# 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

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, архитектоника 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 нейропатоморфологии 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 нейроклеток, 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 нейроцитами 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 α-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 нейрогеля 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 потенциала 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 онкологи 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 – нейрохирургия. 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., Лисяный 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., Лисяный 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., Лісяний О.М., Тормасова А.І., Стайно Л.П.** Дослідження протипухлинної дії імуномоделюючого препарату галавіт. Укр.нейрохірург.журнал, 2007, 1: 32—36.

21. **Лісяний М.І., Бєльська 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 периферічної крові. Проб.кріобіології, 2008, 4: 441—443.

22. **Семенова В.М., Цимбалюк 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

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