маркеры недифференцированных ЭСК: Oct-4, Nanog, SSEA-4, TRA-1-60, щелочную фосфатазу. Недифференцированные клетки линий SC5, SC6 и SC7 экспрессируют гены DPPA3/STELLA, DAZL, специфичные для линии половых клеток, и не экспрессируют соматические маркеры дифференцировки. Линии SC5, SC6 и SC7, образовывали *in vivo* тератомы, содержащие производные трех зародышевых листков. Кроме того, известны данными о наличии в ряде линий ЭСК человека экспрессии генов транспортеров множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), обеспечивающих механизм защиты от повреждающих воздействий различными химическими факторами (1—3). С помощью иммунофлуоресцентного и ПЦР анализа в полученных нами линиях обнаружена экспрессия гена транспортера МЛУ ABCG2 в недифференцированных ЭСК всех линий и эмбрионидных тельцах, дифференцирующихся в течение 10 дней, тогда как экспрессия транспортера ABCB1 выявлена с помощью ПЦР анализа только в дифференцирующихся эмбрионидных тельцах всех линий. Возможно, что экспрессия транспортера ABCB1 развивается в процессе дифференцировки, как это показано для мезенхимной дифференцировки ЭСК человека (4). Совокупность представленных результатов подтверждает статус ЭСК человека (5).

Полученные линии культивировали в стандартных общепринятых для ЭСК человека условиях, включающих присутствие фидерных клеток в качестве субстрата. В роли фидерных клеток выступают фибробласты разного происхождения. Фидерные клетки экспрессируют факторы, способствующие росту ЭСК. В результате такого культивирования имеются 2 динамичные живые системы, каждая из которых зависит от условий культивирования. Таким образом, условия, созданные для ЭСК *in vitro*, менее стабильны, чем для других клеток, культивирующихся на постоянном субстрате, что может способствовать изменчивости клеточных линий ЭСК при длительном культивировании. Любой ксеногенный или аллогенный фидер не исключает риска контаминации для ЭСК. Кроме того, использование ЭСК человека для биомедицинских исследований предполагает также исключение из систем

культивирования любых ингредиентов животного происхождения (эмбриональную бычью сыворотку, некоторые добавки животного происхождения), которые также могут создать риск инфекций, в частности, способствовать контаминации вирусами и N-гликолил производным нейраминовой кислоты, инициирующей иммунный ответ после трансплантации (6—10). Поэтому преимущество при культивировании линий ЭСК имеют аутогенные фидерные клетки человека (11—16). Тем не менее, исследователи ищут пути преодоления нестабильности линий ЭСК, возможной при культивировании их на любых фидерных клетках, с исключением при культивировании ингредиентов животного происхождения.

В связи с этим одной из важных задач, связанных с использованием ЭСК человека в фундаментальных и прикладных исследованиях, является освобождение их от сопутствующих фидерных клеток, т.е. разработка бесфидерных систем культивирования, которые состоят из двух основных компонентов: субстрата и ростовой среды. Подбор оптимальных субстратов для бесфидерного культивирования основан, главным образом, на взаимодействии белков внеклеточного матрикса (ВКМ) с интегринами, экспрессируемыми ЭСК в определенных ростовых средах. В настоящее время наиболее часто используют следующие субстраты: Матригель (17); отдельные белки ВКМ — ламинин, фибронектин, коллаген, витронектин (18—21); искусственно синтезируемые пептиды (22); синтетические субстраты (23); белки ВКМ, синтезированные фидерными клетками (24, 25). Для успешного культивирования ЭСК человека на бесфидерных субстратах необходим подбор ростовой среды, оптимальной для данного субстрата.

В настоящее время не получено унифицированной оптимальной бесфидерной системы культивирования, способной поддерживать рост любой линии ЭСК человека, являющейся стабильной по своим характеристикам и исключающей риск ксеногенной или аллогенной контаминации. Каждая система обладает определенными недостатками. В связи с этим работы по оптимизации систем культивирования ЭСК человека до сих пор являются актуальными. Возможно, что исходя из генетической уникальности каждой линии ЭСК, помимо оптимизации условий культивирования в целом для ЭСК человека, необходим индивидуальный подход, связанный с применением некоторых методических модификаций.

В результате проведенной работы была создана бесфидерная система культивирования ЭСК человека с использованием субстрата, который составляют белки ВКМ, синтезированные фидерными клетками, представляющими собой мезенхимные стволовые клетки (SC5-MSC), полученные из исходной линии ЭСК — SC5. В составе субстрата обнаружены белки ВКМ:

фибронектин и ламинин, способствующие росту ЭСК в бесфидерных системах. Существенным компонентом этой системы является использование SC5-MSC кондиционированной среды. Получены 2 сублинии ЭСК человека: сублинию SC5-FF культивировали в аутогенной, а сублинию SC7-FF — в аллогенной бесфидерной системе. Сублинии SC5-FF и SC7-FF прошли соответственно более 300 и 115 удвоений клеточной популяции, что значительно превосходит лимит Хейфлика. Линии сохранили нормальный диплоидный кариотип и способность дифференцироваться *in vitro* в производные трех зародышевых листков. Гистохимический и иммунофлуоресцентный анализы показали, что эти сублинии экспрессируют маркеры недифференцированных ЭСК: щелочную фосфатазу, Oct-4, SSEA-4, TRA-1-81, а также антиген транспортера множественной лекарственной устойчивости ABCG2. С помощью ПЦР-анализа показано, что недифференцированные клетки линии SC5-FF, подобно исходной линии SC5, поддерживаемой в фидерной системе культивирования, экспрессируют гены *OCT4*, *NANOG* для соматических клеток и *DPPA3/STELLA*, *DAZL* для линии половых клеток. В ходе дифференцировки эмбрионидных телец экспрессия генов *OCT4*, *NANOG*, *DPPA3/STELLA* и *DAZL* постепенно снижалась, а возрастала экспрессия генов, специфичных для ранних дифференцированных клеток: *GATA4*, *AFP* (внезародышевой и зародышевой энтодермы), *PAX6* (нейроэктодермы) и *BRY* (мезодермы). Сравнительный анализ ряда характеристик ЭСК (кариотипическая структура, среднее время удвоения клеточной популяции и количество недифференцированных клеток в популяциях) не показал существенных различий между исходными линиями SC5, SC7 и полученными из них сублиниями SC5-FF, SC7-FF. Это свидетельствует о том, что бесфидерные системы культивирования, которые гораздо стабильнее любых фидерных систем, не нарушают ключевые характеристики ЭСК в течение длительного времени и могут быть рекомендованы для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований, проводимых с использованием ЭСК человека (26).

Но, тем не менее, если фундаментальные исследования, проводимые на ЭСК человека, актуальны для различных областей клеточной и молекулярной биологии, а также эмбриологии, то для использования ЭСК в прикладных биомедицинских исследованиях существует ряд препятствий (27—34).

Одним из путей использования ЭСК человека в регенеративной медицине является получение из них мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (МСК). При этом нивелируются основные трудности, мешающие использованию ЭСК в этой области. Известно,

что МСК, полученные из разных тканей взрослого организма (так называемые «взрослые МСК»), после определенного тестирования могут относительно безопасно использоваться в клеточной терапии (35—38). Но при использовании многих типов МСК возникают проблемы, связанные с невозможностью получения большого количества клеток в связи с невысоким пролиферативным потенциалом и с применением инвазивных методов получения этих клеток от доноров. МСК, полученные из ЭСК человека, по-видимому, могут явиться альтернативной моделью для использования их в клеточной терапии. Эти клеточные популяции, сходные с взрослыми МСК по гомогенной фибробластоподобной морфологии, основным поверхностным маркерам, иммуномодулирующим свойствам и мультипотентной дифференцировке, являются неограниченным источником получения генетически однородных клеточных популяций без использования инвазивных процедур. Работы в этом направлении начались сравнительно недавно. В настоящее время известно, что МСК, выделенные из ЭСК, обладают большим, чем взрослые МСК, пролиферативным потенциалом, более низкой экспрессией генов HLA-ABC и увеличенной экспрессией ряда туморсупрессорных генов (33, 39—48). Тем не менее, активно получают и используют в прикладных биомедицинских исследованиях МСК, выделенные и из других источников, которыми являются разные ткани эмбрионов и взрослых организмов.

Показано, что важнейшим механизмом действия МСК на поврежденные ткани является способность их к миграции в эти участки и оказание трофического действия, путем секреции биоактивных факторов, изменяющих микроокружение поврежденных клеток, тем самым способствуя улучшению тканевой репарации (44, 49—52). В настоящее время в литературе широко обсуждаются механизмы тканевой репарации с помощью МСК, связанные с продукцией цитокинов и паракринных факторов. Существует и другой механизм, обеспечивающий дифференцировку МСК в функциональные клетки, которые заменяют поврежденные. Но есть ряд данных, свидетельствующих о том, что при трансплантации МСК обнаруживается низкий уровень их приживления, но при этом имеет место существенный положительный терапевтический эффект при различных повреждениях легких, почек, костей, хрящей, при диабете, инфаркте и т.д. Поэтому исследователи придают большое значение трофическому механизму действия МСК, используемых для тканевой репарации (49, 53).

Задачей нашей работы было получение и сравнительное изучение МСК, выделенных из разных источников: из ЭСК, костного мозга раннего эмбриона и крайней плоти ребенка. В результате проведенной работы получены новые неиммортизированные

фибробластоподобные клеточные линии человека: линия SC5-MSC из ЭСК, линия FetMSC из костного мозга 5—6-недельного эмбриона и линия FRSN из крайней плоти 3-х-летнего ребенка. Все линии успешно используются в качестве фидера при культивировании ЭСК человека. Среднее время удвоения клеточных популяций составляло  $25.5 \pm 0.1$  ч (SC5-MSC);  $33.5 \pm 1.4$  ч (FetMSC) и  $30.0 \pm 0.8$  ч (FRSN). Для линии SC5-MSC среднее время удвоения было достоверно меньше, чем для FetMSC ( $P < 0.01$ ). Кривые роста свидетельствуют об активной пролиферации клеток всех линий. Но наиболее активный рост наблюдался для линии SC5-MSC. Количественный и структурный кариотипический анализ показал, что эти линии имеют нормальный кариотип: 46, XX (SC5-MSC) и 46, XY (FetMSC и FRSN). Сравнительный анализ поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии выявил во всех линиях экспрессию поверхностных антигенов, характерных для МСК человека: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC и отсутствие экспрессии CD34 и HLA-DR (табл.1). Наблюдаемые межлинейные различия по ростовым характеристикам и по экспрессии CD90 и HLA-ABC не имеют принципиального значения для определения статуса МСК.

Таблица 1.

Экспрессия поверхностных маркеров в клетках линий SC5-MSC, FetMSC и FRSN

Маркер	SC5-MSC	FetMSC	FRSN
CD44	$99.3 \pm 0.5$	$99.5 \pm 0.1$	$98.7 \pm 0.3$
CD73	$99.6 \pm 0.2$	$99.6 \pm 0.1$	$98.9 \pm 0.4$
CD90	$57.3 \pm 1.5$	$87.4 \pm 4.6$	$98.4 \pm 0.9$
CD105	$97.5 \pm 1.4$	$95.4 \pm 2.5$	$93.8 \pm 1.3$
CD34	$0.13 \pm 0.07$	$0.20 \pm 0.08$	$0.6 \pm 0.4$
HLA-ABC	$37.0 \pm 15.0$	$26.4 \pm 0.2$	$71.5 \pm 6.4$
HLA-DR	$0.27 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.04$	$0.19 \pm 0.09$

Примечание: приведены средние ( $\bar{x} \pm s_x$ , %) из 4-х экспериментов.

Показана способность клеток всех линий направленно дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлениях (36), а также — в хондрогенном направлении

(неопубликованные данные). Все представленные характеристики подтверждают статус МСК человека.

Иммунофлуоресцентный и цитофлуориметрический анализ экспрессии поверхностных маркеров и транскрипционного фактора Oct-4, характерных для ЭСК человека, показал, что во всех 3-х линиях отсутствует экспрессия TRA-1-60 и Oct-4, а по экспрессии SSEA-4 наблюдаются межлинейные различия, не зависящие от происхождения клеток. Пока неясно, имеют ли обнаруженные межлинейные различия существенное влияние на функциональный статус МСК. С помощью иммунофлуоресцентного анализа в клетках всех линий показана экспрессия маркеров ранней дифференцировки в производные 3-х зародышевых листков, характеризующих ЭСК, что, возможно, обеспечивает широкие возможности МСК при репарации разных тканевых повреждений в зависимости от соответствующего микроокружения.

Линии ЭСК человека, полученные в разных системах культивирования, используются пока для внутренних исследований в коллекции. Тогда как полученные неиммортизированные клеточные линии МСК человека (SC5-MSC, FetMSC и FRSN) включены в фонды КККП. Для них разработаны, согласно международным требованиям, паспорта, которые размещены на сайте Института цитологии РАН в разделе «Коллекции и каталоги» по адресу: [www.cytspb.rssi.ru](http://www.cytspb.rssi.ru) Образцы этих линий предназначены для обеспечения пользователей коллекции.

### Список литературы

1. **Sarkadi B., Homolya L., Szakacs G., Varadi A.** Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol. Rev.*, 2006, 86: 1179—1236.
2. **Sarkadi B., Orbán T.I., Szakács G., Várady G., Schamberger A., Erdei Z., Szebényi K., Homolya L., Apáti A.** Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice? *Stem Cells*, 2010, 28: 174—176.
3. **Erdei Z, Sarkadi B, Brózik A, Szebényi K, Várady G, Makó V, Péntek A, Orbán TI, Apáti Á.** Dynamic ABCG2 expression in human embryonic stem cells provides the basis for stress response. *Eur Biophys J.*, 2013, 42: 169—179.
4. **Barbet R, Peiffer I, Hutchins J.R, Hatzfeld A, Garrido E, Hatzfeld J.A.** Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells: possible role of ABC plasma membrane transporters in maintaining human stem cell pluripotency. *Cell Cycle.*, 2012, 11: 1611—1620.
5. **Кольцова А.М., Гордеева О.Ф., Крылова Т.А., Лифанцева Н.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Сравнительные характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a. *Онтогенез*, 2011, 42 (4): 249—263.

6. **Martin M.J., Muotri A., Gage F., Varki A.** Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat. Med.*, 2005, 11: 228—232.

7. **Heiskanen A., Satomaa T., Tiitinen S., Laitinen A., Mannelin S., Impola U., Mikkola M., Olsson C., Miller-Podraza H., Blomqvist M., Olonen A., Salo H., Lehenkari P., Tuuri T., Otonkoski T., Natunen J., Saarinen J., Laine J.** N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem cells.*, 2006, 25: 197—202.

8. **Stacey G.N., Cobo F., Nieto A., Talavera P., Healy L., Concha A.** The development of 'feeder' cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: challenges and solutions. *J. Biotechnol.*, 2006, 125: 583—588.

9. **Cobo F., Navarro J.M., Herrera M.I, Vivo A., Porcel D., Hernández C., Jurado M., García-Castro J., Menendez P.** Electron microscopy reveals the presence of viruses in mouse embryonic fibroblasts but neither in human embryonic fibroblasts nor in human mesenchymal cells used for hESC maintenance: toward an implementation of microbiological quality assurance program in stem cell banks. *Cloning Stem Cells.*, 2008, 10: 65—74.

10. **Kubikova I., Konecna H., Sedo O., Zdrahal Z., Rehulka P., Hribkova H., Rehulkova H., Hampl A., Chmelik J., Dvorak P.** Proteomic profiling of human embryonic stem cell-derived microvesicles reveals a risk of transfer of proteins of bovine and mouse origin. *Cytherapy*, 2009. 11: 330—340.

11. **Stojkovic P., Lako M., Stewart R., Przyborski S., Armstrong L., Evans J., Murdoch A., Strachan T., Stojkovic M.** An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23: 306—314.

12. **Yoo S.J., Yoon B.S., Kim J.M., Song J.M., Roh S., You S., Yoon H.S.** Efficient culture system for human embryonic stem cells using autologous human embryonic stem cell-derived feeder cells. *Exp Mol Med.*, 2005, 37: 399—407.

13. **Choo A., Ngo A.S., Ding V., Oh S., Kiang L.S.** Autogeneic feeders for the culture of undifferentiated human embryonic stem cells in feeder and feeder-free conditions. *Methods Cell Biol.*, 2008, 86: 15—28.

14. **Chen H.F., Chuang C.Y., Shieh Y.K., Chang H.W., Ho H.N., Kuo H.C.** Novel autogeneic feeders derived from human embryonic stem cells (hESCs) support an undifferentiated status of hESCs in xeno-free culture conditions. *Hum Reprod.*, 2009, 24: 1114—1125.

15. **Fu X, Toh W.S., Liu H., Lu K., Li M., Hande M.P., Cao T.** Autologous feeder cells from embryoid body outgrowth support the long-term growth of human embryonic stem cells more effectively than those from direct differentiation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010, 16: 719—733.

16. **Lee E.J., Kang H.J, Lee H.N., Kang S.K., Kim K.H., Lee S.W., Lee G., Park Y.B., Kim H.S.** New culture system for human embryonic stem cells: autologous mesenchymal stem cell feeder without exogenous fibroblast growth factor 2. *Differentiation.*, 2012, 83: 92—100.

17. **Xu C., Inokuma M.S., Denham J., Golds K., Kundu P., Gold J.D., Carpenter M.K.** Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology.*, 2001, 19: 971—974.

18. **Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J.** Feeder and serum free culture of human embryonic stem cells. *Biol.Reprod.*, 2004, 70: 837—845.

19. **Braam S.R., Zeinstra L., Litjens S., Ward-van Oostwaard D., van den Brink S., van Laake L., Lebrin F., Kats P., Hochstenbach R., Passier R., Sonnenberg A., Mummery C.L.** Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin. *Stem Cells.*, 2008, 26: 2257—2265.

20. Miyazaki T., Futaki S., Hasegawa K., Sanzen N., Hayashi M., Kawase E., Sekiguchi K., Nakatsuji N., Suemori H. Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, 375: 27—32.
21. Jones M.B, Chu C.H, Pendleton J.C, Betenbaugh M.J, Shiloach J, Baljinnyam B, Rubin J.S, Shamblott M.J. Proliferation and pluripotency of human embryonic stem cells maintained on type I collagen. *Stem Cells Dev.*, 2010, 19: 1923—1935.
22. Kolhar P., Kotamraju V.R., Hikita S.T., Clegg D.O., Ruoslahti E. Synthetic surfaces for human embryonic stem cell culture. *J. Biotechnol.*, 2010, 146: 143—146.
23. Nandivada H., Villa-Diaz L.G., O'Shea K.S., Smith G.D., Krebsbach P.H., Lahann J. Fabrication of synthetic polymer coatings and their use in feeder-free culture of human embryonic stem cells. *Nat Protoc.*, 2011, 6: 1037—1043.
24. Klimanskaya I., Chung Y., Meisner L., Johnson J., West M.D., Lanza R. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet.*, 2005, 365: 1636—1641.
25. Ilic D., Stephenson E., Wood V., Jacquet L., Stevenson D., Petrova A., Kadeva N., Codognotto S., Patel H., Semple M., Cornwell G., Ogilvie C., Braude P. Derivation and feeder-free propagation of human embryonic stem cells under xeno-free conditions. *Cytotherapy.*, 2012, 14: 122—128.
26. Кольцова А.М. Воронкина И.В. Гордеева О.Ф. Зенин В.В. Лифанцева Н.В. Мусорина А.С. Смагина Л.В. Яковлева Т.К. Полянская Г.Г. Разработка новой бесфидерной системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании. *Цитология*, 2012, 54 (8): 637—651.
27. Donovan P.J., Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 2001, 414: 92—97.
28. Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 2001, 19: 193—204.
29. Drukker M., Katz G., Urbach A., Urbach A., Schuldiner M., Markel G., Itskovitz-Elder J., Reubinoff B., Mandelboim O., Benvenisty N. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, 99: 9864—9869.
30. Drukker M., Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends in Biotechnol.*, 2004, 22: 135—141.
31. Allegrucci C, Young L.E. Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum. Reprod. Update.*, 2007, 13: 103—120.
32. Гордеева О.Ф., Миталипов Ш.М. Плюрипотентные стволовые клетки: поддержание генетической и эпигенетической стабильности и перспективы клеточных технологий. *Онтогенез*, 2008, 39 (6): 405—419.
33. Lee E.J., Lee H.N., Kang H.J., Kim K.H., Hur J., Cho H.J., Lee J., Chung H.M., Cho J., Cho M.Y., Oh S.K., Moon S.Y., Park Y.B., Kim H.S. Novel embryoid body-based method to derive mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16: 705—715.
34. Полянская Г.Г., Кольцова А.М. Проблема нестабильности генома при культивировании эмбриональных стволовых клеток человека (обзор). *Сб. «Клеточные культуры» (информ. бюлл.)*, 2013, 29: 3—13.
35. Kita K, Gauglitz G.G, Phan T.T, Herndon D.N, Jeschke M.G. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev.*, 2010, 19: 491—502.
36. Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В, Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных

из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология, 2012, 54 (1): 5—16.

37. **Zhang H, Zhang B, Tao Y, Cheng M, Hu J, Xu M, Chen H.** Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from whole human umbilical cord applying a single enzyme approach. *Cell Biochem Funct.*, 2012, 30: 643—649.

38. **Leyva-Leyva M, Barrera L, López-Camarillo C, Arriaga-Pizano L, Orozco-Hoyuela G, Carrillo-Casas EM, Calderón-Pérez J, López-Díaz A, Hernandez-Aguilar F, González-Ramírez R, Kawa S, Chimal-Monroy J, Fuentes-Mera L.** Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. *Stem Cells Dev.*, 2013, 22: 1275—1287.

39. **Barberi T., Willis L.M., Socci N.D., Studer L.** Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med.*, 2005, 2: e161.

40. **Lian Q., Lye E., Suan Yeo K., Khia Way Tan E., Salto-Tellez M., Liu TM., Palanisamy N., El Oakley R.M., Lee E.H., Lim B., Lim S.K.** Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells*, 2007, 25: 425—436.

41. **Trivedi P., Hematti P.** Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol.*, 2008, 36: 350—359.

42. **de Peppo G.M., Svensson S., Lennerås M., Synnergren J., Stenberg J., Strehl R., Hyllner J., Thomsen P., Karlsson C.** Human embryonic mesodermal progenitors highly resemble human mesenchymal stem cells and display high potential for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part A.*, 2010, 16: 2161—2182.

43. **Choo A., Lim S.K.** Derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.*, 2011, 690: 175—182.

44. **Gruenloh W., Kambal A., Sondergaard C., McGee J., Nacey C., Kalomoiris S., Pepper K., Olson S., Fierro F., Nolte J.A.** Characterization and In Vivo Testing of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Tissue Eng Part A.*, 2011, 17: 1517—1525.

45. **Hematti P.** Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors: an overview. *Methods Mol Biol.*, 2011, 690: 163—174.

46. **Lin W, Oh S.K, Choo A.B, George A.J.** Activated T cells modulate immunosuppression by embryonic- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells through a feedback mechanism. *Cytotherapy*, 2012, 14: 274—284.

47. **Tan Z., Su Z.Y, Wu R.R., Gu B., Liu Y.K., Zhao X.L., Zhang M.** Immunomodulative effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in vivo and in vitro. *J Zhejiang Univ Sci B.*, 2011, 12: 18—27.

