

АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ISSN 2077-6055

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЮЛЛЕТЕНЬ

ВЫПУСК 31

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2015

Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 31.

Отв. ред. М.С. Богданова. - СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2015. – 81 с.

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

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

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, 2015

© Составление. Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН, 2015

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СУПЕРНАТАНТА НЕЙРОГЕННЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ И ПРЕПАРАТА ГАЛАВИТ НА КУЛЬТУРЫ ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА

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

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

seveme22@rambler.ru

Лечение больных со злокачественными глиомами головного мозга остается одной из нерешенных и актуальных проблем современной нейроонкологии. Одним из направлений, активно разрабатываемых для оптимизации лечения этих больных, является поиск препаратов, способных стимулировать противоопухолевый иммунитет и тормозить пролиферацию опухоли.

Целью работы является сравнительная оценка эффекта воздействия супернатанта прогениторных нейроцитов (СНК) из фетального мозга крысы 14-х суток гестации и иммуномодулятора с противоопухолевыми свойствами галавита на клетки глиобластом человека в первичных суспензионных и диссоциированных культурах.

СНК или галавит добавляли к суспензии клеток из образцов опухоли (глиобластомы человека, n=14). Через 24 ч инкубации суспензионных культур с препаратом определяли количество жизнеспособных клеток, цитотоксический индекс (ЦИ), количество апоптических клеток (PI+, CD95+), экспрессию антигенов CD25, HLA-ABC HLA-DR. СНК или галавит добавляли также в диссоциированные культуры глиобластом человека. Через 24 и 48 ч инкубации анализировали цитологические препараты культур с учетом митотического индекса (МИ).

В суспензионных культурах глиобластом установлен дозозависимый цитотоксический эффект воздействия СНК и галавита на 50–70% образцов из ткани глиобластом. Под влиянием СНК и галавита наблюдалась также тенденция к нарастанию популяции клеток в терминальной стадии апоптоза (PI+) и увеличению количества CD95+ клеток (несущих FAS-рецептор апоптоза), что может указывать на проапоптотическое влияние этих препаратов на клетки злокачественных глиом.

В диссоциированных культурах глиобластом после инкубации с СНК и галавитом наблюдались признаки дозозависимого цитотоксического воздействия этих препаратов (ретракция и разрежение зоны роста, дистрофия, некробиоз опухолевых клеток, достоверное снижение МИ), нарастающие при увеличении длительности инкубации культур с препаратом.

Таким образом, показано, что СНК из фетального мозга крысы и иммуномодуляторный препарат галавит оказывают сходный цитотоксический эффект при воздействии на опухолевые клетки глиобластом человека в первичных суспензионных и диссоциированных культурах.

Ключевые слова: супернатант нейрогенных клеток крысы, галавит, первичные культуры глиобластом человека, цитотоксический индекс, митотический индекс.

Лечение больных со злокачественными глиомами головного мозга остается одной из нерешенных и актуальных проблем современной нейроонкологии. Одним из направлений, активно разрабатываемых для оптимизации лечения этих больных, является поиск препаратов, направленных на стимуляцию противоопухолевого иммунитета и торможение пролиферации опухолей.

Актуальным подходом в противоопухолевой терапии злокачественных глиом головного мозга является использование нейральных прогениторных клеток (НПК) и их продуктов, которые, как известно, могут проявлять противоопухолевые свойства [1–3]. В предыдущих исследованиях установлено противоопухолевое воздействие супернатанта нейрогенных прогениторных клеток крысы (СНК) на первичные диссоциированные культуры глиом человека [4], а также на ткань перививной злокачественной глиомы 101.8А головного мозга крыс [5].

Целью данной работы является сравнительная оценка воздействия супернатанта прогениторных нейроцитов (СНК) крысы 14-х суток гестации (Е14) и препарата галавит на клетки глиобластом человека в первичных суспензионных и диссоциированных культурах. Медикаментозный препарат галавит (5-амино-1,2,3,4-тетрагидрофталазин-1,4-диенонатриевая соль) обладает противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами и широко используется в общей онкологии [6, 7]. В работе Л.И. Примушко с соавторами [8] показано, что галавит может оказывать также прямое цитотоксическое и антипролиферативное воздействие на клетки злокачественных глиом *in vitro*.