48. **Varga N, Veréb Z, Rajnavölgyi E, Németh K, Uher F, Sarkadi B, Apáti A.** Mesenchymal stem cell like (MSCI) cells generated from human embryonic stem cells support pluripotent cell growth. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2011, 414: 474—480.

49. **Phinney D.G., Prockop D.J.** Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*, 2007, 25: 2896—2902.

50. **Carvalho M.M., Teixeira F.G., Reis R.L., Sousa N., Salgado A.J.** Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.*, 2011, 6: 221—228.

51. **Guiducci S, Manetti M, Romano E, Mazzanti B, Ceccarelli C, Dal Pozzo S, Milia AF, Bellando-Randone S, Fiori G, Conforti ML, Saccardi R, Ibbá-Manneschi L, Matucci-Cerinic M.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells from early diffuse systemic sclerosis exhibit a paracrine machinery and stimulate angiogenesis in vitro. *Ann Rheum Dis.*, 2011, 70: 2011—2021.

52. Luo J, Zhao X, Tan Z, Su Z, Meng F, Zhang M. Mesenchymal-like progenitors derived from human embryonic stem cells promote recovery from acute kidney injury via paracrine actions. *Cytotherapy*, 2013, 15: 649—662.

53. Caplan A.I., Dennis J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.*, 2006, 98: 1076—1084.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОБЪЕКТОВ КОЛЛЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

*И.Н. Кузовкина, М.Ю. Прокофьева*

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, [ikuz@mail.ru](mailto:ikuz@mail.ru)

В настоящем сообщении представлены результаты исследований, проведенных в последнее время с генетически трансформированными корнями растений (*hairy roots*) в культурах *in vitro*, которые поддерживаются в коллекции Института физиологии растений. *Hairy roots* лекарственного растения руты душистой были использованы при изучении пространственной организации вторичного метаболизма. Исследована закономерность распределения образующихся в корневых тканях вторичных соединений, а также уточнена роль так называемых «пограничных клеток» в установлении контактов корней растения с представителями ризосферы и в создании определенной для растения *rhizodeposition*. Проведены исследования с корнями ценного лекарственного исчезающего растения — шлемника байкальского. В условиях *in vitro* корни этого растения синтезируют типичные для него флавоны в количестве, сопоставимом с их содержанием в корнях целого растения. Один из флавонов корней шлемника — вогонин обладает селективной противоопухолевой активностью. Химический синтез вогонина не дал пока положительных результатов. В ходе исследований *hairy roots* шлемника байкальского была разработана определенная стратегия их культивирования в условиях биореактора, которая позволит создать новый биотехнологический способ получения вогонина, обладающего уникальной цитотоксической активностью.

**Ключевые слова:** генетически трансформированные корни (*hairy roots*), вторичные метаболиты, пограничные клетки корней (*root border cells*), *rhizodeposition*, флавоны, байкалин, вонозид, байкалеин, вогонин,  $\beta$ -глюкуронидаза, *bioconversion*.

Коллекция генетически трансформированных корней растений (КГТКР) Института физиологии растений (ИФР РАН) представляет собой собрание изолированно растущих в условиях *in vitro* корней растений, так называемых *hairy roots*, полученных в результате встраивания Т-ДНК Ri плазмиды диких штаммов *Agrobacterium rhizogenes* в геном растительной клетки (1, 2). Стимулом для создания коллекции послужил наблюдавшийся в 80-х годах прошлого столетия прогресс в технологии копирования в лабораторных условиях процесса встраивания Т-ДНК pRi, происходящего с растениями в естественных условиях. Проведение этих манипуляций в асептических условиях приводит, как правило, к проявлению ризогенеза в растительном экспланте, а последующее отделение образующихся в результате трансформации *hairy roots*, обеспечивает возможность их длительного и строго контролируемого культивирования. Первая *hairy root culture* лекарственного растения *Reganium harmala* была получена в ИФР РАН 25 лет тому назад (3), и к концу XX столетия количество введенных в культуру штаммов корней растений достигло 30. В 1999 году собрание полученных в результате трансформации *hairy roots* было официально оформлено в виде специализированной коллекции, которая была включена в состав Российской коллекции клеточных культур (РККК). К настоящему времени в состав коллекции входит 40 штаммов корневых культур, которые были иницированы от 26 видов двудольных растений, относящихся к 12 семействам. Основная часть культур была получена сотрудниками Группы специализированного метаболизма корней ИФР РАН.

Основное отличие культивируемых в условиях *in vitro* генетически трансформированных корней от растительных объектов, входящих в состав Всероссийской коллекции клеток высших растений ИФР РАН, состоит в том, что все *hairy roots* отлично растут в питательных средах с относительно простым составом компонентов, не содержащих экзогенные ростовые вещества, которые необходимы для культивирования не дифференцированно растущих клеток и тканей растений. Это отличие обеспечивает возможность использования введенных в культуру корней в качестве источников экологически чистого альтернативного сырья, которое потенциально способно восполнить дефицит обычно используемого в медицине и в пищевой промышленности растительного сырья корневого происхождения. Сохранение культивируемыми *in vitro hairy roots* морфологии корней с первичным типом роста (без роста за счет утолщения) приближает их по степени дифференциации к корням интактных растений, что обеспечивает возможность сохранения в них синтеза корнеспецифичных вторичных соединений, представляющих практический интерес.

Быстрый и стабильный рост введенных в культуру *hairy roots* сопровождается их интенсивным ветвлением. В результате масса корневых эксплантов к концу 4-ой недели роста в колбах с жидкой питательной средой увеличивается в 20—40 раз, и извлечение их из колб для проведения процедуры пассирования растительного материала с целью его сохранения и размножения требует определенных усилий при соблюдении полной стерильности. Малейшее нарушение асептики может привести к контаминации корневой культуры, от которой в ряде случаев бывает трудно избавиться. Убедившись в этом на собственном опыте, мы разработали специальную технологию, которая позволяет элиминировать случайно произошедшее инфицирование. Смысл ее состоит в проведении контаминированных бактериями инокулятов корней через так называемые искусственные семена (ИС), которые представляют собой небольшие фрагменты корневых окончаний (0,2—0,5 см), инкапсулированные в гелеподобный матрикс, содержащий альгинат натрия. Полученные в результате ИС сохраняют жизнеспособность при их выдерживании в течение нескольких месяцев в холодильнике при температуре около 4°C. Столь компактное и длительное хранение ИС делает возможным транспортировку корневых инокулятов на большие расстояния, например в другой город или страну. Добавление в матрикс ИС антибиотика (клафорана) обеспечивает эффективное избавление от бактериальной инфекции в результате локального воздействия антибиотика на небольшой фрагмент корня. Интересно, что проведение корневых инокулятов через ИС приводило в результате к некоторым морфологическим изменениям возобновленных из них *hairy roots*, как, например, к неожиданному проявлению стеблевого органогенеза у корневой культуры (*Ruta graveolens*) или к позеленению корней (*Scutellaria baicalensis*) при их выращивании в условиях освещения. Эти изменения являются ответной реакцией растительного материала на созданную в результате их инкапсулирования стрессовую ситуацию (анаэробноз, пониженная температура, антибиотик). Апробация разработанной технологии получения ИС привела нас к выводу о целесообразности ее использования для некоторой тонизации полученных *hairy roots*, которая улучшает рост длительно культивируемых корней. Детали этой методической работы, направленной на обеспечение стабильности роста корневых культур коллекции, запатентованы (4) и изложены в статье (5).

При создании коллекции основное внимание уделялось тем растениям, в корнях которых, согласно литературным данным, обнаружены низкомолекулярные метаболиты, представляющие практический интерес и применяющиеся в медицинской или в пищевой

промышленности. Однако в ряде случаев в культуру *in vitro* вводились корни обычных растений, в основном, с целью их использования в качестве модельной системы при изучении некоторых физиологических аспектов растительного сообщества. Так, например, введенные в культуру *hairy roots* моркови в течение ряда лет служили удобной модельной системой при изучении процесса установления симбиотических контактов корней с гифами арбускулярно-микоризных (АМ) грибов и наблюдения за последующими деталями развития образовавшейся микоризы в условиях *in vitro*. Совместное культивирование *hairy roots* моркови доказало целесообразность использования такой двойной аксеничной культуры в качестве надежного способа длительного сохранения чистоты грибных инокулятов, так как микоризованные корни моркови обеспечивали возможность обильного спороношения АМ-грибов в строго контролируемых условиях (6).

Состав объектов коллекции постоянно претерпевает некоторые изменения, что объясняется сложностью поддержания в культуре большого количества *hairy roots*, а также происходящими изменениями тематических интересов малочисленного состава группы. Неизменным остается интерес к культивированию корней ценных или необычных лекарственных растений. К последним относится рута душистая (*Ruta graveolens*) — растение с очень богатым составом вторичных метаболитов (около 200), относящихся к различным группам низкомолекулярных соединений. Особенностью растения является тот факт, что синтез этих веществ органоспецифичен, то есть корневая и надземная части растения образуют различные вторичные вещества, для основной части которых характерна своеобразная первичная флуоресценция. Наиболее интересными в этом отношении являются именно корни, которые поддерживаются в коллекции с 1991 года. Еще в 1976 году группа венгерских и немецких исследователей отметила, что апикальная часть молодых корней целого растения руты имеет интенсивное оранжевое свечение при возбуждении ультрафиолетом с длиной волны 365 нм, которое характерно для акридоновых алкалоидов (7). При уровне приборной и методической оснащенности того периода приходилось ограничиваться предположениями. Идентификация вторичных метаболитов в корнях руты стала возможной при появлении лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (LSCM), которая в сочетании с методами ЯМР-спектроскопии и хроматомасс-спектрометрии позволила нам в 2004 году получить интересные результаты о пространственной организации образования низкомолекулярных соединений в растущих корнях этого растения. Большим преимуществом *hairy roots* руты является их интенсивное ветвление, что позволяет получать

до 200 корневых апексов от одного экспланта в течение 4 недель его роста в жидкой питательной среде. Это дало нам возможность собрать достаточное для химического анализа количество однородного растительного материала, что позволило охарактеризовать качественный состав вторичных метаболитов, локализованных в клетках меристематической зоны, зоны растяжения и зоны дифференциации корней (8). Оказалось, что в клетках меристематической зоны корней содержится только один акридоновый алкалоид, который был идентифицирован как гликозид гравоакридондиола, имеющий наряду со всеми акридоновыми алкалоидами, интенсивную оранжевую флуоресценцию. В клетках двух других зон — растяжения и особенно дифференциации, в которой присутствовали многочисленные корневые волоски, состав вторичных метаболитов был более разнообразным, и он мало отличался от состава вторичных соединений зрелой части корня. LSCM меристематической части корня руты показала, что гликозид гравоакридондиола локализован только в поверхностном слое клеток этой зоны, который представлен клетками плотно прилегающего к меристеме корневого чехлика — калиптры. Клетки же непосредственно меристемы не содержали вторичных метаболитов и имели обычную для растительных клеток голубоватую флуоресценцию. Характерно, что клетки калиптры, по мере роста кончика корня утрачивают свой тесный контакт с корневым апексом и, отделяясь от него, превращаются в свободно существующие клетки, так называемые пограничные клетки (ПК), которые представляют собой еще одну важную группу клеток, характерную для корневых апексов. Следует отметить, что локализация вторичных метаболитов в апикальной части корня — достаточно редко встречающееся явление. Именно поэтому результаты, полученные с изолированно растущими корнями руты, вторичные метаболиты которой хорошо детектируются благодаря их флуоресценции, представляют особую ценность для понимания той физиологической роли, которую ПК могут выполнять во время роста корня в субстрате. Характерно, что ПК при своем полном отделении от корневого апекса изменяют характер флуоресценции, но в каждой из живых ПК всегда остается маленькое включение, которое стабильно сохраняет оранжевое свечение. Интенсивно ветвящиеся *hairy roots* руты отделяют в питательную среду большое количество ПК (до 300 000 на один корневой эксплант), которые сохраняют свою жизнеспособность в виде мелко дисперсной клеточной суспензии, сосуществующей с корнями при их культивировании в течение 4 недель. Нам удалось отработать способ отделения ПК и после сбора достаточного для химического анализа материала идентифицировать основные вторичные соединения, которые содержались в свободно существующих ПК. Состав

вторичных метаболитов в них был более сложным, чем в клетках калиптры, и он мало отличался от состава вторичных соединений корней руты. При этом в ПК практически отсутствовал гликозид гвакридондиола, и группа акридоновых алкалоидов была представлена, в основном, липофильными акридоновыми алкалоидами, типичными для корней руты. Таким образом, культивирование *hairy roots*, обеспечивая проведение работы в стерильных условиях, обеспечила возможность изучения морфологических и физиолого-биохимических особенностей ПК корней, которые осуществляют в условиях *in vivo* функцию носителей химической информации при установлении контактов корней растений с представителями ризосферы. Так, например, акридоновые алкалоиды, обнаруженные в ПК корней руты, обладают фунгитоксичной активностью, что, возможно, и является препятствием для установления на них арбускулярной микоризы (неопубликованные данные). В случае других растений иной состав ПК может играть аттрагирующую роль и способствовать контактам АМ-грибов с корнями. Уникальность ПК корней как непосредственных носителей химической информации бесспорна, и дальнейшие исследования с привлечением культивируемых *hairy roots* других видов растений несомненно смогут более детально аргументировать их значение во взаимоотношениях корней растений с представителями ризосферы, а также их прямого участия в переносе органического материала корней в почвенный субстрат (*rhizodeposition*). Работа в этом направлении продолжается.

Генетическая стабильность *hairy roots* и их способность к сохранению в условиях *in vitro* синтеза корнеспецифичных низкомолекулярных метаболитов на уровне корней целого растения легли в основу исследований, проводимых в настоящее время с корнями ценного лекарственного растения — шлемника байкальского. Корни шлемника, стабильно растущие в течение 20 лет в условиях *in vitro*, синтезируют типичные для растения флавоны — байкалеин и вогонин и соответствующие им глюкурониды — байкалин и вогонозид, обладающие высокой физиологической активностью (9, 10). Количественное содержание этих ценных флавонов в изолированно растущих корнях в 3 раза ниже их концентрации в корнях многолетнего растения, что естественно, так как *hairy roots* не обладают способностью ко вторичному росту и, следовательно, к накоплению вторичных метаболитов. Этот недостаток компенсируется быстрым и круглогодичным ростом *hairy roots*, что гарантируют возможность их использования как экологически чистого лекарственного сырья нового типа. Биохимическая особенность *hairy roots* шлемника состоит в ином количественном соотношении образующихся в них флавонов по сравнению с этим параметром корней целых растений. Если в корнях

многолетнего растения доминирующим флавоном является байкалин и, соответственно, его агликон байкалеин, то в *hairy roots* наблюдается обратная картина — в них в роли основного флавона выступает вогонозид и его агликон вогонин (11). Содержание и количественное соотношение этих двух групп флавонов стабильны и сохраняются не только при выращивании *hairy roots* в колбах, но и при апробации их крупномасштабного культивировании в условиях биореактора, проведенном в швейцарской коммерческой фирме ROOTес. Практическую значимость иного соотношения флавонов *hairy roots* шлемника удалось по достоинству оценить после появления в 2007 году публикации японских исследователей, впервые показавших, что вогонин селективно индуцирует апоптоз только опухолевых клеток, не затрагивая при этом нормальные клетки (12). Избирательная цитотоксическая активность вогонина сразу привлекла к себе внимание фитохимиков и фармакологов ведущих институтов различных стран, что проявилось в колоссальном потоке публикаций на эту тему, который не прекращается до настоящего времени. Наиболее профессионально в этом отношении работают исследователи немецкого центра изучения рака (DKFZ) в Гайдельберге, где изучаются возможные механизмы цитотоксического действия вогонина (13,14). На этом этапе стало ясно, что успех в изучении механизма действия вогонина и создание на его основе нового цитотоксического препарата с избирательно проявляющейся активностью требуют не только определенного времени, но и достаточного для такой работы количества вогонина. Химический синтез вогонина пока безрезультатен, поэтому единственным его источником может быть растение — в данном случае шлемник байкальский, как наиболее распространенный вид растения. Следует отметить, что шлемник байкальский относится с 1992 года к числу исчезающих растений РФ, внесенных в Красную книгу СССР. Единственным местом его естественного произрастания в еще достаточном количестве остается Китай, в котором корни шлемника занимают 4-е место в иерархии лекарственных растений, активно используемых в традиционной китайской медицине. В связи с тем, что практически во всех исследованиях при оценке активности флавонов шлемника речь шла о комплексе флавонов, в котором доминирующим по своему содержанию был байкалин и его агликон байкалеин, то считалось, что минорные флавоны комплекса — вогонозид и вогонин выполняют роль своеобразных адъютантов первых двух флавонов. Согласно литературным данным концентрация вогонина в корнях целого растения шлемника колеблется в интервале 0,3—0,8%, а данные о содержании в них вогонозида ранее просто отсутствовали. После появления в 2007 году статьи японских химиков интерес к вогонозиду вдруг проявился, так как стало

ясно, что его можно подвергать гидролизу и получать агликон — вогонин. Но для этого все равно необходимо достаточное количество растительного сырья. К этому моменту и стало очевидным, что таким сырьем, причем экологически абсолютно чистым, могут быть культивируемые *in vitro* корни шлемника, входящие в нашу коллекцию.

Начиная с 2005 года в Фармакологическом институте Томского научного центра (ТНЦ) СО РАМН проводилось тестирование в условиях *in vivo* активности спиртовых экстрактов, приготовленных из *hairy roots* шлемника, выращенных в ИФР РАН в условиях качалочной культуры. Контролем в этих исследованиях был экстракт из корней целых растений шлемника, с которым ранее успешно работали фармакологи ТНЦ. Исследования показали, что экстракт из *hairy roots* не уступает по своей активности экстракту из корней интактного растения, а в ряде случаев его превосходит, несмотря на более низкое содержание в нем флавонов. На основании проведенных исследований в 2012 году коллектив исследователей ТНЦ и ИФР получил патент на создание нового лекарственного средства с многосторонней фармакологической активностью (15). Дальнейшее практическое использование *hairy roots* шлемника будет базироваться на привлечении естественных особенностей корней этого растения, клетки которых содержат собственную, эндогенную  $\beta$ -глюкуронидазу (GUS), которая гидролизует глюкурониды (байкалин и вогонозид) с освобождением из них агликонов (байкалеина и вогонина). Нами было установлено, что этот фермент локализован в клетках эпидермального слоя *hairy roots*, и он, несмотря на свою устойчивость к температурным условиям, очень чувствителен к действию ряда других стрессовых факторов, например, анаэробноза, который можно создать при прекращении качания колб (16). В связи с этим, нами была разработана комплексная стратегия культивирования корней шлемника, которая помимо оптимизации роста корней (для получения большей массы), включает в себя перевод *hairy roots* в стадии их стационарного роста в состояние 24—48-часового анаэробноза с целью активации в них GUS и проведения, таким образом, частичной биоконверсии глюкуронида вогонозида. Для полной биоконверсии вогонозида в вогонин будет использовано последующее температурное воздействие на корневую массу (50—60°C — оптимум активности GUS), которое одновременно будет способствовать и высушиванию корней. Завершающим этапом должно быть извлечение флавонов из сухих корней и препаративное разделение полученного экстракта в том случае, если будут нужны отдельные флавоны, а не весь экстракт с преобладающим в нем содержанием вогонина. Оптимальными условиями для реализации этой стратегии было бы создание биореактора с туманным орошением для

выращивания больших масс *hairy root*, аналогичный тому, в котором были выращены корни в ROOTес. В этом случае круглогодичное культивирование корней шлемника в сочетании с естественно индуцированной биоконверсией вогонозида в вогонин было бы надежной базой для получения достаточного количества ценного флавонола с уникальной цитотоксической активностью. Параллельно с использованием корней шлемника байкальского возможно культивирование *hairy roots* другого вида шлемника, введенных нами в 2007 году в культуру *in vitro* — шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.), от которых нами была получена быстро растущая в безгормональной среде каллусная ткань, синтезирующая только вогонозид. Для культивирования этой запатентованной нами каллусной ткани и для последующей активации в ней эндогенной GUS будет использована аналогичная стратегия, которая была нами уже частично апробирована (17).

### Список литературы

1. **Kuzovkina I. & Schneider B.** Genetically transformed root cultures – generation, properties and application in plant sciences. In: K.Esser, U.Lüttge, W.Beyschlag, J.Murata (eds.) «Progress in Botany», Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006, 67: 275—314.
2. **Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю.** Генетически трансформированные корни как модельная система для изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений, ред. Кузнецов Вл.В., Кузнецов В.В., Романов Г.А., Москва, БИНОМ, Лаборатория знаний, 2012: 37— 53.
3. **Kuzovkina I.N., Gohar A., Alter'man I.E.** Production of  $\beta$ -carboline alkaloids in transformed root cultures of *Peganum harmala* L. Z. Naturforsch.C, 1990, 45: 727—728.
4. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** Способ получения «искусственных семян» из культуры корня шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi), Патент РФ №2415928, 2011г.
5. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** «Искусственные семена» как способ сохранения и оздоровления культивируемых *in vitro* корней лекарственных растений. Физиология растений, 2011, 58 :461—468.
6. **Кузовкина И.Н., Альтерман И.Е., Карандашов В.Е.** Генетически трансформированные корни растений как модель изучения специфики метаболизма и симбиотических контактов корневой системы. Известия АН, серия биологическая, 2004, 3: 310—318.
7. **Verzar-Petri G., Csedo K., Möllmann H., Szendrei K., Reisch J.** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Lokalisierung von Acridon-Alkaloiden in Geweben von *Ruta graveolens*. Planta Medica 1976, 29: 370—375.
8. **Kuzovkina I., Alterman I., Schneider B.** Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. Phytochemistry, 2004, 65: 1095—1100
9. **Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Альтерман И.Е., Карначук Р.А.** Образование флавоноидов в трансформированных корнях *Scutellaria baicalensis* и пути их регуляции. Физиология растений, 2001, 48: 523—528.

10. Kovacs G., Kuzovkina I., Szöke E., Kursinszki L. Determination of flavonoids in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Chromatographia*, 2004, 60: 81—85.
11. Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Ковач Д., Сёке Е. Флавоны генетически трансформированных корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*) и индукция их образования при элиситации метилжасмонатом. *Физиология растений*, 2005, 52: 90—96.
12. Himmji M., Ohtsuki T., Fukazawa E., Tanaka M., Yazaki S., Ui S., Nishio K., Yamamoto H., Tasaka K., Mimura A. Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Letters*, 2007, 245: 269—274.
13. Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treatment Reviews*, 2009, 35: 57—68.
14. Li-Weber M. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Letters*, 2013, 332: 304—312.
15. Дыгай А.М., Суслов Н.И., Зюзьков Г.Н., Кузовкина И.Н., Жданов В.В., Удут Е.В., Гусева А.В., Вдовитченко М.Ю., Шилова И.В., Смирнов В.Ю., Чурин А.А., Воронова О.Л., Симанина Е.В., Неупокоева О.В., Федорова Е.П. Средство, обладающее гемостимулирующим, антимуtagenным, противоопухолевым, церебропротекторным, антигипоксическим, ноотропным, анксиолитическим и противоневротическим действием, Патент РФ № 2438691, 2012 г.
16. Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Прокофьева М.Ю. Перспективы использования культивируемых *in vitro* корней шлемника байкальского как источника селективного цитотоксического флавонола. Материалы докладов VIII Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», РАН, Москва, 2—5 октября 2012 г, стр. 353—359.
17. Кузовкина И.Н., Прокофьева М.Ю., Умралина А.Р., Чернышева Т.П. Морфологические и биохимические особенности генетически трансформированных корней шлемника андрахновидного. *Физиология растений*, 2014, 61: (в печати).

## ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ И ПРОМЫСЛОВЫХ ЖИВОТНЫХ

**Т.В. Гальнбек, Г.Т. Акиншина, К.В. Кулешов**

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко, Москва, [tatyana-galnbek@yandex.ru](mailto:tatyana-galnbek@yandex.ru)

В статье отражены данные о работе Коллекции культур клеток сельскохозяйственных (с/х) и промысловых животных, созданной на базе Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ). Разработаны методы контроля клеточных культур на контаминации микоплазмами и клетками другого видового происхождения. Впервые получены данные о чувствительности к возбудителю токсоплазмоза различных клеточных линий из коллекции

ВИЭВ. Определена ведущая роль стандартизации условий инфицирования токсоплазмами культур клеток и их дальнейшего поддержания для получения высокоспецифичных культуральных антигенов.

**Ключевые слова:** коллекция, культуры клеток, токсоплазма, полимеразная цепная реакция, контаминация.

Коллекция культур клеток с/х и промысловых животных (СХЖ РАСХН) и Криобанк создавались во Всероссийском НИИ экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ), начиная с 1970 г. С 1982 г. коллекция имеет официальный статус в составе Российской коллекции клеточных культур (РККК). Уникальность коллекции заключается в широком наборе культур клеток, полученных из неопухолевых органов и тканей животных (домашних, мелких домашних, диких и др.). Основной состав культур имеет отечественное происхождение. Создавалась и развивалась коллекция под руководством Заслуженного деятеля науки РСФСР, Лауреата премии Совета Министров СССР, доктора биологических наук, профессора, чл.-корр. РАЕН Дьяконова Л.П. (1, 2).

В настоящее время в Коллекции хранятся штаммы и постоянные линии клеток 21 вида животных (более 4000 тысяч образцов хранения). Кроме того, депонировано 8 штаммов гибридом-продуцентов моноклональных антител к иммуноглобулинам с/х животных, к антигенам вирусов, микоплазм и прионов (3).

Коллекция регулярно пополняется за счет новых поступлений и масштабирования имеющихся сертифицированных культур и является национальным достоянием России. За 2008—2013 гг. в коллекцию поступило 24 линии, в том числе: от крупного рогатого скота — 4; свиней — 2; овцы — 1; крысы — 1; мышей (гибридомы) — 6; рыб — 9; человека — 1.

Культуры клеток сохраняются в криобанке как после первичного изолирования, так и во время постоянного культивирования. Осуществляется разработка оптимальных методов изолирования, сохранения, стандартизации клеточных линий и штаммов, включая определение их биологических свойств. Разработаны и постоянно совершенствуются режимы криогенизации применительно к конкретным культурам (4,5).

Особое внимание уделяется стабильности культурально-морфологических, кариологических (включая определение кариотипа) и других свойств культур клеток, в частности, чувствительности к вирусам и патогенным простейшим — облигатным

внутриклеточным паразитам, а также к действию лекарственных препаратов в фармакотоксикологическом скрининге (6).

Специально изучается возможность и степень микопlasма-контаминации, а также случаи контаминирования вирусами, внутриклеточными паразитами и прионами. Разрабатываются методы деконтаминации и сертификации в целях биобезопасности клеточного материала (7, 8, 9). В настоящее время разработана и активно используется методика на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющая проводить идентификацию и видовую дифференциацию восьми видов микоплазм: *Acholeplasma laidlawii*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. bovis*, *M. hyorhinae*, *M. salivarium*, *M. pirum* и *M. orale*, являющихся наиболее частыми источниками контаминации культивируемых клеточных линий. Разработанный подход может являться основным инструментом контроля контаминации микоплазмами и использоваться в целях сертификации и паспортизации коллекционных клеточных линий (10).

В мировой практике лабораторий, работающих с длительно культивируемыми клеточными линиями, показаны случаи несоответствия видовой принадлежности исследуемой клеточной линии, что по мнению исследователей, может быть следствием как перекрестной контаминации клеточных линий при неаккуратной работе исследователя, так и перепутывании клеточных линий в ходе длительного культивирования. В нашей лаборатории разработана методика, которая основана на ПЦР с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РВ), позволяющая проводить идентификацию клеточных линий человека и 12 видов животных. Данная модификация ПЦР позволяет упростить ход анализа и улучшить аналитические характеристики метода. Для видовой идентификации клеточных культур в качестве мишени нами используется митохондриальная ДНК, а, именно, гены, кодирующие цитохром b и субъединицу I цитохром-с-оксидазы. Высокая чувствительность и специфичность методики позволяет достоверно определять присутствие единичных клеток постороннего вида в исследуемой культуре, при одновременной высокой концентрации балластной ДНК. С помощью данного метода проверена видовая принадлежность 25 коллекционных клеточных линий или их отливок, используемых в разнообразных областях для исследований. Метод является быстрым, несложным в реализации на базе многих лабораторий и стандартизируемым, что свидетельствует о его преимуществе по сравнению с используемыми в настоящее время кариологическим и изоферментным анализами, традиционной видоспецифической ПЦР и электрофоретической детекцией продуктов (11,12).

Успехи в области культивирования вирусов и развитие метода клеточных культур позволили решить проблему культивирования патогенных простейших, возбудителей заболеваний человека и животных. *Toxoplasma gondii* — возбудитель токсоплазмоза человека и животных относится к группе облигатных внутриклеточных паразитов, которых до сих пор не удалось культивировать ни на одной синтетической или полусинтетической среде в отсутствие клеток. Метод культур клеток открыл широкие возможности для изучения токсоплазм как в теоретическом отношении, в частности, при исследовании взаимоотношений в системе «паразит-хозяин» на клеточном и субклеточном уровнях (13), так и практическом — при испытании химиотерапевтических препаратов (14), изолировании штаммов, идентификации и выделении паразитов, в развитии методов дифференциальной диагностики, при разработке диагностических препаратов и т.д. (15). Практическому использованию клеточных культур при изучении возбудителя токсоплазмоза способствовало обнаружение его цитопатогенного действия в культурах клеток, а также, выявление широкого спектра клеточных культур разного видового и тканевого происхождения, чувствительных к токсоплазмам.

Однако для успешного культивирования токсоплазм недостаточно знать основные требования, предъявляемые к культивированию клеток. Нами разработаны оптимальные условия размножения паразитов в культивируемых клетках, накопления максимального их количества, а также условия поддержания и хранения штаммов в разных температурных режимах.

Впервые было проведено сравнительное изучение чувствительности к возбудителю токсоплазмоза широкого набора типов клеток-хозяев с/х животных, в основном, депонированных в коллекции ВИЭВ, разной видовой, органной и тканевой принадлежности. Необходимость наличия в Коллекции клеток данных об их чувствительности к заражению облигатными внутриклеточными паразитами крайне актуально и для прикладной, и для фундаментальной паразитологии. Нами были разработаны и стандартизованы новые экспериментальные модели острой и хронической токсоплазмозной инфекции в клеточных системах ЛЭК (легкое эмбриона коровы), ПК (почка кролика), СПЭВ (почка эмбриона свиньи). Определение ведущих параметров стандартизации разработанных экспериментальных моделей острой и хронической инфекций — необходимое условие прижизненной паразитологической диагностики и получения высокоспецифичных клеточных антигенов (16).

В настоящее время на основе регламентации разработанных моделей заканчиваются исследования их в качестве продуцентов биомассы токсоплазм для получения клеточных антигенов (соматического, полученного из инфицированных культур клеток, и метаболитного — полученного из культуральной жидкости инфицированных культур). Использование разработанных нами моделей инфицированных первичнотрипсинизированных и перевиваемых культур клеток животных из криобанка ВИЭВ (ПТ-80 — почка эмбриона коровы, ЛЭК) позволило прийти к заключению, что наилучшие результаты обусловлены в основном условиями стандартизации инфицирования культур клеток и их дальнейшего поддержания, а не выбором самой клеточной системы.

За 2008—2013 гг. опубликована 71 научная работа в отечественных и зарубежных изданиях. Сотрудники приняли участие в 26 международных конференциях. Издано 5 методических рекомендаций, получено 3 патента, подана 1 заявка на патент. Издана монография «Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии)» Москва, 2009, 654 с. и «Каталог клеточных культур позвоночных и беспозвоночных животных» Москва, 2011, 155 с.

### Список литературы

1. **Дьяконов Л.П., Поздняков А.А., Гололобова М.Т.** Поддержание штаммов, создание криобанка первичных и перевиваемых культур клеток. Труды 2-й Всесоюзной конференции биологической промышленности, Москва, 1981: 17—19.
2. **Дьяконов Л.П.** Коллекции должны пополняться. Ветеринарная газета. 1994, 2 (38).
3. **Гулюкин М.И., Дьяконов Л.П., Какпаков В.Т., Гальнбек Т.В., Акиншина Г.Т., Киселева Д.Р., Завьялова Е.А.** Каталог клеточных культур позвоночных и беспозвоночных животных (3-е издание). Москва, 2011, 155 с.
4. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии), под редакцией **Дьяконова Л.П.**, Москва, изд. «Спутник+», 2009, 656 с.
5. **Фридман М.Л., Гальнбек Т.В.** Методические рекомендации по получению и культивированию кератиноцитов кожи плодов кролика, кошки, собаки. Москва 2008, 12 с.
6. **Дьяконов Л.П., Гальнбек Т.В., Киселева Д.Р., Годовых Е.В.** Действие некоторых антираковых препаратов на немалигнизированные постоянные культуры клеток животных, Труды ВИЭВ. 2010, 76: 194—200.
7. **Алексеенкова С.В., Юров Г.К., Гальнбек Т.В., Калита И.А., Юров К.П.** Проверка клеточных культур на контаминацию вирусом диареи крупного рогатого скота — необходимые условия производства биологических перпаратов. Российский ветеринарный журнал. 2013, 1: 15—18.
8. **Гальнбек Т.В., Ломакина Н.Ф., Потапова И.В.** Вирусная контаминация культур клеток. Труды ВИЭВ. 2013, 77: 228—233.
9. **Гальнбек Т.В., Киселева Д.Р., Кулешов К.В., Сайфутдинова З.Н., Потапова И.В.** Поиск соединений, обладающих антимикоплазменной активностью. Веткорм. 2013, 4: 23—24.

10. **Кулешов К.В., Гальнбек Т.В.** Разработка методики идентификации и видовой дифференциации микроорганизмов рода *Mycoplasma* в клеточных линиях с использованием полимеразной цепной реакции. Веткорм. 2013, 4: 47—48.

11. **Кулешов К.В.** Методические рекомендации по определению видовой принадлежности клеточных культур методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ). Москва. 2008, 19 с.

12. **Кулешов К.В., Завьялова Е.А., Гальнбек Т.В.** Видовая идентификация клеточных линий. Веткорм, 2013, 4: 49—50.

13. **Акиншина Г.Т.** Моделирование развития облигатных внутриклеточных паразитов в клеточных культурах и цитозекологические аспекты их взаимодействия в системе «паразит-клетка (хозяин)». В кн. «Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии)». Москва, 2009: 557—595.

14. **Акиншина Г.Т., Алимов А.Г., Шилов А.М.** Возбудитель токсоплазмоза: лекарственная резистентность и вирулентность возбудителя при моделировании инфекции в клеточных системах и на мышах. Ветеринарная патология, 2009, 1 (28): 5—10.

15. **Акиншина Г.Т., Гулюкин М.И., Гальнбек Т.В., Алимов А.Г.** Методические положения по культивированию и длительному хранению в культурах клеток возбудителя токсоплазмоза (*Toxoplasma gondii*, *Sporozoa*) в научных и производственных паразитологических лабораториях. Москва, 2012, 11 с.

16. **Акиншина Г.Т., Гулюкин М.И., Алимов А.Г., Гальнбек Т.В.** Методические положения по стандартизации параметров воспроизведения экспериментальных моделей острого и хронического токсоплазмоза *in vivo* и *in vitro*, используемых для получения антигенов. Москва, 2013, 13 с.

## О КОЛЛЕКЦИИ ПОСТОЯННЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

**З.Н. Сайфутдинова, В.А. Васильев**

ГНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко (ВИЭВ), Москва,

[zsaifutdin@yandex.ru](mailto:zsaifutdin@yandex.ru)

Изложена история, основные направления и итоги работы за последние пять лет Всероссийской специализированной коллекции постоянных линий клеток беспозвоночных.

**Ключевые слова:** специализированная коллекция, постоянные линии клеток, первичная культура клеток, криобанк, беспозвоночные.

Получение первой перевиваемой линии из эмбриональных клеток плодовой мухи *Drosophila melanogaster Oregon RC* в 1967 году в Радиобиологическом отделе Института атомной энергии им. И.В.Курчатова послужило началом организации коллекции постоянных линий клеток беспозвоночных в нашей стране. Организатором, а в дальнейшем единственным

и бессменным руководителем этой коллекции был Какпаков В.Т. (1937—2012 гг.). В 1978 году Всероссийская специализированная коллекция постоянных линий клеток беспозвоночных (ВСКПЛК БП, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН) вошла в состав Всероссийской (а затем Российской) коллекции клеточных культур (РККК), основоположником и координатором деятельности которой был профессор, д.б.н., заслуженный деятель науки РФ Г.П. Пинаев. В 2008 году ВСКПЛК БП передана в ГНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ) в связи с переходом на работу руководителя коллекции д.б.н. В.Т. Какпакова.

Коллекция содержит 20 постоянных линий клеток от шести видов беспозвоночных, из них, восемь — депонированных, четыре — объекты промышленного значения (1). Информация о фондах Коллекции представлена в Международном Каталоге клеточных линий Human and animal cell lines catalogue, 1993 (Interlab project), а данные о Коллекции включены в Международную базу данных Всемирной Федерации Коллекций Культур.

Основные методы хранения коллекции — сохранение в жидком азоте и пересевы живых культур клеток. Степень защищенности коллекции — дублирование в криоколлекциях и параллельное культивирование в лабораториях других организаций РАСХН и РАМН.

Профиль коллекции — поддержание, получение новых и сохранение постоянных линий клеток беспозвоночных; использование их в качестве объекта клеточной биологии и генетики соматических клеток; создание тест-систем для экологического цитомониторинга; разработка криобиологических технологий для сохранения гамет, соматических клеток и целых эмбрионов, необходимых для сохранения уникальных генетически чистых линий и биоразнообразия редких и исчезающих видов; изучение вирусов и других инфекционных агентов беспозвоночных в культурах клеток, удовлетворение заявок из других научных центров на получение постоянные линии клеток.

За прошедшие пять лет со времени перевода коллекции в ВИЭВ были продолжены и проведены работы по поддержанию, развитию и сохранению криоколлекции культур клеток в объеме, представленном в Каталоге (2). В криобанк заложены новые постоянные линии эмбриональных клеток тараканов *Blattella germanica* — BgE1 и Bg E2 (из Франции); постоянная сублиния эмбриональных клеток дрозофилы — S3 безвирусная (исходная линия из США). Размножена и заложена культура клеток шинельной моли Sf9k на разных питательных средах (среда Какпакова — C-46 и среда LPL).

Начаты опыты по первичному культивированию генеративных тканей неплодных маток медоносной пчелы: подобраны условия стерильной эксплантации, оптимальные питательные среды и определен возраст маток-доноров, пригодных для получения клеточного материала, отвечающего условиям получения постоянных линий клеток медоносной пчелы. Получена 90-дневная первичная культура из яичника неплодных маток раннего возраста (несколько часов после выхода из куколки).

Продолжены исследования по оптимизации хранения при низких температурах постоянных линий клеток дрозофилы и спермы трутней медоносной пчелы. Показано, что после хранения в криобанке (45 лет — линия клеток дрозофилы 67j25 Dm и более 20 лет — сперма трутней медоносной пчелы *Apis mellifera*) клетки стабильно сохраняют основные генетические параметры. В криобанк включены новые образцы спермы трутней медоносной пчелы приокской породы.

Постоянные линии клеток шинельной моли *Spodoptera frugiperda* (Sf9) и тутового шелкопряда *Bombix mori* (BmN), адаптированные к отечественной среде С46 (среда Какпакова), являются базой для развития инновационной клеточной биотехнологии и получения генноинженерных биопродуктов для медицины и сельского хозяйства. С целью выращивания вирусов-инсектицидов и вирусов медоносной пчелы была создана новая сублиния культур клеток шинельной моли, способная длительно культивироваться в среде Какпакова С46 без сыворотки — сублиния Sf9kSF.

Испытаны шесть клеточных штаммов позвоночных и беспозвоночных — гибридная линия клеток A4L (свинья × лошадь), Vero (почка африканской зеленой мартышки), ЛПК (легкое плода коровы), СПЭВ (почка свиньи), клетки дрозофилы и шинельной моли — на чувствительность к вирусу мешотчатого расплода пчел (ВМР) и к вирусу деформации крыла (ВДК). Вирус ВМР обнаружен с помощью метода ПЦР только в двух первых пассажах на культуре A4L и Vero, а в вирус ВДК — в культурах ЛПК и Sf9k.

Постоянные линии клеток и первичные культуры являются тест-системой для разработки и использования принципов нанобиотехнологии при создании профилактических и лекарственных препаратов для оздоровления и регуляции численности насекомых. В результате использования клеточных тест-систем Sf9k и 67j25Dm подобраны компоненты корма для пчел, необходимые для выращивания эмбрионов медоносной пчелы в химически определенной питательной среде, что необходимо для решения фундаментальной проблемы современного пчеловодства — коллапса пчелиных семей (КПС) (3).

Изучено действие биологически активных продуктов пчеловодства (БАПП — мёд, пыльца, перга, маточное молочко) на культуры клеток позвоночных и беспозвоночных. Выявлено, что мед в концентрации 0,0001% обладает наибольшим ростстимулирующим действием на клетки насекомых по сравнению с концентрацией 0,1%. Небольшое содержание радионуклида (кобальт 40) в меде достоверно снижает его ростстимулирующее действие на клетки культуры позвоночных и беспозвоночных животных (4). Проведена оценка действия различных концентраций пыльцы, перги и маточного молочка на культуры клеток СПЭВ (эмбриональная почка свиньи), 67j25DK (дрозофила) и Sf9k (шинельная моль). Обнаружено, что малые дозы маточного молочка также обладают наивысшим эффектом воздействия на пролиферацию клеток позвоночных, но особенно сильное воздействие показано на культуре клеток беспозвоночных (5).

Проведенные эксперименты по разработке клеточных тест-систем на модели постоянной линии клеток дрозодилы и шинельной моли, адаптированных к питательной среде Какпакова С46, были важны для оптимизации питательных сред с целью получения первичных культур клеток, для выявления качества и безопасности продуктов пчеловодства (6) для использования БАПП в экологическом мониторинге (апимониторинг) (7). Планируется дальнейшее использование и развитие Коллекции культур клеток беспозвоночных для решения прикладных и фундаментальных задач.

### Список литературы

1. Каталог. Всесоюзная коллекция клеточных культур. Ответственный редактор **Г.И. Пинаев**. Л.: Наука, 1991, 120 с.
2. **Гулюкин М.И., Дьяконов Л.П., Какпаков В.Т., Гальнбек Т.В., Акиншина Г.Т., Киселева Д.Р., Завьялова Е.А.** Каталог клеточных культур позвоночных и беспозвоночных животных (3-е издание), Москва, ЗАО «Корпорация Знак» 2011, 155 с.
3. **Какпаков В.Т., Сайфутдинова З.Н., Васильев В.А., Ярошевич Г.С.** Модернизированный корм для медоносной пчелы *Apis mellifera*. Ветеринария и кормление. 2012, 4: 38—39.
4. **Sayfutdinova Z.N., Galnbek T.V.** Cell Biotechnological Approach to Beekeeping, XXXXIII International Apicultural Congress, 29 September — 04 October 2013, Kyiv, Ukraine, p. 337.
5. **Сайфутдинова З.Н., Гальнбек Т.В., Васильев В.А.** Влияние продуктов пчеловодства (пыльцы, перги и маточного молочка) на рост культуры клеток позвоночных и беспозвоночных животных. Ветеринария и кормление. 2013, 4: 54—55.
6. **Васильев В.А., Какпаков В.Т., Сайфутдинова З.Н.,** Влияние продуктов пчеловодства на рост культуры клеток. Пчеловодство. 2011, 7: 48—49.

7. Монахова М.А., Сайфутдинова З.Н., Васильев В.А., Гальнбек Т.В. Пчела медоносная (*Apis mellifera*) в экологическом мониторинге. Доклады по экологическому почвоведению. 2013, 18, 1: 327—337.

## ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КОЛЛЕКЦИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК ПОЗВОНОЧНЫХ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

*Н.П. Глинских, А.А. Бахарев, И.В. Устьянцев*

ФБУН "Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций" Роспотребнадзора,

Екатеринбург, [virus@etel.ru](mailto:virus@etel.ru)

Криобанки клеточных культур являются необходимым элементом медицинских и биотехнологических исследований. Объединение локальных банков в Российскую коллекцию клеточных культур определило возможность их взаимодействия и дальнейшего развития на основе общих баз данных и паспортизации клеточных линий и штаммов. Это позволило получать культуры с определенными характеристиками, пригодные для получения качественных иммунобиологических препаратов и сопоставимых результатов при проведении вирусологических и биологических исследований с использованием клеточных культур. Благодаря этому в Екатеринбургском НИИ вирусных инфекций разработаны методы тестирования на токсичность различных веществ, а также разработан и всесторонне охарактеризован лечебный препарат на основе диплоидных клеток человека, успешно применяющийся для лечения ожогов, пародонтозов и некоторых других заболеваний, связанных с нарушениями обменных процессов в организме.

**Ключевые слова:** коллекция клеточных культур, криобанк, вирусология, токсикология, диагностика, клеточная терапия.

Межведомственный научно-технический совет по проблемам молекулярной биологии при Президиуме Академии наук СССР 29 мая 1978 года принял решение о необходимости создания Всесоюзной коллекции клеточных культур (ВСКК) путем организационного объединения уже имевшихся в отдельных институтах коллекций клеток человека, животных и растений. Руководство и координацию работы ВСКК осуществляла комиссия Межведомственного научно-технического совета под руководством директора Института цитологии АН СССР, член-корр. АН СССР Афанасия Семеновича Трошина и его заместителей Раисы Георгиевны Бутенко и Георгия Петровича Пинаева. Институт цитологии

АН СССР был определен научно-методическим и информационным центром Всесоюзной коллекции клеточных культур. Коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных медицинского назначения (ЕСКК) Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций (ЕНИИВИ) одна из первых вступила в ВСКК. Ее бессменным руководителем является директор института проф., Заслуженный деятель науки РФ Н.П.Глинских. Координатором работы ВСКК, а затем Российской коллекции клеточных культур (РККК), до последних дней жизни являлся профессор, д.б.н., Заслуженный деятель науки РФ Г.П. Пинаев.

Основные научные исследования в ЕСКК были направлены на создание базовой коллекции клеток, отработку условий поддержания и стабилизации свойств клеточных культур и повышение их чувствительности к вирусам. Были отработаны методы культивирования и принципы паспортизации клеточных культур, а также условия их транспортировки на дальние расстояния. Еще в 1970 году в институте было положено начало созданию низкотемпературного банка — музея клеточных культур, позволявшего обеспечить их сохранность в исходном состоянии в течение многих лет. Первоначальная коллекция состояла всего из 6 культур. В настоящее время она включает более 70 клеточных линий, из которых более половины получены в Лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ, паспортизированы согласно международным требованиям и внесены в каталог РККК (1). Коллекция продолжает обеспечивать проведение исследований по получению и паспортизации клеточных культур, стандартизации условий их культивирования, разработке новых питательных сред, изучению процессов взаимодействия в системе вирус — клетка. Большое внимание уделяется диплоидным клеточным линиям.

Коллекционные клеточные линии были использованы для определения токсичности различных материалов (2) и объектов внешней среды. Были выполнены довольно широкие экологические исследования качества питьевых вод Урала, эффективности методов их очистки, оценки уровней воздействия на клетки неконтролируемых органических и металлоорганических загрязнителей (3). Были проведены, также, исследования взаимодействия загрязнителей объектов внешней среды с некоторыми вирусами, и на модели клеточных культур показано значительное ускорение развития вирусной инфекции в условиях экологического неблагополучия (4).

Новый этап работы Лаборатории клеточных культур начался с 1998 года, когда по просьбе врачей-практиков и при поддержке Облздора Свердловской области и Управления здравоохранения г. Екатеринбурга была разработана и осуществлена Программа по

внедрению биомедицинских технологий в практическое здравоохранение. Применение созданного в ЕНИИВИ препарата диплоидных клеток человека для терапевтических целей в настоящее время вызывает немалый интерес. Препарат применяется в ожоговых центрах ДГКБ №9 и ГКБ №40, ряде стоматологических клиник, в Отделении гнойной хирургии ГКБ № 23 и других медицинских учреждениях Екатеринбурга, Челябинска, Тюмени и Саха-Якутии.

Для развития биотехнологических исследований в нашей лаборатории используется авторская линия диплоидных клеток эмбриона человека ЛЭЧ-4 (81). Эта клеточная линия была получена в 1981 году Н.П. Глинских, Г.Г. Колесниковой и др. из легочной ткани 12-ти недельного эмбриона. Эмбрион был взят у здоровой женщины, не имеющей в генеалогии злокачественных или наследственных заболеваний (произошел травматический выкидыш). В работе используется культура 5—25 пассажа (5, 6, 7).

Доклинические исследования эффективности и безопасности созданного нами препарата "Культуры клеток диплоидных человека для заместительной терапии" были проведены в Лаборатории клеточных культур нашего института, на Кафедре терапевтической стоматологии Уральской государственной медицинской академии, в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Филиале ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России - ЦВТП БЗ» и на базе Питомника служебных собак учреждения ИЗ-66/1. Все исследования выполнены в соответствии с требованиями соответствующих нормативных документов Минздравсоцразвития РФ. Испытания были проведены на мышах, хомячках, крысах, морских свинках, кроликах и собаках. Прежде всего, препарат был испытан на туморогенную активность в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН на линии мышей BALB/C (nude). При введении 1 млн. клеток ЛЭЧ-4(81) не было выявлено каких-либо клинических или морфологических признаков опухолевого роста, как в месте введения препарата, так и в критических органах: региональных лимфатических узлах и легких. При введении аналогичным мышам клеток контрольной линии А-549 у большинства мышей наблюдали стандартный рост раковых опухолей, подтвержденный с помощью гистологических методов.

Терапевтическую эффективность препарата культивируемых клеток человека определяли с помощью трех методов:

- 1) по оценке формирования монослоя клеток на стекле по Фармакопейной статье предприятия;

2) по реакции регенерации повреждённых кожных покровов белой крысы на экспериментальной модели ожога;

3) по реакции регенерации тканей пародонтального комплекса на экспериментальной модели пародонтита у белых крыс Вистар (8).

Все испытанные дозировки препарата показали отчетливо выраженный терапевтический эффект даже в экспериментах на животных: начальные этапы эпителизации наступали уже на следующие сутки в опыте и на 3—4 сутки в контроле. Полная эпителизация ран при использовании клеток наступала на 3—4 сутки в опыте и на 6—7 сутки в контроле (9).

Учитывая важное научное и практическое значение применения клеточной культуры в комплексном лечении пародонтита, были проведены экспериментальные исследования на животных с целью изучения процессов регенерации при использовании различных остеопластических препаратов (ГапКол, КоллаПан), способствующих направленному остеогенезу и стимуляции восстановительных процессов в тканях пародонта. В опытах на животных с экспериментальным пародонтитом было убедительно доказано, что композиции на основе клеточной культуры и остеопластического препарата стимулируют процессы регенерации тканей пародонта (10, 11, 12).

Механизмы действия клеточной культуры на регенерацию тканей обусловлены рядом факторов. Во-первых, аллофибробласты, внесенные в раневой дефект, являются источником проколлагена, что способствует формированию экстрацеллюлярного матрикса. Во-вторых, культивированные фибробласты, внесенные в рану, выделяя основной фактор роста фибробластов, способствуют активации ангиогенеза, что не происходит при использовании синтетических материалов (8).

В острых и хронических экспериментах на мышах, белых крысах, морских свинках и кроликах проведено изучение общетоксических и органотропных свойств препарата "Культуры клеток диплоидных человека для заместительной терапии". При введении препарата беспородным белым мышам было показано, что его терапевтические дозы способствуют комплексному повышению активности интерлейкинов и ростовых факторов, обеспечивающих ход конструктивного воспалительного процесса в организме, отрицательные же реакции наступают лишь при значительном превышении терапевтических доз. Препарат не оказывает сенсibiliзирующего действия на организм (8). Изучение свойств препарата в опытах на морских свинках и кроликах, проведенное в условиях введения препарата внутримышечно и в виде накожных аппликаций, подтвердило, что он не вызывает развития

реакции гиперчувствительности немедленного или замедленного типа, очевидно, из-за отсутствия антигенов гистосовместимости.

Проведенные доклинические испытания показали выраженное позитивное действие препарата в большинстве экспериментов на животных. Однако маловероятно, что клетки человека смогли бы прижиться и размножиться в организме животного. На этом основании можно сделать вывод, что основным действующим началом в препарате являются ростовые факторы и цитокины, тем более что имеется ряд публикаций, указывающих на повышенное выделение культивированными клетками ростовых факторов, что впоследствии было подтверждено нашими исследованиями. Содержание некоторых ростовых факторов и цитокинов в ростовой среде может до 500 раз превышать среднюю норму в крови человека (13).

Основным недостатком препарата на основе живых клеток является очень малый срок годности — всего 7 суток с момента его изготовления. В настоящее время проходят испытания новые формы препарата с большим сроком годности — до 1 года, не содержащие ДНК, способной к репликации (14, 15). Исследования на животных подтвердили их безопасность и высокую эффективность. Более того, такой препарат при первичных испытаниях на животных проявил противовирусную (противогерпетическую) активность, что требует дополнительного изучения (16, 17). По итогам работ, как по исследованию цитотоксичности препарата, так и, особенно, по разработке лечебного препарата получен ряд патентов.

Среди научно-исследовательских задач лаборатории на последующие годы определены разработки новых диагностических и профилактических препаратов на основе клеточных технологий и получение новых клеточных культур для целей вирусологии и биотехнологии.

### Список литературы

1. **Каталог** Российской коллекции клеточных культур. Санкт-Петербург, Омск, 1999.
2. **Патент** RUS 2148644 «Способ контроля цитотоксичности биогелей с использованием штамма перевиваемых лейкоцитов человека Л-41 КД/84». 10.05.2000.
3. **Бахарев А.А., Бахарева Т.Л., Рябухин И.В. и др.** Изучение токсического действия некоторых соединений тяжёлых металлов на клеточных культурах. Проблемы современной эпидемиологии. Перспективные средства и методы лабораторной диагностики и профилактики актуальных инфекций. Труды Всероссийской научной конференции Военномедицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 2009: 334—335.
4. **Глинских Н.П., Бахарев А.А., Забокрицкий А.Н., Ладыгин О.В.** Цитопротективное действие комплекса биологически активных веществ, продуцируемых пробиотическими

бациллами рода *Bacillus*, на культуру клеток Л-41. Вестник Российской Военно-медицинской академии, 2008, 2, 1: 142—143.

5. Патент 2392318 «Способ получения стабильных клеточных культур». 17.11.2008.

6. Патент 2398873 «Способ получения препаратов для медицинских целей». 13.03.2009.

7. Патент 2213775 «Клеточная культура для заместительной терапии». 10.10.2003.

8. Новикова И.А., Бахарев А.А., Забокрицкий А.Н., Ладыгин О.В. Возможные механизмы влияния диплоидных клеток на репаративные процессы. Вестник Российской Военно-медицинской академии, 2008, 2,1: 142.

9. Патент 2230500 «Способ лечения ожоговых ран на основе применения культивированных клеток». 18.06.2002.

10. Патент 2210352 «Композиция для лечения воспалительных заболеваний пародонта на основе клеточных культур». 20.08.03.

11. Патент 2204332 «Способ лечения воспалительных заболеваний пародонта». 07.11.2001.

12. Патент 2210341 «Способ получения трансплантатов для заполнения костных дефектов при хирургическом лечении воспалительных заболеваний пародонта». 07.12.2001.

13. Глинских Н.П., Мезенцева М.В., Устьянцев П.В., Осипова В.А. Препараты культуры клеток для заместительной терапии как продуценты цитокинов. Нанотехнологии. 2012, 5: 90—93.

14. Бахарев А.А., Устьянцев П.В., Глинских Н.П. Создание иммунобиологического препарата на основе активных веществ диплоидных клеток. Международная конференция: "Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций" (специальный выпуск). С-Петербург, 2013.

15. Бахарев А.А., Шмелева Н.А., Бахарева Т.Л., Устьянцев П.В. и др. Возможность использования лиофилизированного препарата на основе биологически активных веществ диплоидных клеток. Труды научно-практической конференции: "Диагностика и профилактика инфекционных болезней". ГНЦ вирусологии и биотехнологии "Вектор", Новосибирск, 2013: 171.

16. Глинских Н.П., Донник И.М., Порываева А.П., Шилова Е.Н., Устьянцев И.В. Использование лиофилизированного препарата аллофибробластов для лечения заболеваний, вызванных вирусом герпеса. Ветеринарный вестник Урала. 2012, 7: 25—27.

17. Порываева А.П., Мальчиков И.А., Шмелева Н.А., Бахарев А.А. Исследования действия препарата Мирамистин на инфекции, вызванные вирусом простого герпеса *in vitro*. Вестник Уральской медицинской академической наук. 2012, 3: 37—39.

#### ПРИМЕНЕНИЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК ДЛЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Р.Я. Подчерняева, М.В. Мезенцева, И.А. Суетина, О.А. Лопатина, Г.Р. Михайлова,**

**А.Д. Петрачев, Л.А. Потапова, О.В. Бакланова, Е.Л. Фирсова, О.М. Гринкевич,**

**Т.Н. Притчина, М.Н. Щетвин, Л.И. Руссу**

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, Москва, [cells@rambler.ru](mailto:cells@rambler.ru)

В Лаборатории культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского создана Коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных, которая входит в состав Российской коллекции клеточных культур. Для каждой клеточной линии разработан паспорт, согласно международным требованиям. Проводится постоянная работа по улучшению условий хранения и культивирования клеток в зависимости от различных сред, сывороток или их заменителей, а также постоянный мониторинг микоплазм, вируса бычьей диареи и других возбудителей инфекций. Проведен поиск клеточных линий, чувствительных к различным ДНК- и РНК-содержащим вирусам, включая вирусы гриппа. На моделях клеточных культур изучалась эффективность различных противовирусных препаратов — амантадина, ремантадина, арбидола, тамифлю, ингаверина, циклоферона, ридостина, неовира, амиксина и 15 нейротропных пептидов, обладающих иммуномодулирующей и противовирусной активностью в отношении вирусов герпеса, гриппа человека и птиц. На моделях культур клеток проводилось изучение закономерностей синтеза регуляторных цитокинов в зависимости от условий культивирования клеток. Совместно с контрольным Институтом им. Л.А. Тарасевича (Москва) была получена вакцинная линия клеток Vero(B), охарактеризованная по требованиям ВОЗ. Линия применяется не только для научных исследований, но и для получения первой в стране противогерпетической отечественной вакцины «Витогерпавак».

**Ключевые слова:** клеточные культуры, сыворотки, бессывороточная среда, вирусы, цитокины, вакцина.

В настоящее время клеточные культуры находят широкое применение в различных областях биологии, медицины, ветеринарии и биотехнологии. Использование клеточных культур позволяет исследовать биологические процессы, которые сложно, а подчас невозможно, изучить на уровне организма. Важную роль клеточные культуры играют в биотехнологии при производстве многих вакцин, тест-систем и биологически активных веществ. Культуры клеток применяют для диагностики заболеваний различной этиологии, в качестве тест-объектов при испытании новых фармакологических, лечебных и косметических средств, а также пищевых добавок. Все это требует стандартизации работы с клеточными культурами в специально оборудованных лабораториях. Для успешного сохранения исходных или направленно измененных свойств клеточных линий, а также для получения воспроизводимых экспериментальных результатов необходимо зафиксировать данное состояние культивируемых клеток. Функцию поддержания исходных свойств клеток и

проведения контроля за их состоянием осуществляют Коллекции клеточных культур, сохраняющие эталонные клеточные линии, которые содержатся в криоконсервированном состоянии.

Еще в 1989 г. в нашей стране были разработаны методические указания: «Аттестация перевиваемых клеточных линий-субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов» (РД42-28-10-89), выполнению которых и по сей день придерживаются в работе с культурами клеток. В нашей Лаборатории культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского подготовлены методические рекомендации: «Работа с клеточными культурами (культивирование первичных и перевиваемых клеток)» (1) и «Технологический процесс криоконсервации перевиваемых клеточных линий» (2), которые были утверждены на Ученом совете института и на Лабораторном Совете Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. На базе нашей лаборатории имеется Коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных. Фонды коллекции представлены в «Каталоге Всесоюзной коллекции клеточных культур» (3), в «Human and Animal cell lines Catalogue» (4) и в «Каталоге Российской коллекции клеточных культур (РККК)» (5). Для каждой клеточной линии разработан паспорт, согласно международным требованиям, где, в частности, подробно описаны условия культивирования. Одним из ингредиентов, наиболее нестабильных при культивировании клеток, является сыворотка. Ее свойства существенно зависят от источника получения. Учитывая нестандартность сывороток, по рекомендации ВОЗ мы использовали малосывороточные питательные среды из гидролизатов соевой и рисовой муки, разработанные в НПО «Вектор» под руководством Л.П. Сандахчиева. Оптимизированный состав этих сред представляет собой определенные концентрации ферментативных гидролизатов, растворенных в сбалансированных растворах Эрла или Хенкса, в которые дополнительно добавлены витамины, микроэлементы и отдельные аминокислоты. Показано, что для пролиферации клеток МДСК (клетки почки собаки) при культивировании с соевой средой достаточно добавление только 2% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), а для пролиферации клеток Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки) требуется добавление 5% FBS. Таким образом, использование соевой среды позволяет снизить количество сыворотки, необходимой для успешного культивирования этих клеток с 10% до 2—5%. Надо отметить, что морфология и кариология клеток МДСК и Vero не менялась при использовании соевой среды (6—8).

Для проведения биотехнологических исследований на современном уровне желательно для культивирования клеток применять полностью бессывороточные среды. Список таких сред, как правило, широко представлен во многих каталогах, но, к сожалению, их цена слишком высока. Поэтому мы провели работу с применением отечественной бессывороточной среды «Гибрис-2» производства ООО «ПанЭко». Адаптация клеток к этой среде проводилась поэтапно. Так, для получения адаптированной линии клеток МДСК к среде «Гибрис-2» было проведено 4 пассажа с 3% FBS, 3 пассажа с 2% FBS, 5 пассажей с 1% FBS и 6 пассажей без сыворотки. Показано, что индекс пролиферации (ИП), идентичный контрольным значениям, был отмечен только в присутствии 1—2% FBS, а культивирование без сыворотки не приводило к контрольным показателям. Возможно, требуется большее количество пассажей для полной адаптации клеток к бессывороточной среде (9,10).

С целью оптимизации работы с нативными сыворотками было исследовано влияние сывороток северных оленей, суягных овец, свиней и морских котиков на пролиферативную активность 2-х клеточных линий — ЛЭЧ (клетки легких эмбриона человека) и Vero. Контролем служили эксперименты с использованием сыворотки FBS. Было показано, что сыворотки из крови северных оленей можно успешно использовать для культивирования клеток Vero, которые наиболее часто применяются для биотехнологических целей.

Однако вопрос стандартизации условий культивирования клеток в зависимости от наличия доброкачественных сывороток или их заменителей не утрачивает своего значения. Поэтому, были проведены исследования по получению и применению так называемых ростстимулирующих белков (РБ), выделенных из сывороток северных оленей, суягных овец и свиней с помощью водного раствора полиэтиленгликоля с М.м. 4000—8000 Д, который способствует также удалению ряда контаминирующих агентов. РБ представлены главным образом альбуминовой и  $\alpha$ -глобулиновой фракциями, которые являются белковыми факторами роста, влияющими на пролиферацию клеток. Изучена пролиферативная активность 7 клеточных линий после 5-ти последовательных пассажей в среде с РБ из сывороток свиней, суягных овец и оленей без добавления сыворотки FBS и с 2% FBS. Показано, что для получения показателей индекса пролиферации (ИП), равнозначных с контролем, все же необходимо добавление 2% сыворотки FBS. Показатели ИП разных клеточных линий различались незначительно. Лучшие показатели ИП наблюдались в экспериментах с РБ из сывороток оленей и свиней (11,12).

При работе с культурами клеток не менее важным является применение ферментов для диспергирования или отделения клеток от субстрата при их пересевах. Для этих целей, как известно, можно применять трипсин или химопсин. Недостатком этих ферментов является то, что сырье для их получения не стандартизовано и не исключает наличия в них патогенных примесей. Поэтому, совместно с сотрудниками НПО «Вектор», мы провели изучение полученного ими препарата «Коллаза», который представляет собой комплекс протеолитических ферментов с коллагенолитической активностью, выделенных из экологически чистого гепатопанкреаса Камчатского краба с помощью хроматографической очистки и ультрафильтрации. При применении этого фермента по сравнению с трипсином количество жизнеспособных клеток было в 2—2,5 раза больше и требовалось более короткое время воздействия. При этом морфология культивируемых клеток 10 изученных линий оставалась без изменения. Таким образом, использование «Коллазы» при культивировании оказалось более эффективным, чем использование трипсина.

Существенной проблемой при работе с клеточными культурами является микробная контаминация клеток, т.к. она влияет на метаболизм клеток, вызывает хромосомные aberrации и изменяет клеточные функции. Частым контаминантом клеточных культур оказывается вирус бычьей диареи (ВД), относящийся к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* и являющийся возбудителем вирусной диареи — болезни слизистых крупного рогатого скота. Этот вирус может проникать в клетки из нативных сывороток крупного рогатого скота и даже FBS, добавленных в ростовую среду (13). Так, с помощью метода ПЦР было выявлено наличие ВД в коммерческих FBS, полученных из различных фирм (ПАНЭКО, ООО Биолот, Gibco, Biowest, HyClone, Amimed, Sigma). В сыворотках FBS фирмы ПАНЭКО ВД обнаруживается как до, так и после прогревания в водяной бане при 56°C в течение 30 и даже 60 минут (14).

Мы проводили определение ВД с помощью метода ПЦР в клеточных линиях из нашей коллекции. Исследовались диплоидные клетки легкого и фибробласты эмбриона человека, клетки онкогенных и лимфобластоидных линий человека, перевиваемые клетки обезьян, крупного рогатого скота, собаки, свиньи, крыс, мышей, хомячка, кролика, кошки, овцы, хорька и кур. Клетки хранились в жидком азоте в течение различного периода. Было показано, что диплоидные клетки человека и ряд перевиваемых клеток барана, свиньи, хомячка, обезьян и человека не были контаминированы ВД. Однако в 30% клеточных линий из 83-х изученных

был выявлен ВД, причем чаще всего в более поздних закладках. Очевидно, при культивировании этих клеток использовались сыворотки, содержащие этот вирус (15).

Одним из пунктов паспорта клеточной линии является чувствительность к репродукции вирусов. Изучение чувствительности разных клеточных линий к определенным вирусам крайне важно для приготовления противовирусных вакцин. Вирусам свойственен определенный круг хозяев, узкий для одних видов и очень широкий для других. Генетический аппарат вирусов представлен как ДНК, так и РНК в одно- или двунитевой, линейной или циркулярной, моно- или фрагментарной формах. К РНК-содержащим вирусам позвоночных относятся 20 видов вирусов (арена, артери, астро, бирна, борна, бунья, геле, дельта, калици, корона, нода, ортомиксо, парамикса, рабдо, рео, ретро, тога, фило и флави вирусы), включая субвирусные агенты вероиды, сателлиты и прионы. К ДНК-содержащим вирусам позвоночных относятся 11 видов вирусов (адено, анелмо, асфар, гепадна, герпес, иридо, папиллома, парво, покс, полиома и цирко вирусы). Название этих видов вирусов связано либо с их морфологией, либо с местом их изоляции. Интерес к проблеме поиска клеточных линий, чувствительных к различным ДНК- и РНК-содержащим вирусам, позволил нам суммировать различные данные и представить их в виде таблиц 1—4 (16,17).

Таблица 1.

**Клеточные линии, чувствительные к репродукции ДНК-содержащих вирусов.**

<b>N n/n</b>	<b>Тип вирусов</b>	<b>Чувствительные культуры клеток</b>
1	Гепатит В	HepG2, первичные гепатоциты
2	Вирусы простого герпеса (1-2 типов):	Vero, CV-1, Hep-2, RK-13, ВНК-21, ЛЭЧ
	Герпес 6 типа	MT4, СЕМ, Н9
	Герпес 8 типа HHV-8	BCBL-1. BC-3
3	Цитомегаловирус	Vero, ЛЭЧ, ФЭЧ
4	Аденовирусы (1-31 типов)	HeLa, Hep-2, Vero, МДСК, PS,A549, Chang liver, PK-15

Таблица 2.

**Клеточные линии, чувствительные к репродукции энтеровирусов.**

<b>N n/n</b>	<b>Тип вирусов</b>	<b>Чувствительные культуры клеток</b>
1	Полиовирусы (3 типа)	HeLa, Hep-2, CV1, Chang liver, Vero, ЛЭЧ, RD, BGM
2	Коксаки А(26 типа)	HeLa, Hep-2, RD, RK-13, BGM,
3	Коксаки В(11 типов)	HeLa, Hep-2, BGM, МДСК
<b>N n/n</b>	<b>Тип вирусов</b>	<b>Чувствительные культуры клеток</b>
4	ЕСНО(28 типов)	HeLa, Hep-2, BGM, RD, RK-13, Vero
5	Ротавирусы (24 типа)	МА-104, MDBK
6	Гепатит А	Vero, CV-1, BSC-1, LLC-MK2, Frhk-4/R, 4647
7	Гепатит С	Huh-7.5.2, первичные гепатоциты

Таблица 3.