Материал и методы

Материалом для культивирования служили фрагменты глиобластом головного мозга, удаленных у больных во время оперативного вмешательства (n=14). Гистологическая верификация диагноза у больных проведена согласно Международной классификации опухолей ЦНС [9]. СНК получали из ткани фетального мозга крыс 14-х суток гестации [4]. Нативную ткань мозга в физиологическом растворе освобождали от оболочек, переносили в среду DMEM (Sigma, Германия) и механически диссоциировали многократным

пипетированием. Жизнеспособность клеток в суспензии определяли в стандартном цитотоксическом тесте с 0,2% трипановым синим (Merch, Германия). К полученной клеточной суспензии (концентрация $6,0 \times 10^6$ клеток/мл) добавляли конканавалин А (10 мкг/мл) и инкубировали 2 ч в CO₂-инкубаторе при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и постоянной влажности 95% и 5% CO₂. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, отмывали в среде DMEM, добавляли свежую среду DMEM и инкубировали в тех же условиях в течение 24 час. После инкубации клетки вторично осаждали центрифугированием 5 мин при 1500 об/мин, отбирали супернатант, определяли в нем концентрацию белка, стандартизировали до концентрации 0,1 мг/мл, аликвотировали и сохраняли при температуре $-20 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Получение первичных суспензионных культур глиобластом. Ткань опухоли, доставленную из операционной, промывали в растворе CMF («Sigma», Германия), освобождали от сосудов и оболочек, измельчали микроножницами в CMF и механически диссоциировали многократным пипетированием. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, отмывали в среде DMEM, к осадку клеток добавляли свежую среду DMEM и ресуспендировали. Жизнеспособность клеток в суспензиях определяли в стандартном цитотоксическом тесте с 0,2% трипановым синим (Merch, Германия) [10].

Изучение воздействия препаратов в суспензионных культурах глиобластом. Препарат СНК и галавит (ЗАТ «ЦСМ «МЕДИКОР», Москва, РФ) в концентрациях 0,02 и 0,10 мг/мл добавляли к суспензии свежeweыделенных клеток ($2,0 \times 10^6$), которые в объеме 2 мл среды инкубировали в стеклянных биологически инертных центрифужных пробирках при периодическом встряхивании в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе при температуре $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, постоянной влажности 95% и 5% CO₂. Выбор таких концентраций препаратов базировался на результатах предыдущих исследований, в которых был установлен цитотоксический эффект СНК и галавита на клетки опухолей головного мозга в этих концентрациях [4, 8]. До и после инкубации с препаратом в суспензии определяли содержание жизнеспособных клеток, апоптических клеток (PI+, CD95+ -клеток) и экспрессию антигенов CD25, HLA-ABC HLA-DR.

Цитотоксическое воздействие СНК и галавита на опухолевые клетки оценивали путем подсчета жизнеспособных клеток в камере Горяева до и после их инкубации с препаратом и вычисляли по формуле цитотоксический индекс (ЦИ) [8]:

$$\text{ЦИ} = \frac{\text{ЖКи} - \text{ЖКи} + \text{П}}{\text{ЖКи}} \times 100\%$$
 где ЖКи - количество жизнеспособных клеток в исходной суспензии, ЖКи+П - количество жизнеспособных клеток в суспензии после инкубации с препаратом (СНК или галавитом).

Апоптотические PI+клетки определяли с помощью цитофлуориметрического метода с использованием пропидиума йодида (PI) (0,05 мг/мл) согласно рекомендациям Пинегина [11].

Экспрессию антигенов CD25 (альфа-цепь рецептора к IL-2), CD95 (FAS-рецептор), HLA-ABC и HLA-DR (антигены гистосовместимости I и II класса) на опухолевых клетках определяли с помощью непрямого иммунофлуоресцентного метода с использованием моноклональных антител (ТОВ «Сорбент», Москва, РФ). Эти показатели анализировали до и после инкубации культур с препаратами на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (США) согласно рекомендациям Пинегина [11].