**Клеточные линии, чувствительные к репродукции орто-, пара- и ретровирусов.**

<b>N n/n</b>	<b>Тип вирусов</b>	<b>Чувствительные культуры клеток</b>
1	<b>Ортомиксовирусы:</b>	
	а) Вирус гриппа человека типа А (H1N1, H2N2, H3N2)	МДСК, Chang Conjunctiva, 4647, Vero, Mpf, СПЭВ
	б) Вирус гриппа человека типа В	МДСК, СПЭВ
	в) Вирус гриппа птиц (H5N3)	МДСК, Chang Conjunctiva, СПЭВ, Vero, Mpf, ФЭК, CPvFK
2	<b>Парамиксовирусы:</b>	
	а) Парагрипп (4 типа)	Vero, МА-104, Hep-2, ЛЭЧ, HeLa
	б) Метапневмовирус HMPV(3 типа)	Chang Conjunctiva(KnoH 1-5C-4), CREK
	в) Паротит	ФЭК, ФЭЧ, Vero
	г) Корь	Vero, ЛЭЧ, МДСК, ФЭЧ, ФЭК
	д) Краснуха	Vero, 4647

3	<b>Ретровирусы:</b> ВИЧ (2 типа)	MT4, CEM, Molt, H9,U937
---	-------------------------------------	-------------------------

Таблица 4.

**Клеточные линии, чувствительные к репродукции арбовирусов.**

N n/n	Тип вирусов	Чувствительные культуры клеток
1	<b>Семейство <i>Togaviridae</i>:</b>	
	а) Синдбис (карельская лихорадка)	Vero, ВНК-21 , СПЭВ
	б) Чикунгунья	Vero, ВНК-21 , СПЭВ
2	<b>Семейство <i>Bunyaviridae</i>:</b>	
	а) Крымская Конго Геморагическая лихорадка	Vero, ВНК-21, SW-13
	б) Калифорнийская (КСГ)	Vero, ВНК-21 , СПЭВ
	в) Батан	Vero, ВНК-21 , СПЭВ
	г) Укуниемеи	Vero, ВНК-21 , СПЭВ
	д) Москитная лихорадка (Сицилия, Неаполь)	Vero E6
	е) Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС)	Vero E6
3	<b>Семейство <i>Flaviviridae</i>:</b>	
	а) Клещевой энцефалит	Vero E6, СПЭВ, Нер-2
	б) Западный Нил	Vero, ВНК-21, СПЭВ
	в) Денге	Vero, ВНК-21, СПЭВ

Обычно различают острую и хроническую вирусную инфекцию. Острая инфекция характеризуется цитопатическим действием (ЦПД), которое возникает в результате репродукции вирусов и приводит к деструктивным изменениям зараженных клеток и их гибели. При хроническом течении инфекции вирусы не вызывают гибели клеток. Клетки долго остаются жизнеспособными и внешне не отличаются от зараженных.

Характер ЦПД при различных вирусных инфекциях неодинаков. Например, при репродукции парамиксовирусов и герпес-вирусов наблюдается слияние клеток с образованием синцития, при энтеро- и рео-вирусах — сморщивание и деструкция клеток,

аденовирусы приводят к агрегации клеток. Обычно вирусные включения выявляются в цитоплазме или ядре клеток при специальном окрашивании по Романовскому.

Подробнее остановимся на репродукции в клетках вирусов гриппа. Известно, что в мире постоянно отмечается сложная эпидемиологическая ситуация с распространением вирусов гриппа различных типов (18—20). Изучением чувствительности различных клеточных культур к разным штаммам вируса гриппа мы занимались, начиная с 1990 г., когда был изучен спектр чувствительности ряда клеточных линий человека и животных к разным эталонным штаммам вирусов гриппа А (H1N1, H2N2, H3N2), гриппа В и С, изолированным во время различных эпидемий. Так, было показано, что эталонный штамм вируса гриппа A/PR8/34 (H1N1) активно репродуцировался в клетках животных (МДСК, СПЭВ, ВНК-21, ПЭК и Vero) и в клетках человека Chang Conjunctiva (клон 1-5С-4) и ФЭЧ в отличие от эталонного штамма A/FM1/47(H1N1). Отечественный штамм вируса гриппа A/СССР 012/79(H1N1) репродуцировался в клетках МДСК до 4,5 lg ТЦД50 и до 3,5 lg ТЦД50 в клетках ЛЭЧ. Другой отечественный штамм A/СССР 03/81 (H1N1) слабее репродуцировался в клетках МДСК (2,0 lg ТЦД50), но размножался в клетках человека Chang Conjunctiva и ЛЭЧ до титра 3,5 lg ТЦД50. Эталонный вирус гриппа А/Сингапур1/57(H2N2) наиболее активно репродуцировался в клетках СПЭВ (3,5 lg ТЦД50) и МДСК (2,5 lg ТЦД50). Штамм A/СССР05/80 (H3N2) активно репродуцировался в клетках МДСК (4,5 lg ТЦД50) и ЛЭЧ (3,5 lg ТЦД50). Штамм А/Филиппины2/82(H3N2) в основном активно репродуцировался в клетках МДСК (3,5 lg ТЦД50). Эталонный вирус гриппа В (штамм В/Ли/40) репродуцировался в клетках животных МДСК, СПЭВ, ВНК-21, ПЭК до титров 2,5; 3,5; 2,5; 1,5 lg ТЦД50 соответственно и в клетках человека ЛЭЧ до титра 3,5 lg ТЦД50. Другой эталонный вирус гриппа штамм В/Сингапур 222/71 также репродуцировался в клетках животных (МДСК, СПЭВ, ВНК-21 и ПЭК) и в клетках человека ЛЭЧ и Chang Conjunctiva. Отечественный штамм В/СССР 100/83 размножался практически в этих же клетках. Эталонный вирус гриппа С (штамм Тейлор1233/47) репродуцировался в клетках МДСК, СПЭВ и Chang Conjunctiva до титра 2,5 lg ТЦД50. Таким образом, было показано, что для каждого штамма вирусов гриппа даже одного типа (H1, H2, H3) имеется наиболее перmissive клеточная линия для изучения репродукции вирусов.

Еще в 1991 г. нами было показано, что вирусы гриппа птиц могут размножаться в ряде клеточных культур. В частности, вирус гриппа птиц, изолированный в 1976 г. в нашей стране, с 5-м типом гемагглютинаина (штамм А/морской голубок/Астрахань/76(H5M1) репродуцировался не только в клетках МДСК до 4,5 lgТЦД50, но и в других линиях: клетках почки свиньи — СПЭВ

(3,5 lg ТЦД50), обезьяны — 4647 (3,5 lg ТЦД50) и сирийского хомячка — ВНК-21 (4,5 lg ТЦД50). Эти показатели практически не отличались от репродукции птичьего вируса H5N1 (штамм А/крачка/ЮА/61), активно размножающегося в клеточных линиях МДСК (4,5 lg ТЦД50), СПЭВ (4,5 lg ТЦД50), L929(4,0-4,5 lg ТЦД50) и ВНК-21 (4,0 lg ТЦД50).

Известно, что наиболее чувствительной и перспективной моделью для изучения вирусов гриппа являются клетки хорька. Поэтому нами для изучения птичьего вируса H5N1 применялась линия нервных клеток мозга хорька (Mrf). Рядом исследователей было отмечено, что с 1998 г. во время эпидемий гриппа, вызванного вирусом А(H3N2), среди больных нередко наблюдались проявления неврологического синдрома (21). В связи с этим, мы изучили репродукцию вирусов гриппа человека H1N1, H3N2 и В, выделенных не только в последние, но и более ранние эпидемические годы, на модели нервных клеток хорька (линия Mrf), а также глиальных клеток глиобластомы человека (линия GL6) в сравнении с двумя другими клеточными линиями: клеток почек собак (МДСК) и клеток легкого эмбриона человека (ЛЭЧ). Показано, что вирусы гриппа H1N1 репродуцируются в культуре клеток линии Mrf в такой же степени, как и в клетках МДСК, но не размножаются в глиальных клетках человека (GL6). Интересно, что не наблюдалось различий в степени репродукции вирусов гриппа H1N1, выделенных в эпидемии 1934, 1947, 1977 и 1999 гг., несмотря на различие их антигенных и биологических свойств. Вирусы гриппа H3N2, также как и вирусы H1N1, репродуцируются в клетках Mrf практически в той же степени, как и в клетках МДСК, и несколько слабее в линии клеток ЛЭЧ. Отличий в активности репродукции штаммов, выделенных в эпидемии гриппа H3N2 (1968, 1999 и 2002 гг.), также не отмечено, как и у вирусов гриппа H1N1. Вирусы гриппа В репродуцируются только в клетках МДСК и значительно слабее в клетках ЛЭЧ. Интересно, что вирусы гриппа В совсем не размножаются в клетках линий GL6 и Mrf в отличие от вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2). При этом различий в репродукции штаммов вирусов гриппа В, изолированных в эпидемии 1972, 1998 и 1999 гг., не наблюдалось, также, как и у штаммов вирусов гриппа А (22). Таким образом, впервые показано, что для вирусов гриппа А чувствительной клеточной моделью являются культивируемые нервные клетки мозга хорька, которые могут быть использованы как для изоляции этих вирусов, так и для проведения различного рода биологических исследований. Интересно, что для птичьего вируса H5N1, как и для вируса гриппа человека типа В, эта клеточная линия не является перmissive.

С 1997 г. отмечаются вспышки птичьего гриппа (H5N1, H5N3, H7N7, H9N2), которые не только приводили к гибели домашних птиц, но и вызывали случаи заболевания человека с

высоким уровнем летальности. После выделения нового вируса гриппа птиц с 5-м типом гемагглютинина, изолированного, в частности, от больной утки (штамм А/утка/Новосибирск 56/05 H5N1), была выявлена чувствительность к этому вирусу 16-ти культур клеток человека и животных. В сравнительном аспекте в этих же культурах изучили репродукцию штамма А/крачка/ЮА/61 (H5N3), изолированного в 1961 г. Показано, что Штамм А/утка/Новосибирск 56/05 имеет более широкий спектр хозяев, чем штамм А/крачка ЮА/61. Наиболее чувствительными клеточными линиями животных являются клетки почки собаки (МДСК), свиней (СПЭВ), обезьян (Vero), кошек (CRFK и СС-81) и первичные клетки куриных фибробластов (ФЭК). Из клеточных культур человека чувствительными являются клетки карциномы кишечника (HT 29), Chang Conjunctiva и ЛЭЧ. Штамм 2005-го г. изоляции слабо размножался в других клетках человека (Chang liver и 2-х линиях гепатомы печени — СН5, Lunet), но, в отличие от штамма А/крачка ЮА/61, репродуцировался в клетках мозга хорька (Mpf) до титра 3,0 Ig ТЦД50 (17,22). Из полученных данных можно заключить, что вирус 2005-го года изоляции обладает большей тропностью к ряду клеток животных и человека и потенциально может быть более вирулентным при эпизоотии и эпидемиях, вызванных птичьим вирусом с 5-м типом гемагглютинина.

Нами была изучена также чувствительность 19 перевиваемых клеточных линий человека и животных к новому метапневмовирусу (HMPV), изолированному в нашей стране из носоглоточного смыва больного. Показано, что чувствительными культурами оказались клетки Chang conjunctiva (клон 1-5С-4) и клетки линии CRFK с титром 1,2 Ig ТЦД50. В остальных клеточных линиях репродукция вируса была менее 1,0 Ig ТЦД50.

На протяжении многих лет на моделях клеточных культур нами проводились исследования по изучению различных противовирусных препаратов (амантадина, ремантадина, арбидола, тамифлю, ингаверина, циклоферона, ридостина, неовира, амиксина и др.). В последнее время при создании новых лекарственных средств изучено 15 нейротропных пептидов, обладающих противовирусной активностью в отношении вирусов герпеса, гриппа человека и птиц (23).

Помимо этого, в течение ряда лет нами на моделях культур клеток проводилось изучение экспрессии генов различных цитокинов (24—26). Мы исследовали перевиваемые клеточные линии L-41 (клетки костного мозга, выделенные от больного лейкемией, клон J-96), HeLa, МДСК, L-929 и ЛЭЧ после первого и 10-го пассажей культивирования. В этих линиях клеток в динамике определяли мРНК цитокинов: ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18 с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной

транскрипцией (ОТ-ПЦР). Было отмечено различие в экспрессии генов цитокинов на разных стадиях культивирования клеток в зависимости от клеточной линии. Так, при пассировании клеток L41 угнетался синтез мРНК противовоспалительного цитокина ИЛ-4, но активировались мРНК ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ИЛ-18, секретируемые клетками макрофагального типа. Особенно заметно изменялся цитокиновый профиль в культуре клеток МДСК после 10-го пассажа, в том числе не обнаруживались конститутивно вырабатываемые мРНК ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12 и ИЛ-18, которые ответственны за процессы апоптоза. При длительном пассировании клеток L-929 была дополнительно отмечена экспрессия гена противовоспалительного цитокина ИЛ-6. Известно, что в отличие от перевиваемых клеточных линий, диплоидные клетки млекопитающих в процессе пассирования претерпевают ограниченное число клеточных делений перед тем, как переходят в нечувствительное непролиферирующее состояние. Они имеют ограниченную продолжительность жизни и не растут после определенного числа пассажей, отражающего предельное число удвоений клеточных популяций для данной линии. В течение процесса старения показатели функциональной активности этих клеток претерпевает как количественные, так и качественные изменения. Нами показано, что диплоидная клеточная линия легкого эмбриона человека (ЛЭЧ) после первого пассажа продуцирует 7 цитокинов: ИФН- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-18. После 15 пассажа у этих клеток угнетался синтез ИЛ-8 и ИЛ-18, а после 23-го пассажа дополнительно угнетался синтез ИЛ-2, ИЛ-10 и ИЛ-18. Исходя из этих данных, следует учитывать иммунобиологические изменения в длительно пассируемых клетках, которые влияют на их пролиферацию и жизнеспособность и, соответственно, на чувствительность к репродукции вирусов.

Учитывая, что с 1995 г. ВОЗ рекомендует разрабатывать вакцины от гриппа с использованием в качестве субстрата перевиваемых культур клеток, аттестованных в соответствии с международными требованиями, нами совместно с контрольным Институтом им. Л.А. Тарасевича (Москва) была получена вакцинная линия клеток Vero(B), охарактеризованная по требованиям ВОЗ. 200 ампул с клетками этой линии были заложены в жидкий азот в виде посевного и рабочего банков (27). Линия применяется не только для научных исследований, но и для получения первой в стране противогерпетической отечественной вакцины «Витогерпавак» (28). При сравнительном изучении вакцины «Витагерпавак» и противогерпетической вакцины, приготовленной в Институте вакцин и сывороток (Санкт-Петербург) на первично-трипсинизированных клетках куриных эмбрионов, показано, что в клетках Vero(B) вирус герпеса репродуцировался активнее на 1,5-2,0 lg ТЦД50.

В нашей стране культуры клеток используются для приготовления большого количества диагностических препаратов и тест-систем для выявления микоплазм, ВИЧ, вирусов герпеса, гепатита А, гриппа, RS, аденовирусов. Разработаны также тест-системы для выявления антител у больных клещевым энцефалитом, лихорадкой Западного Нила, крымской геморрагической лихорадкой, Денге, Чикунчунья, тест-системы для выявления антигенов перечисленных вирусов в переносчиках и различные вакцины: против полиомиелита, гепатитов А и В, кори, паротита, краснухи, гриппа, клещевого энцефалита, герпеса и др. (27). Следует отметить, что при изучении чувствительности к вирусам на моделях клеточных культур и приготовлении различных медико-биологических препаратов необходимо использовать чистые, паспортизованные линии клеток и соблюдать оптимальную технологию их культивирования, а также использовать генетически однородную популяцию вирусов.

В заключение надо подчеркнуть, что наличие в нашем институте Коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных дает возможность проводить широкий спектр исследований в области вирусологии, иммунологии, молекулярной биологии, био- и нанотехнологии (23—34).

### Список литературы

1. Работа с клеточными культурами (культивирование первичных и перевиваемых клеток). Методические рекомендации. М., 2009, 17 с.
2. Технологический процесс криоконсервации перевиваемых клеточных линий. Методические рекомендации. М, 2009, 15 с.
3. Каталог Всероссийской коллекции клеточных культур, С. Петербург, Наука, 1991. 190 с.
4. Human and Animal cell lines Catalog, Interlay Project, 1993.
5. Каталог Российской Коллекции клеточных культур (РККК), С. Петербург, Омск, 1999.
6. **Данлыбаева Г.А., Мазуркова Н.А., Мартюшина Р.О., Трошкова Г.П., Подчерняева Р.Я.** Питательная среда на основе гидролизата рисовой муки для культивирования клеток и чувствительности к вирусам гриппа. Клеточные технологии, биология и медицина, 2009, 2: 113—117.
7. **Михайлова Г.Р., Мазуркова Н.А., Подчерняева Р.Я., Рябчикова Е.И., Трошкова Г.П., Шишкина Л.Н.** Морфологическая и кариологическая характеристики клеток MDCK и Vero(B) при культивировании в питательных средах на основе растительных гидролизатов. Вопросы вирусологии. 2011, 2: 9—14.
8. **Михайлова Г.Р., Подчерняева Р.Я., Мазуркова Н.А., Лопатина О.А., Фирсова Е.Л.** Сравнительное изучение кариологических характеристик клеток Vero(B), восстановленных в различных питательных средах после длительной криоконсервации. Информационный бюллетень «Клеточные культуры», Санкт-Петербург, 2013, 29: 79—85.
9. **Подчерняева Р.Я., Бакланова О.В., Глушенко Л.А., Исаева Е.И., Честков В.В., Табаков В.Ю., Михайлова Г.Р.** Репродукция вирусов гриппа в клетках MDCK,

адаптированных к росту в бессывороточной среде «Гибрис-2». Вопросы вирусологии. 2010: 47—49.

10. **Подчерняева Р.Я., Данлыбаева Г.А., Мазуркова Н.А., Бакланова О.В., Честков ВВ., Табаков В.Ю.** Адаптация клеток к росту в мало- и бессывороточной средах. Инф. бюллетень «Клеточные культуры». 2010, 25: 70—74.

11. **Исаева Е.И., Мазуркова Н.А., Скарнович М.О., Трошкова Г.П., Шишкина Л.Н., Подчерняева Р.Я.** Оптимизация роллерного культивирования вакцинных штаммов вирусов гриппа А и В в культурах клеток MDCK и Vero при использовании компонентов растительного происхождения. Биотехнология. 2010, 6: 21—27.

12. **Мазуркова Н.А., Сумкина Т.П., Трошкова Г.П.** Разработка питательной среды на основе соевого гидролизата, полученного с использованием бромелаина, для клеток MDCK. Тезисы Международной научной конференции «Новые технологии, инновации, изобретения», Мальдивские острова, «Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований», 2011, 6: 38—39.

13. **Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И.** Вирусы и вирусные вакцины. М. 2007, 522 с.

14. **Подчерняева Р.Я., Урываев Л.В., Дедова А.В., Дедова Л.В., Ионова К.С., Михайлова Г.Р., Парасюк Н.А., Гринкевич О.М., Селиванова Т.К., Гребенникова Т.В. Петрачев А.Д., Щетвин М.Н.** Определение микоплазм и вируса бычьей диареи в коллекционных клеточных линиях. Инф. бюллетень «Клеточные культуры», С.Петербург, 2011, 27: 80—88.

15. **Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В., Дедова Л.В., Селиванова Т.К., Парасюк Н.А., Мезенцева М.В., Костина Л.В., Гущина Е.А., Подчерняева Р.Я., Гребенникова Т.В.** Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами. Вопросы вирусологии, 2012, 57, 5: 15—21

16. **Подчерняева Р.Я., Лопатина О.А.** Чувствительность культивируемых клеток к вирусам. В кн. «Методы культивирования клеток», СПб, 2008: 84—95.

17. **Дерябин П.Г., Львов Д.К., Исаева Е.И., Данлыбаева Г.А., Подчерняева Р.Я., Щелканов М.Ю.** Спектр клеточных линий позвоночных, чувствительных к высокопатогенным вирусам гриппа А/крачка/ЮА/61(Н5№) и А/крачка/Новосибирск 56/05( Н5N1). Вопросы вирусологии, 2007, 1: 45—48.

18. **Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Колобухина Л.В., Малышев Н.А., Базарова М.В., Меркулова Л.Н., Дерябин П.Г., Кузьмичев А.Г., Федякина И.Т., Гребенникова Т.В., Усачев Е.В., Садыкова Г.К., Шевченко Е.С., Трушакова С.В., Лаврищева В.В., Альховский С.В., Самохвалов Е.И., Белякова Н.В., Иванова В.Т., Оскерко Т.А., Латышев О.Е., Беляев А.М., Беляев А.Л., Феодоритова Е.Л.** Распространение нового пандемического вируса гриппа А/Н1N1 М в России. Вопросы вирусологии, 2010, 3: 4—10.

19. **Львов Д.К., Бурцева Е.И., Лаврищева В.В.** Информация Центра экологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РФ АМН об итогах эпидемического сезона 2009—2010 гг. по гриппу и ОРВИ в мире и в России. Вопросы вирусологии, 2011, 1: 44—49.

20. **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 Н1N1, вирусам гриппа птиц, свиней, человека. Вопросы вирусологии, 2011, 4: 14—19.

21. **Каверин Н.В., Смирнов Ю.А., Межвидовая передача вируса гриппа А и пандемия гриппа.** Вопросы вирусологии 2003, 3: 4—10.

22. Подчерняева Р.Я., Исаева Е.И., Данлыбаева Г.А., Михайлова Г.Р. Репродукция вирусов гриппа в культуре клеток мозга хорька (Mrf). Ветеринарная патология, 2006, 1: 107—109.

23. Мезенцева М.В., Андреева Л.Н., Подчерняева Р.Я., Исаева Е.И., Шаповал И.М., Щербенко В.Э., Мясоедов Н.Ф. Нейротропный пептид, обладающий антивирусной активностью в отношении гриппа человека и птиц при герпесвирусной инфекции. Инфекция и иммунитет, 2011, 1: 81—84.

24. Мезенцева М.В., Подчерняева Р.Я., Урываев Л.В., Щербенко В.Э., Зуев В.А. «Направленная коррекция цитокиновой регуляторной сети при вирусных инфекциях». Вестник Российской Академии Естественных наук, 2011, 11, 1: 9—13.

25. Подчерняева Р.Я., Мезенцева М.В. Клеточные культуры как модель исследования механизмов синтеза цитокинов. Сборник «Интерфероны 2011», М. 2012: 417—424.

26. Руссу Л.И., Мезенцева М.В., Подчерняева Р.Я. Исследование механизмов синтеза цитокинов на моделях перевиваемых и первичных кожно-мышечных клеточных линиях. Медицинский академический журнал. Приложение. Материалы II-й Всероссийской научной конференции молодых ученых: “Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия.” Санкт-Петербург, 2012: 398—400.

27. Подчерняева Р.Я., Хижнякова Т.М., Михайлова Г.Р., Шалунова Н.В., Петручук Е.М., Бердникова З.Е. Линия клеток Vero(B) для приготовления медикобиологических препаратов, Вопросы вирусологии, 1996, 4: 183—185.