Первичные диссоциированные культуры глиобластом получали по протоколу, представленному в книге Божкова с соавт. [10]. Ткань опухоли освобождали от сосудов и оболочек, измельчали микроножницами в растворе CMF и механически диссоциировали многократным пипетированием. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, отмывали в среде DMEM, к осадку клеток добавляли свежую среду DMEM и ресуспендировали. Свежевыделенные клетки в количестве 1×10^6 наносили на покровные адгезивные стекла, покрытые полиэтиленимином (Sigma, Германия) и помещенные в чашки Петри, и культивировали в среде 199 и DMEM (1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 400 мг глюкозы и 0,2 ед/мл инсулина (объем питательной среды составлял 2 мл). Культуры клеток содержали в CO₂-инкубаторе (37°C, 95% влажности и 5% CO₂) и прижизненно наблюдали в инвертированном микроскопе (Биолам П-3, ЛОМО, СПб).

Изучение воздействия препаратов в диссоциированных культурах глиобластом. Для исследования отбирали культуры с равномерной зоной роста (на 6–8-е сут), добавляли препарат (СНК или галавит, 0,02 и 0,10 мг/мл) и инкубировали в течение 24 и 48 ч. В каждом случае анализировали контрольные и опытные культуры (без добавления препарата и после 24 и 48 ч инкубации с препаратом). Для морфологического исследования культуры фиксировали 10% формалином, окрашивали гематоксилином Караччи. Микроскопическое исследование и фотодокументирование цитологических препаратов культур проводили на светооптическом фотомикроскопе Axiophot (“OPTON”, Германия) с объект-микрометром (“Carl Zeiss”, Германия), аттестованном для калибровки увеличения изображений при морфометрических исследованиях (объектив X40, окуляр X10, переходник X2). В

сравнительном аспекте в опытных и контрольных культурах анализировали общую архитектуру зоны роста, фенотипические особенности опухолевых клеток, митотическую активность, а также содержание клеток с признаками цитотоксического повреждения. Митотический индекс (МИ) определяли путем подсчета митозов в 3-х наблюдениях каждого образца в 10 случайно выбранных полях зрения микроскопа (X400). В каждом препарате подсчитывали 1000 клеток. МИ высчитывали по формуле:

$$\text{МИ} = \frac{\text{количество делящихся клеток}}{1000} \times 100 \%$$

Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием пакета программ "Statistica 6,0". Статистическую значимость отличий оценивали с помощью критерия Краскела-Уоллиса и U-критерия Манна-Уитни, значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке характера воздействия тестируемых препаратов на опухолевые клетки глиобластом в суспензионных культурах установлено, что с повышением концентрации СНК с 0,02 до 0,10 мг/мл наблюдалось увеличение доли образцов глиобластом (с 50,0% до 66,7%), в которых регистрировались признаки цитотоксического воздействия СНК на опухолевые клетки. Однако значимых различий в зависимости от концентрации препарата между средними показателями ЦИ не выявлено: ЦИ составлял 25,8–33,6% (рис. 1). Более существенными оказались индивидуальные различия ЦИ в исследованных образцах глиобластом с колебаниями в пределах от 8,2 до 65,5%. В части образцов глиобластом обнаружено отсутствие цитотоксического эффекта, из них в 50,0% – при тестировании концентрации СНК 0,02 мг/мл, в 33,3% – при тестировании СНК 0,10 мг/мл соответственно.

При тестировании галавита в суспензионных культурах его цитотоксическое воздействие в обеих исследованных концентрациях обнаружено в среднем в 70% образцов опухолей с колебаниями ЦИ от 13,3 до 82,7%. При этом средние значения ЦИ при воздействии галавита в концентрациях 0,02 и 0,10 мг/мл составили 28,3 и 43,0% соответственно (рис.1). В 30% суспензионных культур клетки глиобластом оказались нечувствительными к воздействию галавита в обеих концентрациях. При суммарной оценке статистически значимых различий между средними показателями цитотоксичности СНК и галавита в суспензионных культурах глиобластом не выявлено (по данным множественных сравнений с использованием критерия

Краскела-Уоллиса и сравнений независимых групп с использованием U-критерия Манна-Уитни).

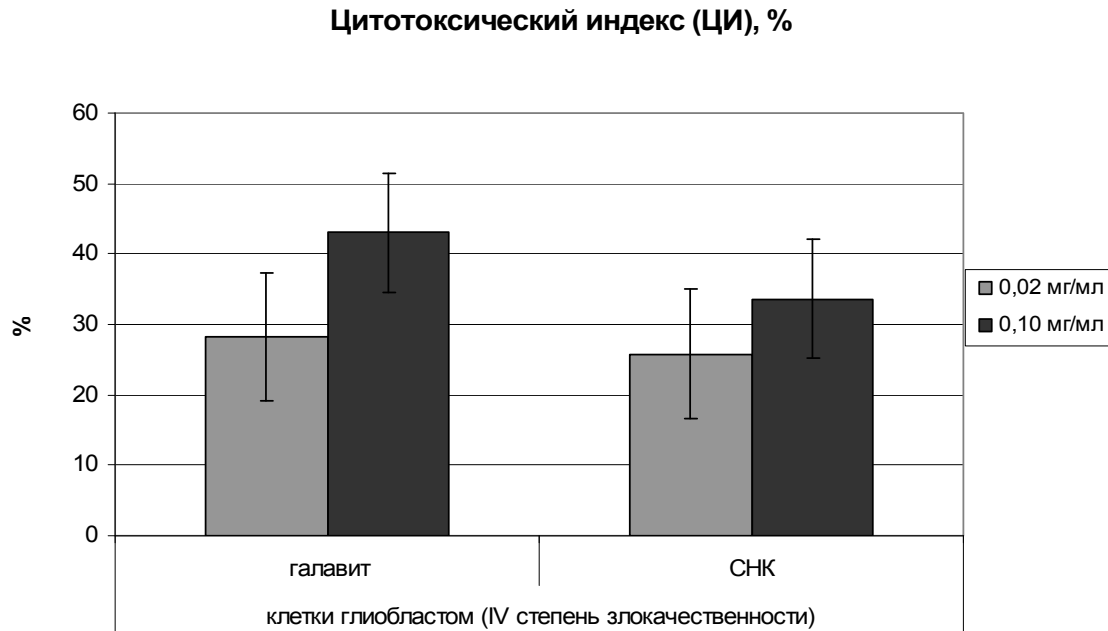


Рис.1. Цитотоксическое влияние галавита и СНК крысы на клетки глиобластом. По оси ординат представлены значения цитотоксического индекса в процентах.

В то же время в суспензионных культурах глиобластом оба тестируемых препарата (СНК и галавит) проявляли тенденцию к проапоптотическому воздействию, поскольку под влиянием обоих препаратов в клеточной суспензии увеличивалось количество PI+ клеток (в среднем на 2–6%) и доли CD95+ клеток (в среднем на 2–3 %) (рис.2).

Как известно, экспрессия CD95+ свидетельствует лишь о готовности к апоптозу, а пропидиум йодид (PI) выявляет гиподиплоидные клетки на терминальных стадиях апоптоза и некробиоза клеток при частичной утрате ДНК [11]. Таким образом, оба исследованных препарата демонстрировали тенденцию к проапоптотическому влиянию на клетки глиобластом, увеличивая количество CD95+ клеток, несущих FAS-рецептор, отражающий готовность к апоптозу, и PI+ клеток в терминальной стадии апоптоза.

Под влиянием СНК прослеживалась также тенденция к дозозависимому увеличению содержания CD25+ клеток, несущих альфа-цепь рецептора IL-2 (IL-2RA), по мере возрастания концентрации СНК (рис.2). Под влиянием галавита (0,10 мг/мл) количество CD25+ клеток в суспензионных культурах глиобластом также возрастало. Такое нарастание доли клеток,

экспрессирующих CD25, в культурах глиобластом, может иметь неоднозначную трактовку. С одной стороны, экспрессия IL-2RA отражает активированное состояние клеток и их способность пролиферировать в ответ на стимул от IL-2. С другой стороны, IL-2RA является одним из 8 генов с иммунной функцией, ассоциированных с клетками глиобластомы [12].