28. Бархалева О.А., Ладыжинская И.П., Воробьева М.С., Шалунова Н.В., Подчерняева Р.Я., Михайлова Г.Р., Хорошева Т.В., Баринский И.Ф. «Витагерпавак» первая отечественная вакцина на перевиваемой линии клеток Vero(B). Вопросы вирусологии, 2009, 5: 33—37.

29. Бобринецкий И.И., Морозов Р.А., Селезнев А.С., Подчерняева Р.Я., Лопатина О.А. Исследование пролиферативной активности и жизнеспособности клеток фибробласта и глиобластомы на различных типах углеродных нанотрубок. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 153, 2: 227—232.

30. Бобринецкий И.И., Морозов Р.А., Селезнев А.С., Подчерняева Р.Я., Лопатина О.А. Перспективы использования углеродных нанотрубок в качестве каркасного материала в инженерии биологических тканей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011, 6, 1: 85—90.

31. Бобринецкий И.И., Селезнёв А.С., Гайдученко И.А., Федоров Г.Е., Домантовский А.Г., Пресняков М.Ю., Подчерняева Р.Я., Михайлова Г.Р., Суетина И.А. Исследование взаимодействия нервных клеток с сетками углеродных нанотрубок, полученными при химическом осаждении из газовой фазы. Биофизика, 2013, 58 (3): 524—530.

32. Руссу Л.И., Мезенцева М.В., Егорова Е.М., Суетина И.А., Потапова Л.А., Сосенкова Л.С., Гущина Е.А. Влияние наночастиц серебра на экспрессию генов цитокинов в клетках фибробластов эмбриона человека. Сборник трудов Всероссийской научной конференции молодых ученых: «Медико-биологические аспекты химической безопасности». Санкт-Петербург, 2013: 253—254.

33. Руссу Л.И., Суетина И.А., Потапова Л.А., Остроумов С.А., Мезенцева М.В. Изучение *in vitro* потенциального действия на иммунитет наночастиц окислов металлов Cu и Fe. «Инновации в науке» № 10 (23) Сборник статей по материалам XXVI Международной научно-практической конференции. Новосибирск, 2013: 23—28.

34. Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Firsova E.L., Gushhina E.A. Effect of single walled carbon nanotubes on the biological properties of the cell cultures of human embryonic

fibroblasts. 3rd International Scientific and Practical Conference "Science and Society" ISPC 2013, 3:175—184.

## **ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛАБОРАТОРИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ ИНСТИТУТА НЕЙРОХИРУРГИИ**

***В.М. Семенова***

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины», Киев,

[seveme22@rambler.ru](mailto:seveme22@rambler.ru)

В обзоре представлены основные направления научной работы Лаборатории культивирования тканей Института нейрохирургии. Охарактеризованы результаты научных разработок и особенности методических подходов в проведенных исследованиях с применением методов культивирования в зависимости от поставленных целей и задач.

**Ключевые слова:** методы культивирования, нейроклетки, опухоли мозга.

Лаборатория культивирования тканей в Институте нейрохирургии организована в 1962 г. по инициативе первого директора института — акад. А.И. Арутюнова и зав. Отделом нейропатоморфологии проф. Б.С. Хоминского. Создание такой лаборатории было продиктовано необходимостью получить модель экспериментального роста опухолей мозга для углубленного изучения их гистобиологических свойств. Метод культивирования тканей был успешно освоен канд. мед. наук Т.П. Верхоглядовой в Московском Институте морфологии человека под руководством акад. А.Д.Тимофеевского. В 1963 г. были получены первые результаты эффективного роста астроцитомы в первичной культуре. Со временем Лаборатория культивирования тканей стала серьезной базой для оригинальных экспериментальных исследований в области нейроонкологии и нейробиологии. Проф. Т.П. Верхоглядова руководила лабораторией до 1992 г.

Основным научным направлением лаборатории было изучение гистобиологических особенностей роста различных опухолей мозга в эксплантационных культурах. На первом этапе в культурах глиальных опухолей центральной нервной системы (ЦНС) были исследованы фенотипические особенности клеточного состава, архитектура пространственного роста и пролиферативная активность клеток. С помощью комплекса цитохимических методов выявления в опухолевых клетках нуклеиновых кислот, гликогена,

липидов, ряда окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов и метода цитоспектрофотометрии ДНК были охарактеризованы структурно-метаболические свойства культивируемых глиом головного мозга различной степени злокачественности.

Была установлена способность к астроцитарной цитотипической дифференцировке опухолевых клеток изоморфноклеточных глиобластом — наиболее злокачественного варианта глиом с недифференцированным клеточным составом, что подтвердило их астроцитарный гистогенез. Благодаря использованию метода кинематографической регистрации особенностей роста культур удалось наблюдать прижизненное деление опухолевых клеток и их реакции на воздействие ряда противоопухолевых препаратов.

Освоение метода гистоавторадиографии с меченым тимидином позволило количественно оценивать параметры клеточного цикла и активность пролиферации клеток культивированных глиом до, и после воздействия на них антибластических препаратов. В экспериментах были получены объективные показатели скорости роста и чувствительности культивируемых глиом различной степени злокачественности к тестируемым противоопухолевым препаратам. Результаты культуральных исследований биологии опухолей мозга обобщены в ряде диссертаций (1—5) и в монографии А.П. Ромоданова с соавторами (6).

При изучении индукции экспериментальных глиом головного мозга крыс были получены две линии перевиваемых клеток злокачественных глиом — 35 и 2211, которые включены в каталог Всесоюзной коллекции клеточных культур (7, 8).

В связи с началом разработки в нашем институте новых научных направлений в 1992 г. Лаборатория культивирования тканей была выделена из состава Отдела нейрпатоморфологии в самостоятельное научное подразделение. Заведование лабораторией было передано докт. мед. наук В.М. Семеновой. В этот период в лаборатории были освоены методы получения диссоциированных культур нейроклеток из ткани мозга экспериментальных животных, разработаны методы получения клеточных фракций, обогащенных нейроцитами и глиоцитами, для их дальнейшего культивирования.

Важным аспектом исследований стало получение культуры эмбриональных нейробластов (ЭН) для их внутримозговой имплантации с целью коррекции нарушений метаболизма и поведенческих реакций экспериментальных животных (крыс) с моделированным эквивалентом гипо- и гиперреактивности. В обеих сериях опытов после имплантации крысам на область префронтальной коры мозга эмбриональных нейробластов у крыс наблюдался положительный лечебный эффект, документированный с помощью нейрофизиологического

мониторинга. Результаты этих исследований обобщены в кандидатской диссертации нейрохирурга Е.И. Слынько (9), а затем освещены в монографии В.М. Цымбалюка с соавторами (10).

В связи с Чернобыльской аварией в Украине актуальным направлением культуральных исследований стало выяснение реакции клеток мозга на воздействие малых доз радиации. С этой целью были поставлены эксперименты по моделированию воздействия малых доз радионуклида Cs-137 и прямого рентгеновского облучения на культуры нейроцитов, полученных из мозга новорожденных крыс и эмбрионов пренатального возраста. Результаты этих исследований освещены в коллективной монографии: «Хроническое влияние малых доз облучения на нервную систему. Экспериментальные исследования и клинические наблюдения» (11).

Изучение проблемы эпилептогенеза и роли глиального компонента в формировании эпилептогенного очага в головном мозге индуцировало разработку методов получения культур, обогащенных глиоцитами с преобладанием астроцитов. Идентификация клеток астроглии в таких культурах проводилась с помощью метода иммуноцитохимического выявления кислого фибриллярного белка (GFAP) — маркера астроцитов, а клеток нейронального ряда — с помощью выявления активности нейронспецифичной энолазы (NSE). Суспензию культивированных глиоцитов имплантировали в мозг экспериментальным животным (крысам) с последующим мониторингом биоэлектрической активности мозга и проведением морфологического контроля эффективности приживления имплантированных клеток в динамике наблюдения. Эти разработки включены в кандидатскую диссертацию нейрохирурга К.Р. Костюка (12).

Важным направлением научных исследований Лаборатории нейроиммунологии института явилось изучение нарушений иммунного статуса у нейроонкологических больных. В связи с этим, на культурах глиом нами исследованы иммунноподобные свойства клеток головного мозга экспериментальных животных различного возраста. Изучались, также, реакции культивированных клеток злокачественных глиальных опухолей головного мозга на воздействие клеточных суспензий, обогащенных нейрочитами и глиоцитами, и их супернатантов. Эти материалы отражены в коллективной монографии: «Иммунная система головного мозга» (13).

При изучении цитокинового статуса у нейроонкологических больных в нашей лаборатории исследован эффект прямого воздействия  $\alpha$ -интерферона на клетки глиальных опухолей в

суспензионных культурах. Эффект воздействия оценивался по уровням апоптозной гибели опухолевых клеток в опытных культурах по сравнению с контрольными (14).

В ходе разработки проблемы фотодинамической терапии в нашей лаборатории с участием нейрохирурга-онколога проф. В.Д. Розуменко проводились многоплановые эксперименты по изучению оптимальных режимов эффекта фотодеструкции опухолевых клеток. Первоначально эксперименты проводились на культуре 101.8 перевиваемой злокачественной глиомы мозга крыс, а затем на культурах глиальных опухолей II—IV-й степени анаплазии, удаленных из мозга человека. Параллельно, в сравнительном аспекте, протестирована эффективность ряда фотосенсибилизаторов (гематопорфирин, фталоцианин, фотосенс) при разных режимах последующего облучения культур лазером. Результаты этих исследований стали основой для разработки схем и режимов применения фотодинамической терапии у нейроонкологических больных (15).

Важным направлением наших исследований является изучение в условиях культивирования пролиферативного и дифференцировочного потенциала нейральных стволовых клеток (НСК) из различных регенеративных зон эмбрионального и постнатального мозга экспериментальных животных и человека. Большое внимание было уделено изучению биологии НСК из ольфакторной луковицы (ОЛ) человека и животных, которая, как известно, является резервуаром дифференцирующихся НСК в постнатальном мозге млекопитающих. Результаты этих многоплановых исследований освещены в коллективной монографии (16).

В дальнейшем суспензия культивированных НСК из ОЛ крыс в составе полимерного нейrogеля была использована для имплантации в очаг травматического повреждения спинного мозга крыс. В динамике нейрофизиологического мониторинга и морфологического контроля получен положительный клинический эффект у экспериментальных животных. Результаты этих исследований обобщены в кандидатской диссертации В.В. Медведева (17) и затем опубликованы в большой монографии В.И. Цымбалюка и В.В. Медведева (18).

В рамках разносторонних исследований биологии НСК в условиях культивирования изучены также антигенные характеристики НСК эмбрионального и постнатального мозга животных и человека (19).

В связи с активной разработкой в онкологии методов биотерапии большое значение приобретает использование модели культивирования в нейроонкологии для оценки активности ряда иммуномодуляторов с противоопухолевыми свойствами, а также для изучения противоопухолевых свойств ряда биологически активных соединений, выделенных

из различных клеточных фракций эмбрионального и постнатального мозга экспериментальных животных. Результаты этих исследований, проведенных совместно с Лабораторией нейроиммунологии, отражены в ряде публикаций (20, 21).

При разработке клинических аспектов в проблеме нейротрансплантации эмбриональной нервной ткани (ЭНТ) человека практически важным оказалось проведение сравнительной оценки жизнеспособности и активности роста культур, полученных из фрагментов ЭНТ после различных условий ее предварительного хранения. В этих опытах установлены параметры оптимального режима подготовки эмбрионального материала перед его клиническим использованием (22).

В последние годы в связи с интенсивным развитием в мировой науке методов регенеративной медицины и клеточной терапии, в нашей лаборатории начаты исследования в условиях культивирования мезенхимных стволовых клеток (МСК), выделяемых из стромального компонента жировой ткани экспериментальных животных и человека. В частности, изучается пролиферативный потенциал культивируемых МСК, апробируются рациональные методы их индуцированной дифференцировки в нейрогенном направлении для дальнейшего их использования в восстановительном лечении ряда дегенеративно-дистрофических заболеваний ЦНС.

Таким образом, Лаборатория культивирования тканей вносит весомый вклад в разработку разноплановых проблем научной тематики Института нейрохирургии. Результаты культуральных исследований представляют не только теоретический интерес, но и в большой степени имеют важное практическое значение для клинической нейрохирургии. Материалы наших культуральных исследований в виде докладов постоянно представляются на конференциях и съездах нейрохирургов Украины и России, отражены более чем в 150 публикациях и включены в 5 докторских, 10 кандидатских диссертаций и 7 монографий.

Выполнение культуральных исследований осуществляется небольшим коллективом, в котором кроме зав. лаборатории работает научный сотрудник Стайно Лариса Петровна, проявившая прекрасные способности в работе с культурами, младший научный сотрудник Егорова Диана Михайловна. Большую помощь в работе лаборатории оказывает старший научный сотрудник, канд. биол. наук, нейроиммунолог Любич Лариса Дмитриевна — член Ассоциации специалистов по клеточным культурам.

В заключение считаю необходимым подчеркнуть, что чрезвычайно большое значение для развития лаборатории имеет наше многолетнее участие в работе Межрегиональной

общественной научной организации «Ассоциации специалистов по клеточным культурам» (АСКК), организованной д.б.н., профессором, Заслуженным деятелем науки РФ, зав. Отделом клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) Г.П. Пинаевым. Посещение научных симпозиумов и школ АСКК и Института цитологии РАН позволяет нам знакомиться с новейшими достижениями в области биологии культивируемых клеток и тканей. Особо следует отметить, что начало наших многолетних исследований по биологии НСК в большой мере было индуцировано научной информацией, почерпнутой на этих тематических симпозиумах из материала докладов, посвященных разработке методов получения, практического использования и культивирования стволовых клеток. На симпозиумах и школах АСКК наша лаборатория представила 2 лекции — доклада и 7 стендовых сообщений, тезисы которых были опубликованы в журнале «Цитология». В Информационном бюллетене «Клеточные культуры» опубликовано 11 статей. В монографию «Методы культивирования клеток» включена статья В.М. Семеновой «Выделение и культивирование клеток нервной ткани» (23). С 2001 г. в Украинском нейрохирургическом журнале регулярно публикуются обзоры В.М. Семеновой о работе симпозиумов, проходивших в Институте цитологии РАН по тематике «Биология клеток в культуре».

### Список литературы

1. **Верхоглядова Т.П.** Макроглиальные опухоли головного мозга (патоморфология, гистохимия, культура ткани). Автореф. дисс. докт. мед. наук: Киевский научно-исследовательский ин-т нейрохирургии. 1970, 36 с.
2. **Семенова В.М.** Эпендимомы и эпендимоастроцитомы центральной нервной системы (патоморфология, гистохимия, культура ткани). Автореф. дисс. канд. мед. наук. Киевский научно-исследовательский институт нейрохирургии. 1971, 27 с.
3. **Соснов Ю.Д.** Комбинированное лечение злокачественных глиальных опухолей больших полушарий головного мозга (хирургическое вмешательство и химиотерапия). Автореф. дисс. докт. мед. наук. 1981. 33 с.
4. **Морозов А.Н.** Контактная химиотерапия глиом головного мозга с применением пленочного депонатора. Автореф. дисс. канд. мед. наук. 1988, 24 с.
5. **Семенова В.М.** Экспериментально-морфологическая оценка эффективности антибластической терапии глиом головного мозга. Автореф. дисс. докт. мед. наук. Украинский научно-исследовательский ин-т нейрохирургии. 1993, 29 с.
6. **Ромоданов А.П., Станиславский В.Г., Верхоглядова Т.П.** Исследование сарком головного мозга в культуре ткани. В кн.: Саркомы головного мозга. М., Медицина, 1977: 66—70.
7. **Жмарева Е.Н.** Индукция и экспериментальное исследование опухолей головного мозга крыс. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Ин-т проблем онкологии им.Р.Е.Кавецкого. Киев. 1984, 24 с.

8. **Каталог «Всесоюзная коллекция клеточных культур».** Под ред. Г.И.Пинаева. Л.: Наука, 1991:76.

9. **Слынько Е.И.** Экспериментальная нейрохирургическая коррекция поведенческих нарушений. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Ин-т нейрохирургии. Киев, 1993. 16 с.

10. **Цымбалюк В.И., Верхоглядова Т.П., Слынько Е.И.** Нейрохирургическое лечение психических заболеваний. Киев, 1997: 293.

11. **Семенова В.М., Верхоглядова Т.П., Стайно Л.П.** Моделювання впливу малих доз радіації на клітини нервової тканини експериментальних тварин в умовах культивування. В кн.: Хронічний вплив малих доз опромінення на нервову систему. Експериментальні дослідження та клінічні спостереження. Под ред. Ю.П.Зозулі, К., 1998: 278-303.

12. **Костюк К.Р.** Вплив гетеротопічної алотрансплантації тканини гіпокампу на динаміку біоелектричної активності мозку та функціонально-морфологічної інтеграції імплантату з реципієнтом (експериментальне дослідження): автореф. дисс. канд. мед. наук: спец.14.01.05 – нейрохирургія. К.Р. Костюк. Ін-т нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова АМН України. — К., 1999. 22 с.

13. **Семенова В.М., Цымбалюк В.И., Стайно Л.П., Любич Л.Д., Верхоглядов Ю.П.** Изучение противоопухолевых свойств различных популяций клеток головного мозга в культуре нервной ткани *in vitro*. В кн.: Иммунная система головного мозга. Под ред. Н.И. Лисяного. Киев, 1999: 136—147.

14. **Семенова В.М., Лисяний Н.И., Любич Л.Д., Стайно Л.П.** Экспериментально-морфологическая оценка чувствительности глиом к  $\alpha$ -интерферону. Укр.нейрохірург.журн., 2005, 4: 26—34.

15. **Розуменко В.Д.** Фотодинамическая терапия глиом головного мозга. В кн.: Глиомы головного мозга. Под ред. Ю.А.Зозули, Киев, 2007: 495—501.

16. **Зозуля Ю.А., Семенова В.М., Стайно Л.П.** Особенности нейральных стволовых клеток обонятельной луковицы в условиях культивирования. В кн.: Нейрогенная дифференцировка нейральных стволовых клеток. Под ред. Ю.А.Зозули. Киев, 2005, 99—119.

17. **Медведев В.В.** Влияние имплантации синтетического макропористого гидрогеля и трансплантации клеток ольфакторной луковицы на процессы регенерации спинного мозга после его травматического повреждения в эксперименте. Автореф. дис. канд. мед. наук. Институт нейрохирургии им. А.П. Ромоданова АМН Украины. Киев, 2008. 20с.

18. **Цымбалюк В.И., Медведев В.В.** Спинной мозг. Элегия надежды. Винница: Нова книга, 2010. 944 с.

19. **Любич Л.Д., Лисяний Н.И., Семенова В.М., Стайно Л.П.** HLA-антигенная характеристика нативных и культивируемых нейроклеток фетального и постнатального головного мозга человека. Инф.бюл. «Клеточные культуры», С-Пб., 2010, 25: 47—59.

20. **Примушко Л.І., Семенова В.М., Лисяний О.М., Тормасова А.І., Стайно Л.П.** Дослідження протипухлинної дії імуномодельючого препарату галавіт. Укр.нейрохірург.журнал, 2007, 1: 32—36.

21. **Лисяний М.І., Бельська Л.М., Семенова В.М., Розуменко В.Д., Стайно Л.П.** Дослідження впливу пептидів ембріональної нервової тканини щурів на клітини внутрішньомозкових пухлин та функціональну активність мононуклеарів периферичної крові. Проб.кріобіології, 2008, 4: 441—443.

22. **Семенова В.М., Цымбалюк В.І., Пічкур Л.Д., Стайно Л.П.** Порівняльна цитоструктурна оцінка росту ембріональної нервової тканини людини в умовах культивування після різних способів її зберігання. Укр.нейрохірург.журн., 2008, 4: 68—71

23. **Семенова В.М.** Выделение и культивирование нервной ткани. В кн.: Методы культивирования клеток. С-Пб., 2008:157—173.

## **ЦИТОГЕНЕТИКА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

***В.И. Турилова, Т.К. Яковлева***

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [tyak@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:tyak@mail.cytspb.rssi.ru)

Развитие техники культивирования клеток, получение постоянных клеточных линий человека и животных и создание в 1978 г. Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур (РККК) стимулировали изучение кариотипов клеточных линий. Основоположником и координатором работы РККК был профессор Георгий Петрович Пинаев. Центральным банком РККК была определена Коллекция культивируемых клеток позвоночных Института цитологии РАН (ИНЦ РАН), входившая в созданный Г.П. Пинаевым Отдел клеточных культур. Г.П. Пинаев был инициатором исследований по цитогенетике культивируемых клеток, поступавших на хранение в коллекцию ИНЦ РАН. Г.П. Пинаев нашел единомышленников в лице научного сотрудника Лаборатории морфологии клетки ИНЦ РАН, к.б.н. С.Е. Мамаевой и ее учеников. Усилиями этой мощной команды был выполнен цитогенетический анализ самых разнообразных клеточных линий человека и животных. Разработаны подходы к цитогенетическому анализу клеточных линий и критерии объективной оценки его результатов. Сформулированы закономерности кариотипической изменчивости клеточных линий, которые, как оказалось в результате дальнейших исследований, имеют универсальный характер.

Таким образом, в нашей стране было заложено новое направление в биологии клетки в культуре — цитогенетика постоянных клеточных линий человека и животных. Основы и развитие представлений о кариотипической изменчивости клеточных линий, полученных из разных типов новообразований человека, кратко обсуждаются в настоящей работе.

**Ключевые слова:** клеточные линии, полученные из опухолей человека, хромосомная нестабильность, кариотипическая изменчивость, закономерности кариотипической изменчивости.

В эволюции клеток в культуре можно выделить две качественно различные стадии, различающиеся по уровню кариотипической гетерогенности: стадию становления и стадию

стабилизации клеточной линии. На стадии становления, которая отличается выраженной кариотипической гетерогенностью, ведущую роль играет отбор клонов клеток, наиболее приспособленных к существованию в условиях *in vitro*. Стадия стабилизации характеризуется снижением кариотипической гетерогенности и формированием сбалансированной кариотипической структуры клеточной популяции (1). Установлено, что для выживания клеточной популяции *in vitro* необходимо существование в ней в определенном соотношении клеток с основным и дополнительными структурными вариантами кариотипа (2, 3). Сбалансированная кариотипическая структура, несмотря на значительную гетерогенность клеточных популяций, была выявлена в разных линиях опухолевого происхождения: в сублиниях HeLa (4, 5), клеточной линии Raji (6) и линиях множественной миеломы (7).

Стадия стабилизации, по-видимому, также неоднородна по варибельности хромосомного материала и сочетает в себе чередующиеся циклы более и менее выраженной хромосомной нестабильности (8). Когда геном нестабилен (главным образом, под влиянием условий культивирования), наряду с клональными перестройками хромосом появляются неклональные, которые создают генетическое разнообразие, некий эволюционный ресурс, что и обеспечивает выживание клеточной популяции, ее адаптацию к менее благоприятным условиям. При оптимальных условиях культивирования уровень неклональных перестроек может уменьшаться и даже исчезать. На этой фазе кариотип оказывается более стабильным, и клональные перестройки обеспечивают пролиферацию клеток (8). При этом изменение структуры кариотипа может отражаться на комплексе других биологических свойств культивируемых клеток. Следовательно, вопросы об ограничениях, характере и направленности кариотипической изменчивости клеточных линий в условиях их длительного существования в культуре приобретают чрезвычайную актуальность.