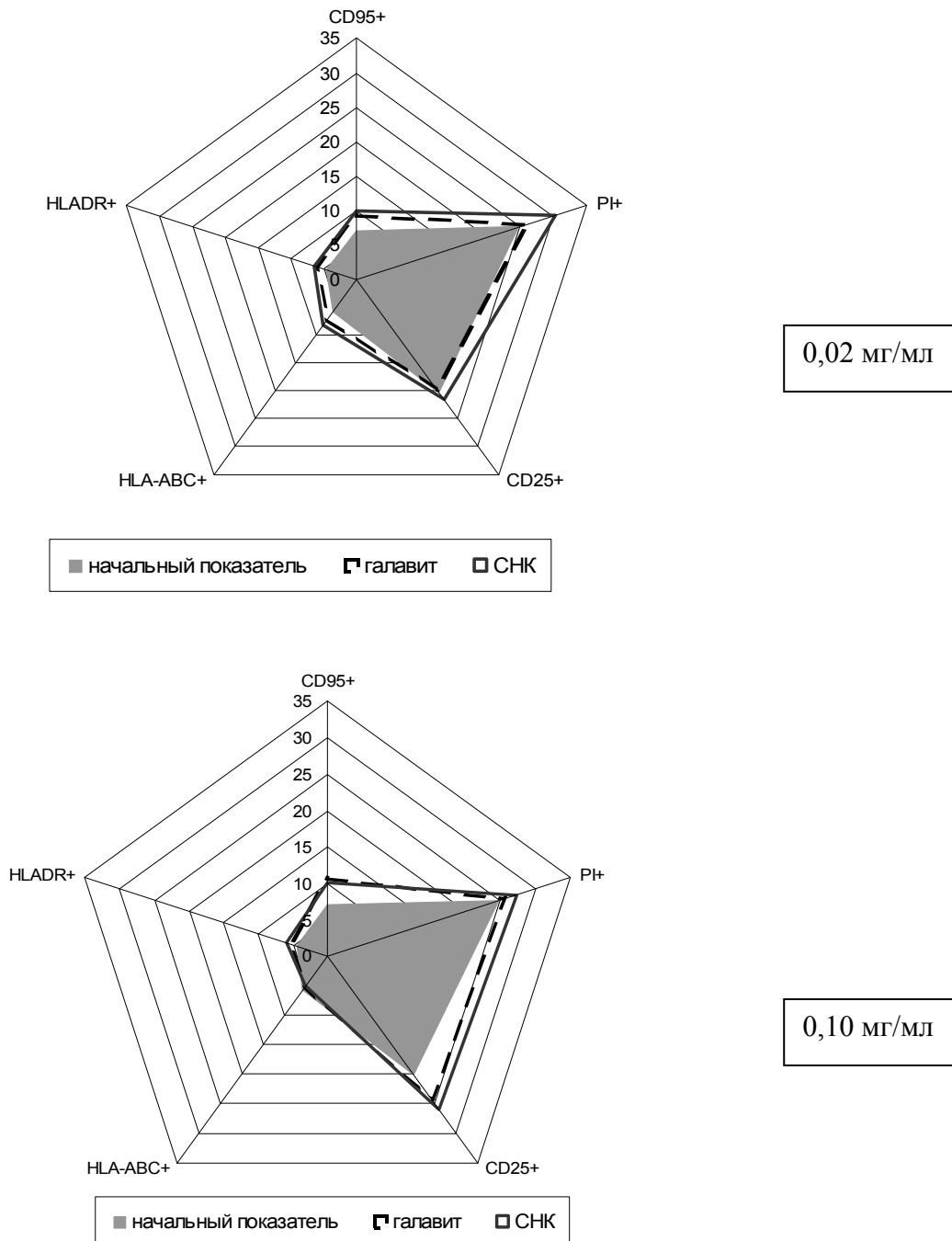


Рис. 2. Соотношение изученных маркеров на клетках глиобластом (%).

В наших опытах установлено также, что под влиянием обоих препаратов в концентрации 0,02 мг/мл содержание HLA-ABC+ и HLA-DR+ клеток в суспензионных культурах глиобластом

несколько увеличивалось (рис. 2). Это может быть связано с тем, что при глиомах, особенно злокачественных, происходит частичная или полная утрата экспрессии антигенов I и/или II класса HLA [13,14], коррелирующая со степенью злокачественности опухолей, что является одной из причин отсутствия противоопухолевой активности CD4+ Т-лимфоцитов. С нашей точки зрения, возрастание экспрессии антигенов гистосовместимости клетками глиобластом под влиянием исследованных препаратов может способствовать распознаванию клеток опухоли иммунокомпетентными клетками. При этом статистически значимых различий между средними показателями содержания PI+, CD95+, CD25+, HLA-ABC+ и HLA-DR+ клеток в суспензионных культурах глиобластом под влиянием СНК и галавита не обнаружено (по данным множественных сравнений с использованием критерия Краскела-Уоллиса и сравнений независимых групп с использованием U-критерия Манна-Уитни). Это может указывать на сходный однонаправленный характер цитотоксического воздействия исследованных препаратов на опухолевые клетки глиобластом в суспензионных культурах.