Фундаментальный вопрос об эволюции опухолевых клеток *in vitro* заключается в понимании природы культивируемых клеток. Исследования гетерогенности опухолей *in vivo* предполагают два возможных пути прогрессии. Согласно модели клональной эволюции стохастические генетические и/или эпигенетические изменения обеспечивают селективные преимущества доминантному клону, поэтому его опухолевые клетки обладают сходным туморогенным потенциалом (9). Согласно модели опухолевых стволовых клеток, подразумевающей иерархическую организацию, только небольшая часть клеток является туморогенными и создает гетерогенность популяции в процессе дифференцировки (10). По-видимому, динамика популяции опухолевых клеток на разных стадиях прогрессии

преимущественно соответствует то одной, то другой модели. При этом клетки со стволовыми свойствами обеспечивают генетическое разнообразие популяции, а отбор поддерживает наиболее приспособленные варианты (так называемая модель «Back to Darwin», 10). Такая модель вполне согласуется с циклами более и менее выраженной хромосомной нестабильности при эволюции генома опухолевых клеток *in vivo* (8). По-видимому, она отчасти справедлива и для опухолевых клеток в культуре и может объяснять кариотипическую гетерогенность, изменение уровня ploидности клеток, особенно на стадии становления клеточной линии, скорость нарастания хромосомных перестроек и характер кариотипической изменчивости при прогрессии клеток в культуре, наконец, саму возможность получения клеточной линии.

Самым действенным фактором, обуславливающим изменение кариотипа клеток *in vitro*, являются условия культивирования (3, 11). Уже в первой серии работ по цитогенетике старейшей клеточной линии HeLa при непосредственном участии Г.П. Пинаева было продемонстрировано влияние условий культивирования на изменчивость кариотипа клеток и роль отбора в становлении клеточных популяций, культивируемых разными способами (12, 13). Так, при смене способа культивирования клеток M-HeLa со статического на роллерное обнаружено уменьшение числа хромосом в кариотипе, появление новых структурно перестроенных хромосом и, главным образом, перераспределение в популяции доли клеток с ранее выявленными вариантами кариотипа.

Исследования кариотипической изменчивости «безмаркерных» (не имеющих в своем кариотипе структурно перестроенных хромосом) клеточных линий на стадии стабилизации убедительно показали, что отбор в клеточных популяциях происходит не по отдельным хромосомам, а по сбалансированному кариотипу (2). Ограничение количественной и структурной хромосомной нестабильности и стабилизирующая роль отбора были обнаружены и при клональной эволюции клеточных линий карцином толстой кишки (14, 15), яичника (15), и в стволовых клеточных линиях глиомы (16).

Кроме того, в работах по изучению кариотипической изменчивости «безмаркерных» клеточных линий под влиянием факторов культивирования была показана зависимость характера кариотипической изменчивости от исходной структуры кариотипа клеток (11). Структура кариотипа клеточных линий опухолевого происхождения (комплекс численных и структурных перестроек хромосом) определяется тканеспецифическими механизмами онкогенеза. Однако, вопрос о том, в какой степени механизм геномной нестабильности,

лежащий в основе возникновения того или иного типа неоплазий, определяет изменения структуры кариотипа опухолевых клеток при их длительном существовании *in vitro*, остается открытым.

Первым подходом к цитогенетическому анализу клеточных линий с перестроенным кариотипом (G-окрашивание хромосом), позволяющим получить объективную оценку его результатов, был предложенный С.Е. Мамаевой прием построения обобщенного реконструированного кариотипа (ОРК) клеточной линии (4, 13). Прием заключался в реконструкции нормальных хромосом из фрагментов, входящих в состав структурно перестроенных, и построении, таким образом, реконструированного кариотипа клетки, а при анализе 15—25 (до 100) метафазных пластинок — ОРК клеточной линии.

Важно подчеркнуть, что и в настоящее время принципы цитогенетического анализа клеточных линий, основанные на представлении о четкой корреляции между наборами нормальных и аномальных хромосом и построении ОРК, оказываются чрезвычайно полезными при изучении клеточных линий с неизвестным кариотипом и оценке кариотипической структуры клеточных популяций, тем более что в нашей стране метод G-окрашивания хромосом остается наиболее доступным.

Построение ОРК клеточных линий, полученных из опухолей разного тканевого происхождения, позволило выявить ряд закономерностей кариотипической изменчивости опухолевых клеток в культуре (1).

ОРК дал возможность выявить неслучайный характер вовлечения хромосом и хромосомных локусов в численные и структурные перестройки и оценить постоянство и вариабельность хромосомного материала в кариотипе. Впервые было показано, что в культивируемых клетках *in vitro* обеспечивается сохранение как минимум диплоидности по всем хромосомам нормального набора с экстракопированием строго определенных для каждой клеточной линии хромосом и хромосомных районов (17). Таким образом, отбор при становлении клеточной линии идет в направлении клеток, имеющих, по меньшей мере, диплоидное число хромосом, несмотря на то, что в кариотипе могут быть численно и структурно перестроенные хромосомы. В то же время в культивируемых опухолевых клетках могут быть выявлены небольшие потери хромосомного материала (в том числе нуллисомии) (16), которые, безусловно, значимы для онкогенеза, но несопоставимы по масштабу с утратой хромосомного материала, обнаруживаемой в клетках *in vivo* (18). В настоящее время феномен «диплоидности» культивируемых опухолевых клеток остается малоизученным.

Присутствие в кариотипе двух гомологов или копий хромосом каждой пары не исключает генетических дефектов. Как было показано, существенную роль в туморогенезе играет однородительская дисомия, ОРД (uniparental disomy, UPD), которая обнаружена во множестве типов опухолей человека (19). ОРД представляет тип хромосомных аномалий, когда в нормальном диплоидном кариотипе человека пара гомологов представлена хромосомами только одного из родителей. В соматических клетках ОРД возникает в результате митотической рекомбинации и приводит к потере гетерозиготности, как по отдельным хромосомам, так и по отдельным хромосомным локусам без изменения числа копий ДНК (19). ОРД часто маскирует предшествующие генетические (мутации, делеции) и эпигенетические (метилирование) изменения, которые затрагивают как гены, в том числе, импринтированные, так и последовательности микроРНК (20). ОРД рассматривают как один из ключевых механизмов инактивации супрессорных генов и/или активации онкогенов (20).

Очевидно, что в клеточных линиях гомологичные хромосомы могут быть представлены измененными копиями и/или имеет место экстракопирование хромосом и хромосомных районов, содержащих скорее аномальные гены, что приводит к поддержанию опухолевого фенотипа и увеличению пролиферативного потенциала клеток.

Внедрение методов молекулярной цитогенетики (различных вариантов гибридизации ДНК *in situ* с использованием проб на центромерные районы, целые хромосомы и отдельные хромосомные локусы, сравнительной геномной гибридизации, comparative genome hybridization, CGH) и анализа геномного профиля (arrayCGH, single nucleotide polymorphism, SNP-based mapping) позволило подтвердить справедливость представлений о структуре кариотипа опухолевых клеточных линий, полученных на основе методов классической цитогенетики (21).

Стало очевидно, что в клеточных линиях, полученных из разных типов неоплазий человека, вовлечение хромосом и хромосомных локусов в перестройки имеет опухолеспецифический характер (7, 22—24). В опухолевых клетках *in vitro* сохраняются не только первичные онкогенные транслокации и/или делеции, но и весь комплекс реаранжировок генома опухолевых клеток *in vivo*. Сохраняется, поддерживается и углубляется специфический для определенных типов опухолей хромосомный дисбаланс, причем его углубление, возможно, происходит также посредством опухолеспецифических механизмов. Например, в процессе культивирования клеток K562 происходит экстракопирование реаранжированного фрагмента хромосом 9 и 22, содержащего гибридный ген *BCR/ABL1*, в составе хромосомы

der(22)t(9;13;22)(q34;q31;q11) (25), а в клеточных линиях острого миелобластного лейкоза с делецией длинного плеча хромосомы 5 в кариотипе — экстракопирование фрагментов хромосом 8 и 11, содержащих патогенетически значимые гены *MYC* и *MLL* (26).

Опухолевые клеточные линии преимущественно используются в качестве моделей для изучения механизмов возникновения и прогрессии новообразований (23) и оценки эффективности противоопухолевых препаратов (27). Более того, представления о молекулярном патогенезе отдельных типов неоплазий человека получены именно при всестороннем исследовании клеточных линий. Существенно меньше внимания уделяется исследованию закономерностей кариотипической изменчивости популяций опухолевых клеток *in vitro* как автономных динамических систем.

Гетерогенность каждого типа новообразований по генетическим, морфологическим, клиническим характеристикам, с одной стороны, и получение все возрастающего числа клеточных линий — с другой, свидетельствуют об уникальности клеточных линий, сохранении ими опухолевой индивидуальности (реализация определенного механизма патогенеза в индивидуальном геноме). Показательным является отсутствие одинаковых структурных перестроек хромосом в линиях одного опухолевого происхождения. Скорее, сходный паттерн изменений числа копий ДНК (копийный дисбаланс), достигаемый различными механизмами, объединяет клеточные линии в рамках одного типа опухолевых заболеваний (22, 24). Поэтому для исследования механизмов молекулярного патогенеза и первичного тестирования потенциальных противоопухолевых препаратов создаются панели клеточных линий. Наиболее известной из них является NCI-60 drug-screening panel (27).

В Американской коллекции клеточных культур (ATCC, <http://www.lgcstandards-atcc.org/>) в качестве надежных экспериментальных платформ для изучения онкогенеза и разработки подходов к противоопухолевой терапии сформированы панели опухолевых клеточных линий, сгруппированных на основании разных характеристик: тканевого происхождения, характера генетических нарушений, молекулярного автографа, или конкретного измененного гена (EGFR, MYC, RAS, RB1, TP53 и др.).

Интегральный анализ структурно-функциональной организации генома клеточных линий на уровне кариотипа, последовательностей ДНК, транскриптома, метилома и применение биоинформационной стратегии привели к появлению цитогеномики. Огромный поток результатов такого многоуровневого анализа определил необходимость создания информационных ресурсов.

Сведения о различных характеристиках клеточных линий содержатся, в частности, в разделе Cancer Chromosomes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/skyquery.cgi>) информационного ресурса Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), on-line Энциклопедии по опухолевым клеточным линиям человека и животных (<http://www.broadinstitute.org/ccle/home>), на сайте Немецкой коллекции клеточных культур и микроорганизмов (DSMZ, <http://www.dsmz.de/home.html>). Российская коллекция клеточных культур предоставляет сведения о клеточных линиях в Каталоге РККК на сайте ИИЦ РАН (<http://www.cytspb.rssi.ru/>). Вместе с тем, в большинстве информационных ресурсов цитогенетические данные приведены далеко не всегда и часто ограничены кратким описанием кариотипов клеточных линий. В нашем коллективе (28) была предпринята попытка создания варианта базы данных по цитогенетике опухолевых клеточных линий человека "Cytogenetics of Human Tumor Cell Lines", которая также находится на сайте ИИЦ РАН. Этот ресурс требует усовершенствования программного обеспечения и дальнейшего наполнения.

Предполагается, что изучение молекулярных механизмов патогенеза неоплазий как *in vivo*, так и на клеточных линиях, будет способствовать развитию представлений о реализации тканеспецифических механизмов онкогенеза в динамике кариотипа и закономерностях эволюции генома опухолевых клеток *in vitro*. Дальнейшие исследования позволят оценивать область применения клеточных линий опухолевого происхождения как в качестве моделей конкретных типов новообразований человека, так и для решения определенных молекулярно-биологических задач.

Исследование кариотипической изменчивости клеточных линий опухолевого происхождения представляется чрезвычайно важным при мониторинге изменений кариотипа культивируемых стволовых клеток, принимая во внимание возможность их злокачественной трансформации.

### Список литературы

1. **Мамаева С.Е.** Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология, 1996, 38, 8: 787—814.
2. **Полянская Г.Г.** Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях. Успехи совр. биол., 2000, 120: 529-539.
3. **Poljanskaya G.G., Vakhtin Yu.B.** The karyotypic structure of cell populations in vitro as integral system. Цитология, 2003, 45: 115—131.
4. **Мамаева С.Е.** Цитогенетика клеток в культуре. В кн.: «Биология клетки в культуре», Л., изд-во Наука, 1984: 195—234.

5. **Savelyeva L., Mamaeva S.** Heterogeneity and balance of chromosomes in human cell line M-HeLa-76: analysis of 100 karyotypes. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1987, 28, 2: 311—325.
6. **Savelyeva L., Mamaeva S.** Population analysis of karyotypic heterogeneity of the Raji Burkitt lymphoma cell line. Analysis of 100 karyotypes. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1988, 34, 1: 63—75.
7. **Турилова В.И., Смирнова Т.Д.** Кариотипическая изменчивость клеточных линий множественной миеломы человека. *Цитология*, 2012, 54, 8: 621—635.
8. **Ye C.J., Liu G., Bremer S.W., Heng H.H.** The dynamics of cancer chromosomes and genomes. *Cytogenet. Genome Res.*, 2007, 118 (2-4): 237—246.
9. **Nowell P.C.** Clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 1976, 194, 4260: 23—28.
10. **Greaves M.** Cancer stem cells: back to Darwin? *Semin Cancer Biol.*, 2010, 20, 2: 65—70.
11. **Полянская Г.Г.** Кариотипическая изменчивость в клеточных линиях и структура кариотипа. Информационный бюллетень «Клеточные культуры». СПб, изд-во Политехн. ун-та, 2009, 24: 15—24.
12. **Литвинчук Л.Ф., Мамаева С.Е., Ковтунович Н.Г., Пинаев Г.П.** Кариотип постоянных клеточных линий. I. Изменчивость кариотипа клеток M-HeLa при статическом и роллерном способах культивирования. *Цитология*, 1986, 28, 1: 56—62.
13. **Мамаева С.Е., Литвинчук Л.Ф., Пинаев Г.П.** Характеристика кариотипа постоянных клеточных линий. II. Изменчивость и сбалансированность хромосомного набора клеток M-HeLa. *Цитология*, 1986, 28, 2: 193—203.
14. **Gagos S., Iliopoulos D., Tseleni-Balafouta S., Agapitos M., Antachopoulos C., Kostakis A., Karayannakos P., Skalkeas G.** Cell senescence and a mechanism of clonal evolution leading to continuous cell proliferation, loss of heterozygosity, and tumor heterogeneity: studies on two immortal colon cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.*, 1996, 90, 2:157—165.
15. **Roschke A.V., Stover K., Tonon G., Schäffer A.A., Kirsch I.R.** Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. *Neoplasia*, 2002, 4, 1:19—31.
16. **Baronchelli S., Bentivegna A., Redaelli S., Riva G., Butta V., Paoletta L., Isimbaldi G., Miozzo M., Tabano S., Daga A., Marubbi D., Cattaneo M., Biunno I., Dalprà L.** Delineating the cytogenomic and epigenomic landscapes of glioma stem cell lines. *PLoS One*, 2013, 8, 2:e57462. doi: 10.1371/journal.pone.0057462.
17. **Мамаева С.Е., Литвинчук Л.Ф., Пинаев Г.П.** Закономерности кариотипической изменчивости в перевиваемых клеточных линиях человека. *ДАН СССР*, 1983, 270, 2: 456—458.
18. **Roschke A.V, Rozenblum E.** Multi-Layered Cancer Chromosomal Instability Phenotype. *Front Oncol.*, 2013, 3: 302. eCollection 2013.
19. **Tuna M., Knuutila S., Mills G.B.** Uniparental disomy in cancer. *Trends Mol Med.*, 2009, 15, 3: 120-128. doi: 10.1016/j.molmed.2009.01.005.
20. **Lapunzina P., Monk D.** The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer. *Biol Cell.*, 2011,103, 7: 303-317. doi: 10.1042/BC20110013.
21. **MacLeod R.A, Drexler H.G.** Classical and molecular cytogenetic analysis. *Methods Mol Biol.*, 2013, 946, 39-60. doi: 10.1007/978-1-62703-128-8-4.
22. **Grigorova M., Lyman R.C., Caldas C., Edwards P.A.** Chromosome abnormalities in 10 lung cancer cell lines of the NCI-H series analyzed with spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet.*, 2005, 162, 1: 1—9.

23. MacLeod R.A., Nagel S., Scherr M., Schneider B., Dirks W.G., Uphoff C.C., Quentmeier H., Drexler H.G. Human leukemia and lymphoma cell lines as models and resources. *Curr Med Chem.* 2008, 15, 4: 339—359.
24. Knutsen T., Padilla-Nash H.M., Wangsa D., Barenboim-Stapleton L., Camps J., McNeil N., Difilippantonio M.J., Ried T. Definitive molecular cytogenetic characterization of 15 colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, 49, 3: 204—223.
25. Gribble S.M., Roberts I., Grace C., Andrews K.M., Green A.R., Nacheva E.P. Cytogenetics of the chronic myeloid leukemia-derived cell line K562: karyotype clarification by multicolor fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and locus-specific fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2000, 118, 1: 1—8.
26. Яковлева Т.К., Ярцева Н.М., Турилова В.И. Прогрессия кариотипа клеточных линий острого миелобластного лейкоза человека. Информационный бюллетень «Клеточные культуры», СПб, изд-во Политехн. ун-та, 2011, 27: 34—45.
27. Roschke A.V., Tonon G., Gehlhaus K.S., McTyre N., Bussey K.J., Lababidi S., Scudiero D.A., Weinstein J.N., Kirsch I.R. Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. *Cancer Res.*, 2003, 63, 24: 8634—8647.
28. Турилова В.И., Ярцева Н.М., Бикташева Н.П., Бикташев А.Г., Яковлева Т.К. Создание проблемно-ориентированной базы данных по цитогенетике опухолевых клеточных линий человека. Информационный бюллетень «Клеточные культуры», СПб, изд-во Политехн. ун-та, 2007, 22: 33—39.

## **БЫСТРАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ АКТИНОВЫХ МИКРОФИЛАМЕНТОВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ ВНЕШНИХ ИНДУКТОРОВ**

***Д.Е. Бобков***

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [bobkovde@yandex.ru](mailto:bobkovde@yandex.ru)

Обзор посвящён роли актинового цитоскелета в координации проведения внутриклеточных сигналов. При действии на культивируемые немышечные клетки различных биологически активных молекул, таких как ростовые факторы, гормоны и белки внеклеточного матрикса, происходит быстрая реорганизация актинового цитоскелета, которая заключается в частичной или полной разборке актиновых структур с последующим постепенным восстановлением организации цитоскелета. В процессе этой реорганизации можно выделить три последовательные стадии. Первым этапом является ранний клеточный ответ, который включает формирование раффлов и/или микровыростов на периферии клетки. На втором этапе происходит разборка стресс-фибрил и дезорганизация всех типов пучков микрофиламентов, кроме тех, которые находятся в микровыростах. Эти стадии реорганизации системы актиновых микрофиламентов не зависят от типа иммобилизованных лигандов, на которых распластаются клетки. На третьем этапе происходит восстановление

организованной системы пучков микрофиламентов. Этот этап определяется как типом растворимого лиганда, действующего на клетки, так и типом субстрата, на котором клетки распластаны.

**Ключевые слова:** актиновый цитоскелет, малые ГТФ-азы, активные формы кислорода, миозин, тропомиозин, белковые комплексы.

Одним из научных направлений, которыми активно интересовался Георгий Петрович Пинаев в последние годы своей жизни, является изучение той роли, которую играет актиновый цитоскелет в регуляции различных клеточных функций. Исследования актинового цитоскелета культивируемых немышечных клеток являются логичным продолжением более ранних исследований актина в мышечных клетках, начатых Георгием Петровичем в 60-х годах прошлого столетия (1, 2, 3).

В 1970-х годах в ведущих лабораториях мира началось изучение механизмов биологической подвижности немышечных культивируемых клеток. Биохимический анализ белкового состава цитоплазмы выявил наличие в ней типичных сократительных белков — актина, миозина, тропомиозина, альфа-актинина и других. Затем началось интенсивное исследование локализации этих белков в цитоплазме и характера образуемых ими структур при различных функциональных состояниях нормальных и трансформированных клеток. В процессе этих исследований было установлено, что в клетках, выделенных из тканей организма и помещённых в питательные среды, вышеупомянутые белки начинают формировать определённые структуры только после прикрепления клеток к субстрату и распластывания на нём (4, 5).

С помощью методов иммунофлуоресценции с использованием родамин-фаллоидина, специфически окрашивающего фибриллярный актин, а также антител к актин-связывающим белкам, было установлено, что система актин-содержащих микрофиламентов представлена в немышечных клетках в виде нескольких структур с различной пространственной организацией. Выделяют следующие типичные структуры: стресс-фибриллы, сеть актиновых микрофиламентов в ламелле, подмембранный циркулярный тяж микрофиламентов, филоподиальные пучки актиновых филаментов, арки. Формирование этих структур осуществляется с помощью специфических наборов актин-связывающих белков (6).

В ходе дальнейших исследований было обнаружено, что характер пространственной организации цитоскелета отличается у клеток разного происхождения, а также у нормальных и трансформированных клеток одного происхождения. Отсюда было сделано заключение о

том, что помимо двигательной активности, одной из основных функций цитоскелета является поддержание характерной для разных клеток морфологии.

Позднее было обнаружено, что при действии на клетки факторов, разрушающих структуры актина или микротрубочек (цитохалазин Д или циклогексимид), происходит либо изменение реакции клетки на действие внешних лигандов, либо полная остановка проведения сигнала. На основании этих данных было выдвинуто предположение о том, что состояние цитоскелета важно для проведения сигнала с поверхности клетки в ядро и запуска экспрессии генов. Для проверки этого предположения был проведен анализ структурной организации актинового цитоскелета при распластывании одних и тех же клеток на различных иммобилизованных белках. В ходе этого анализа было, в частности, обнаружено, что распластаные на фибронектине клетки эпидермоидной карциномы человека A431 приобретают полигональную форму и в них преобладают стресс-фибриллы. При распластывании на ламинине в этих же клетках образуются ламеллы, заполненные сетью актиновых филаментов, а если использовать в качестве подложки антитела к рецептору эпидермального фактора роста, то это вызывает появление многочисленных филоподий (7).

Для того чтобы установить, зависят ли выявленные различия в морфологии от типа использованных клеток, или она определяется свойствами выбранных лигандов, аналогичные исследования были проведены на разных нормальных и трансформированных клетках. Оказалось, что характер пространственной организации актинового цитоскелета во всех случаях был один и тот же при распластывании клеток на одинаковых субстратах (8). Полученные результаты привели к заключению о том, что организация актинового цитоскелета во многом определяется не происхождением клеток, а типом лиганд-рецепторных взаимодействий, осуществляемых клеткой в условиях конкретного микроокружения. Так, при распластывании на иммобилизованном фибронектине большое количество стресс-фибрилл формируется в клетках различного происхождения, в том числе в трансформированных фибробластах, или, например, в клетках HeLa — эпителиоидной карциномы человека. При этом оставалось неясным, каковы механизмы, определяющие образование различных структур цитоскелета в зависимости от различных субстратов, предъявляемых клеткам.

Приблизительно в то же время другими авторами было продемонстрировано, что формирование различных структур цитоскелета происходит под влиянием разных малых ГТФ-аз. Эти небольшие по размеру белки (20—30 кДа) находятся в одном из двух

конформационных состояний — ассоциированными с ГТФ (активная форма), либо с ГДФ (неактивная форма). В активном состоянии ГТФ-азы взаимодействуют с эффекторным белком до тех пор, пока связанный ГТФ не гидролизуется до ГДФ. Переключение между активным и неактивным состоянием ГТФ-аз находится под контролем специальных факторов: активирующих (фактор обмена гуаниловых нуклеотидов, GEF), инактивирующих (белки активирующие ГТФ-азы, GAP) и ингибиторов обмена гуаниловых нуклеотидов (GDI) (9, 10).

В ходе экспериментов с введением в клетки соответствующих генов было выявлено, что стресс-фибриллы формируются при активации Rho ГТФ-азы, сеть микрофиламентов формируется при активации Rac ГТФ-азы, а филоподиальные пучки образуются при участии Cdc42. Следует подчеркнуть, что данные результаты были получены при культивировании клеток на бессывороточных средах, то есть в таких условиях, в которых у клеток до активации малых ГТФ-аз отсутствовали выраженные структуры актинового цитоскелета (11, 12).

В процессе дальнейших исследований возникло представление, что внешние сигналы не влияют непосредственно на структуры цитоскелета, а передаются сначала в общую интегрирующую систему, основными элементами которой являются малые ГТФ-азы Rho-семейства: белки Rho, Rac и Cdc42. Таким образом, каждый внешний сигнал преобразуется в сумму заданным образом локализованных и активированных ГТФ-аз. ГТФ-азы, в свою очередь, действуют через систему своих эффекторных киназ. Rho, например, действует через киназу ROCK, через которую сигнал передается на актин-связывающие белки, что приводит к образованию специфичных структур актинового цитоскелета. Rac и Cdc42 активируют JNK и p38-MAP-киназные пути, соответственно (13). Следует отметить, что малые ГТФ-азы играют роль также в регуляции клеточного ответа на неспецифические сигналы. Например, было обнаружено, что воздействие 50 мМ этанола на клетки глиомы С6 в короткие сроки (15 мин) приводит к уменьшению количества стресс-фибрилл и снижению уровня экспрессии RhoA и винкулина. При этом системы микротрубочек и промежуточных филаментов не изменяются. Так как было показано, что антиоксиданты предотвращают вызванные этанолом изменения актинового цитоскелета, авторы предположили, что в этом процессе участвуют активные формы кислорода (14).

При сопоставлении характера актиновых структур, образующихся под влиянием различных внешних лигандов и формирующихся при активации малых ГТФ-аз, было выявлено их большое сходство. Так, стало известно, что активация RhoA происходит в культивируемых клетках как под действием белка внеклеточного матрикса фибронектина, так и под действием

растворимого лиганда — лизофосфатидиловой кислоты. В первом случае сигнал поступает в клетку через интегриновые рецепторы, во втором случае — через рецепторы, связанные с G-белками (GPCR), но в обоих случаях это приводит к формированию стресс-фибрилл и фокальных контактов (15). В связи с этими данными было высказано предположение о том, что характерные структуры микрофиламентов, выявленные при взаимодействии вышеупомянутых клеток с внешними иммобилизованными белками, являются результатом активации малых ГТФ-аз.

Для того чтобы проверить это предположение, в нашей лаборатории была проведена обработка клеток, распластанных на белках внеклеточного матрикса, факторами, активирующими малые ГТФ-азы — лизофосфатидиловой кислотой, брадикинином и эпидермальным фактором роста. Исходно предполагали, что в тех клетках, в которых под действием иммобилизованных белков образуются структуры, аналогичные тем, которые возникают под действием активаторов соответствующих ГТФ-аз, никаких изменений в структуре актинового цитоскелета наблюдаться не должно. В остальных случаях обработка факторами, активирующими ГТФ-азы, должна была приводить к изменению существующей структуры актинового цитоскелета. Однако в процессе проведённых экспериментов были получены неожиданные и необъяснимые результаты. Оказалось, что под действием всех использованных факторов происходила сначала разборка цитоскелета, а затем его восстановление. При этом в клетках с изначально слабо выраженной системой актинового цитоскелета, например, в клетках линий A431 или 293, можно было наблюдать практически полную разборку цитоскелета, а в клетках с сильно развитой цитоскелетной системой, например в нормальных фибробластах, происходила лишь частичная разборка цитоскелета. Следует отметить, что этот процесс протекает достаточно быстро, разборка цитоскелета наблюдается уже через 10 мин после добавления лиганда, а примерно через час цитоскелет восстанавливается. При дальнейшем изучении было обнаружено, что явление разборки цитоскелета с последующим восстановлением происходит не только при использовании активаторов малых ГТФ-аз, но и при действии на клетки широкого спектра других агентов, вызывающих различные сигнальные события.

В связи с тем, что сходные перестройки цитоскелета происходят при действии на клетки любых внешних факторов, индуцирующих сигнальные процессы, возникло предположение о существовании единого универсального механизма, приводящего к запуску процесса быстрой разборки цитоскелета. Поскольку известно, что активные формы кислорода (АФК) подавляют

процесс полимеризации актина (16, 17), то возникло предположение, что таким возможным универсальным механизмом регуляции процесса разборки актинового цитоскелета может быть изменение внутриклеточного уровня АФК. Для проверки этого предположения нами был проведён анализ содержания АФК в клетках при действии сигнальных факторов, вызывающих реорганизацию актинового цитоскелета. В ходе измерений уровня АФК в клетке с помощью флуоресцентного зонда на сроках, соответствующих основным стадиям реорганизации цитоскелета, было обнаружено, что через 10 мин после стимуляции клеток одновременно с разборкой актинового цитоскелета наблюдалось увеличение уровня АФК. Затем, через 30 мин этот уровень снижался, и одновременно наблюдалась сборка актинового цитоскелета. Обработка клеток A431 антиоксидантом окситиазолидином (предшественник синтеза глутатиона) приводила к снижению уровня АФК в клетках и одновременно к подавлению разборки цитоскелета в ответ на действие LPA.

В клетках млекопитающих несколько ферментативных систем (ксантиноксидаза, NADPH-оксидаза, циклоксигеназа и др.) продуцируют супероксид (ион молекулы кислорода с неспаренным электроном), который спонтанно или под действием супероксиддисмутазы превращается в перекись водорода ( $H_2O_2$ ). При повышенном образовании в клетке  $H_2O_2$  вызывает оксидативный стресс, тогда как в субтоксических концентрациях  $H_2O_2$  может служить внутриклеточным мессенджером. Показано, что во многих клеточных линиях  $H_2O_2$  образуется в ответ на различные внеклеточные сигналы, включая цитокины (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL), пептидные ростовые факторы (PDGF, EGF, VEGF, bFGF и инсулин) и агонисты рецепторов, связанных с тримерными G-белками (GPCR) — ангиотензин II, тромбин, лизофосфатидиловая кислота, гистамин, брадикинин (18).

Все имеющиеся на сегодняшний день данные говорят о том, что активные формы кислорода могут являться одним из важнейших регуляторов динамики актинового цитоскелета, а следовательно и многих клеточных процессов, так или иначе связанных с системой микрофиламентов. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе перестроек актинового цитоскелета в ответ на появление АФК, полностью не ясны.

Таким образом, при изменении микроокружения в ходе культивирования клеток, в том числе при действии на культивируемые немышечные клетки различных биологически активных молекул, таких как ростовые факторы, гормоны и белки внеклеточного матрикса, происходит быстрая реорганизация актинового цитоскелета. Она заключается в частичной или полной разборке системы актиновых микрофиламентов с последующим постепенным их

восстановлением. Следует подчеркнуть, что быстрая разборка цитоскелета является универсальным ответом клетки на широкий ряд стимулов, при этом вновь образующиеся актиновые структуры специфичны для различных лигандов.

Специфичность вновь образуемых структур актинового цитоскелета определяется набором актин-связывающих белков, взаимодействующих друг с другом и с цитоскелетными структурами. В немышечных клетках в состав микрофиламентов входит большое число актин-связывающих белков. Эти белки могут участвовать в регуляции полимеризации/деполимеризации актина или в реорганизации актиновых структур. Большинство белков, образующих сшивки между F-актиновыми фибриллами, включают актин-связывающий кальпонин-подобный домен. Некоторые из них являются белками с мультидоменной организацией и содержат большое число участков связывания с другими цитоскелетными или сигнальными молекулами. Такие белки рассматриваются как скаффолды, то есть структурная основа, на которой собираются другие цитоскелетные, адапторные, моторные и сигнальные белки, а также транскрипционные факторы и белки теплового шока. Такие белки-скаффолды, как например филламин А, в определённых условиях подвергаются протеолизу и продукты их деградации могут играть роль сигнальных молекул, принимая участие в ядерных и цитоплазматических путях передачи сигнала. Считается, что протеолиз скаффолдов может быть одним из основных механизмов, интегрирующих сигнальные пути в клетке. Образующиеся фрагменты называют SIPP (протеолитический пептид, интегрирующий сигналы), и их возникновение может регулироваться процессами фосфорилирования/дефосфорилирования разрезаемых белков (19). Другими примерами скаффолдов могут быть плектин, спектрин или альфа-актинин-4.

Однако роль актин-связывающих белков не ограничена, судя по всему, непосредственным участием в организации структур актинового цитоскелета. При анализе структурных перестроек актинового цитоскелета культивируемых клеток было обнаружено, что некоторые актин-связывающие белки, такие как тропомиозин или альфа-актинин-4, также могут существовать в цитоплазме в виде независимых от структур цитоскелета частиц (мультимолекулярных белковых комплексов) (20). Такие комплексы были выделены в нашей лаборатории из цитоплазмы клеток A431, очищены с помощью гель-хроматографии и проанализированы. При этом с помощью масс-спектрометрии было обнаружено, что в состав цитоплазматического комплекса с альфа-актинином-4 входят такие белки как плектин, спектрин, миозин-9,  $\beta$ -актин, тубулин, БТШ70, БТШ90, p65 субъединица транскрипционного

фактора NF-κB. Было продемонстрировано, что состав этих комплексов может быстро (в течение 10 мин) изменяться при действии на клетки эпидермального фактора роста или фактора некроза опухоли-α (21, 22). Плектин, спектрин и альфа-актинин-4 участвуют в структурной организации цитоскелета, в частности, в организации стресс-фибрилл, фокальных контактов и подмембранной сети актиновых филаментов, и, являясь мультидоменными белками, выступают в роли скаффолдов при образовании цитоплазматических белковых комплексов (23, 24). Система шаперонов БТШ70/БТШ90 видимо способствует стабильности мультимолекулярных комплексов. Миозин-9 является моторным белком с сигнальными функциями, в его хвостовом участке содержится GAP-домен, для которого была показана способность ингибировать Rho (25, 26). В ходе экспериментов с помощью прижизненной микроскопии было выявлено, что миозин-9 привлекается в клетке к местам, где происходит активная полимеризация актина — ламеллоподиям, раффлам и филоподиям (27). Не исключено, что миозин-9 принимает участие в транспорте компонентов этого мультибелкового комплекса в определённые клеточные компартменты. Ранее было показано, что альфа-актинин-4 и p65 субъединица транскрипционного фактора NF-κB совместно локализуются и мигрируют в ядро при действии эпидермального фактора роста на клетки A431 (28). Известно, что активность NF-κB в ядре изменяется циклически в процессе распластывания клеток и соотносится со стадиями формирования актинового цитоскелета (29). Следует подчеркнуть, что хотя миграция p65 в ядро и является хорошо известным фактом, конкретные механизмы транспорта до сих пор неизвестны.

Из эмбриональных фибробластов крысы с помощью гель-фильтрации и моноклональных антител были выделены цитоплазматические комплексы, содержащие высокомолекулярные изоформы тропомиозина (HMW TM). TM — это актин-связывающий белок, стабилизирующий F-актин. В составе этого комплекса, помимо HMW TM и актина, были идентифицированы белки миозин-9, БТШ70, БТШ90. Было показано, что HMW TM перераспределяются из цитоплазматических комплексов на цитоскелетные структуры под действием агента, вызывающего гиперацетилирование внутриклеточных белков — трихостатина А (30). Эти данные позволяют предполагать, что в регуляции состава этих и подобных комплексов могут принимать участие вторичные модификации вовлеченных белков.

Поскольку состав таких цитоплазматических комплексов, включающих скаффолды, актин-связывающие, моторные, сигнальные белки и транскрипционные факторы, может быстро

изменяться после действия на клетку агентов, вызывающих запуск сигнальных каскадов и быструю реорганизацию актинового цитоскелета, то можно предположить, что перечисленные выше комплексы принимают непосредственное участие в регуляции этой реорганизации. Они могут делать это либо за счет запасания, транспортировки и высвобождения структурных компонентов цитоскелета, либо с помощью воздействия на компоненты сигнальных каскадов. В целом, если рассматривать весь цитоскелет как основу для сборки комплексов сигнальных молекул, то наблюдаемая реорганизация актиновых структур может быть необходимым условием для замещения этих комплексов на другие в соответствии с вновь поступившим сигналом об изменении текущего микроокружения. Кроме того, известно, что при полимеризации актина больше всего времени требует стадия нуклеации, на которой образуются зачатки будущих структур. Поэтому наличие подобных зачатков в цитоплазме может способствовать процессу быстрой реорганизации структур цитоскелета.

Таким образом, организация актинового цитоскелета культивируемых клеток зависит от сложной комбинации биологически активных молекул, взаимодействующих с поверхностными рецепторами. В культивируемых клетках цитоскелет формируется в процессе распластывания на субстрате и может зависеть от природы субстрата, от состава питательной среды, плотности культуры и прочих факторов. Актин и актин-связывающие белки, локализуясь во всех компартментах клетки, представляют собой универсальную структурно-регуляторную систему, объединяющую на единой молекулярной основе различные сигнальные каскады и способную быстро реагировать в ответ на изменения клеточного микроокружения.

### Список литературы

1. **Пинаев Г.П.** Структурные изменения актомиозиновых частиц скелетных мышц в онтогенезе. Биохимия, 1964, 30(1): 20—32.
2. **Пинаев Г.П., Хайтлина С.Ю.** Изменение формы и размера частиц актина в онтогенезе. Журн. эволюц. биохим. физиол., 1972, 4(4): 369—374.
3. **Пинаев Г.П.** Сократительные системы клетки: от мышечного сокращения к регуляции клеточных функций. Цитология, 2009, 51(3): 172—181.
4. **Lazarides E.** Immunofluorescence studies on the structure of actin filaments in tissue culture cells. J. Histochem. Cytochem., 1975, 23(7): 507—528.
5. **Pollard T.D., Wehling R.R.** Actin and myosin and cell movement. CRC Crit. Rev. Biochem., 1974, 2(1): 1—65.
6. **Winder S.J., Ayscough K.R.** Actin-binding proteins. Journal of Cell Science, 2005, 118: 651—654.

7. **Are A., Pinaev G., Burova E., Lindberg U.** Attachment of A-431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. *Cell motility and the cytoskeleton*, 2001, 48(1): 24—36.

8. **Арэ А.Ф., Поспелова Т.В., Пинаев Г.П.** Особенности структурной организации актинового цитоскелета нормальных, иммортализованных и трансформированных фибробластов крысы и ее изменения под влиянием белков внеклеточного матрикса. *Цитология*, 1999, 41(8): 707—715.

9. **Etienne-Manneville S., Hall A.** Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 2002, 420: 629—635.

10. **Burridge K., Wennerberg K.** Rho and Rac Take Center Stage. *Cell*, 2004, 116: 167—179.

11. **Bishop L., Hall A.** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.*, 2000, 348: 241—255.

12. **Ridley A.** Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.*, 2001, 114: 2713—2722.

13. **Kjoller L., Hall A.** Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res.*, 1999, 253(1): 166—179.

14. **Loureiro S.O., Heimfarth L., Reis K., Wild L., Andrade C., Guma F.T., Gonçalves C.R., Pessoa-Pureur R.** Acute ethanol exposure disrupts actin cytoskeleton and generates reactive oxygen species in C6 cells. *Toxicology in vitro*, 2011, 25(1): 28—36.

15. **Bourdoulous S., Orend G., MacKenna D.A., Pasqualini R., Ruoslahti E.** Fibronectin matrix regulates activation of Rho and Cdc42 GTPases and cell cycle progression. *The Journal of Cell Biology*, 1998, 143(1): 267—276.

16. **Rhee S.G., Chang T.-S., Bae Y.S., Lee S.-R., Kang S.W.** Cellular Regulation by Hydrogen Peroxide. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003, 14: 211—215.

17. **Lassing I., Schmitzberger F., Björnstedt M., Holmgren A., Nordlund P., Schutt C.E., Lindberg U.** Molecular and structural basis for redox regulation of beta-actin. *J. Mol. Biol.*, 2007, 370(2): 331—348.

18. **Dalle-Donne I., Rossi R., Milzani A., Di Simplicio P., Colombo R.** The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, 31(12): 1624—1632.

19. **Uribe R., Jay D.** A review of actin binding proteins: new perspectives. *Mol. Biol. Rep.*, 2009, 36: 121—125.

20. **Grenklo S., Hillberg L., Rathje L.-S.Z., Pinaev G., Schutt C.E., Lindberg U.** Tropomyosin assembly intermediates in the control of microfilament system turnover. 2008. *European Journal of Cell Biology*. 87: 905—920.

21. **Bolshakova A., Petukhova O., Turoverova L., Tentler D., Babakov V., Magnusson K.-E., Pinaev G.** Extra-cellular matrix proteins induce re-distribution of alpha-actinin-1 and alpha-actinin-4 in A431 cells. *Cell biology international*, 2007, 31(4): 360—365.

22. **Бобков Д.Е., Кропачёва И.В., Пинаев Г.П.** Мультимолекулярные комплексы, содержащие р65 субъединицу фактора NF-κB и белки цитоскелета в клетках A431. *Биологические мембраны*, 2010, 27(1): 133—137.

23. **Broderick M.J.F., Winder S.J.** Towards a complete atomic structure of spectrin family proteins. *Journal of Structural Biology*, 2002, 137: 184—193.

24. **Andra K., Nikolic B., Stocher M., Drenckhahn D., Wiche G.** Not just scaffolding: plectin regulates actin dynamics in cultured cells. *Genes Dev*, 1998, 12: 3442—3451.

25. **Post P.L., Bokoch G.M., Mooseker M.S.** Human myosin-IXb is a mechanochemically active motor and a GAP for rho. *J. Cell. Sci.*, 1998, 7: 941—950.

26. **Bähler M.** Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules? *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000, 1496(1): 52—59.

27. **van den Boom F., Düssmann H., Uhlenbrock K., Abouhamed M., Bähler M.** The Myosin IXb motor activity targets the myosin IXb RhoGAP domain as cargo to sites of actin polymerization. *Mol. Biol. Cell*, 2007, 18(4): 1507—1518.

28. **Бабаков В.Н., Бобков Д.Е., Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева И.В., Подольская Е.П., Пинаев Г.П.** Альфа-актинин-4 и субъединица p65/RelA транскрипционного фактора NF-κB в клетках A431 локализуются совместно и мигрируют в ядро при действии эпидермального фактора роста. *Цитология*, 2004, 46(12): 1065—1073.

29. **Емельянов А.Н., Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева И.В., Пинаев Г.П.** Динамика ДНК-связывающей активности факторов транскрипции в процессе распластывания клеток A431 на иммобилизованных лигандах. *Цитология*, 2006, 48(11): 935—946.

30. **Бобков Д.Е., Айзенштадт А.А., Кропачёва И.В., Пинаев Г.П.** Выделение и анализ состава цитозольных белковых комплексов, содержащих тропомиозин. *Цитология*, 2012, 54(1): 33—43.

## **ИНФОРМАЦИЯ АССОЦИАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ**

1. В декабре 2013-го года на общем собрании членов Ассоциации специалистов по клеточным культурам (АСКК) в связи со смертью Президента АСКК Г.П. Пинаева состоялись выборы Президента АСКК и Правления. Собрание постановило:

- избрать Президентом АСКК Г.Г. Полянскую на четыре года — до 2018 г.;
- избрать Вице-президентом АСКК М.И. Блинову на срок до 2018 г.;
- продлить действие полномочий: Ученого секретаря АСКК М.С. Богдановой и Казначей АСКК А.И. Гусевой на срок до 2018 г.;
- избрать членами Правления АСКК: Г.Г. Полянскую, М.И. Блинову, М.С. Богданову, А.И. Гусеву, В.М. Семенову, А.М. Кольцову, Д.Е. Бобкова..

Правление АСКК обращается с просьбой ко всем членам ассоциации в случае изменений их реквизитов (служебных и домашних адресов, телефонов, электронной почты) своевременно сообщать об этом секретарю АСКК.

3. Последний Президент Европейского общества тканевых культур Dr. J. Masters на запрос секретаря АСКК прислал сообщение о том, что **Европейское общество тканевых культур больше не существует.**

## 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 публикуются только после получения положительных рецензий.

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

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

**Тел.: (812) 297-44-20, 8-911-284-28-64; факс: (812) 297-03-41, 297-42-96;**

**Электронный адрес: [msb2051@rambler.ru](mailto:msb2051@rambler.ru)**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Блинова М.И.</b> Вехи творческого пути Георгия Петровича Пинаева.....	5
<b>Семенова В.М.</b> Профессор Георгий Петрович Пинаев. Страницы памяти.....	8
<b>Петухова О.А.</b> Беломорская экспедиция: наука и жизнь.....	12
<b>Полянская Г.Г.</b> Характеристики новых клеточных линий, полученных в Коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН в 2011—2013 гг.....	22
<b>Кузовкина И.Н., Прокофьева М.Ю.</b> Использование объектов Коллекции генетически трансформированных корней растений в фундаментальных и прикладных исследованиях.....	33
<b>Гальнбек Т.В., Акиншина Г.Т., Кулешов К.В.</b> Итоги и перспективы развития Коллекции культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных.....	42
<b>Сайфутдинова З.Н., Васильев В.А.</b> О Коллекции постоянных линий клеток беспозвоночных.....	47
<b>Глинских Н.П., Бахарев А.А., Устьянцев И.В.</b> История и перспективы развития Коллекции перевиваемых клеток позвоночных медицинского назначения.....	51
<b>Подчерняева Р.Я., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Лопатина О.А., Михайлова Г.Р., Петрачев А.Д., Потапова Л.А., Бакланова О.В., Фирсова Е.Л., Гринкевич О.М., Притчина Т.Н., Щетвин М.Н., Руссу Л.И.</b> Применение культур клеток для вирусологических исследований.....	56
<b>Семенова В.М.</b> Основные направления исследований Лаборатории культивирования тканей Института нейрохирургии.....	71
<b>Турилова В.И., Яковлева Т.К.</b> Цитогенетика клеточных линий опухолевого происхождения.....	78
<b>Бобков Д.Е.</b> Быстрая реорганизация системы актиновых микрофиламентов культивируемых клеток под влиянием внешних индукторов.....	86

<b>Информация Ассоциации специалистов по клеточным культурам.....</b>	<b>96</b>
<b>Правила для авторов.....</b>	<b>97</b>