Изучение влияния препаратов на опухолевые клетки глиобластом в диссоциированных культурах.

В контрольных наблюдениях в диссоциированных культурах клетки глиобластом формировали обширную зону роста с преобладанием плотноклеточных разрастаний недифференцированных опухолевых клеток с признаками ядерного полиморфизма и наличием атипичных одноядерных и многоядерных клеток. В таких участках зоны роста культур часто встречались делящиеся клетки на разных стадиях митотического цикла. Среди митозов преобладали патологические формы: моноцентрическая метафаза, отщепление хромосом, рассеивание хромосом в метафазе, полая метафаза (К-митоз). Средний показатель митотической активности (МИ) составлял $3,84 \pm 0,08\%$, что отображает высокий уровень пролиферативной активности этих опухолей соответственно их гистоструктуре и гистобиологическим свойствам *in vivo*. В то же время местами зона роста культур включала участки более дифференцированных длинноотростчатых опухолевых клеток ромбовидной, униполярной, треугольной формы, образующих сетевидные структуры, характерные для роста дифференцированных астроцитов в условиях культивирования. Это отражает способность части клеток культивированных глиобластом к спонтанной астроглиальной дифференцировке и подтверждает астроцитарный генез большинства из них *in vivo*.

В культурах глиобластом, инкубированных с СНК (0,02 мг/мл) в течение 24 ч, зарегистрирован цитотоксический эффект воздействия препарата в виде разрежения и

фрагментации зоны роста с появлением поврежденных опухолевых клеток, нередко в терминальной стадии разрушения. В нефрагментированных участках зоны роста этих культур зафиксировано снижение МИ до $1,91 \pm 0,14\%$. При увеличении срока инкубации этих культур с СНК (0,02 мг/мл) до 48 ч доля поврежденных клеток нарастала, что сопровождалось снижением МИ до $0,73 \pm 0,10\%$ (рис. 3).

Повышение концентрации СНК (0,1 мг/мл) при удлинении срока инкубации культур с препаратом до 48 ч вызывало появление обширных участков опустошения в зоне роста культур в связи с десквамацией погибших клеток. Нарастало также содержание дистрофированных пикноморфных опухолевых клеток с округленной цитоплазмой и пикноморфными ядрами. На подложке оставались лишь небольшие комплексы неповрежденных клеток с единичными митозами (МИ составлял $0,28 \pm 0,04\%$).

В опытной серии культур с тестированием галавита также наблюдался эффект его дозозависимого цитотоксического влияния на опухолевые клетки глиобластом. Так, после 24-часовой инкубации культур с галавитом в концентрации 0,02 мг/мл в зоне роста культур обнаружено появление участков разрежения и фрагментации клеточных массивов за счет десквамации части клеток. Повышение концентрации препарата до 0,10 мг/мл и срока инкубации культур с препаратом до 48 ч вызывало еще большее нарастание признаков цитотоксических изменений в опухолевых клетках культур. На цитологических препаратах таких культур в преобладающем большинстве опухолевых клеток определялись различные стадии дистрофических и некробиотических изменений (округление цитоплазмы с редукцией отростков, пикноморфные ядра, деструкция цитоплазмы).

Таким образом, после инкубации диссоциированных культур глиобластом с СНК или галавитом наблюдались признаки дозозависимого цитотоксического влияния этих препаратов в виде дистрофических и некробиотических изменений в подавляющем большинстве опухолевых клеток на фоне дисконфлексии зоны роста культур. При увеличении концентрации тестируемых препаратов и срока инкубации с ними культур до 48 ч МИ дозозависимо достоверно снижался в сравнении с контрольными образцами (рис. 3). Важно отметить, что характер и направленность цитотоксических изменений в культивируемых клетках глиобластом после воздействия СНК и галавита оказались сходными. При этом степень снижения МИ в культурах под влиянием галавита в концентрации 0,02 мг/мл оказалась существенно выше по сравнению с воздействием СНК в той же концентрации. Однако при увеличении концентрации препаратов до 0,10 мг/мл статистически значимых

различий между показателями МИ после воздействия СНК и галавита не было зафиксировано.

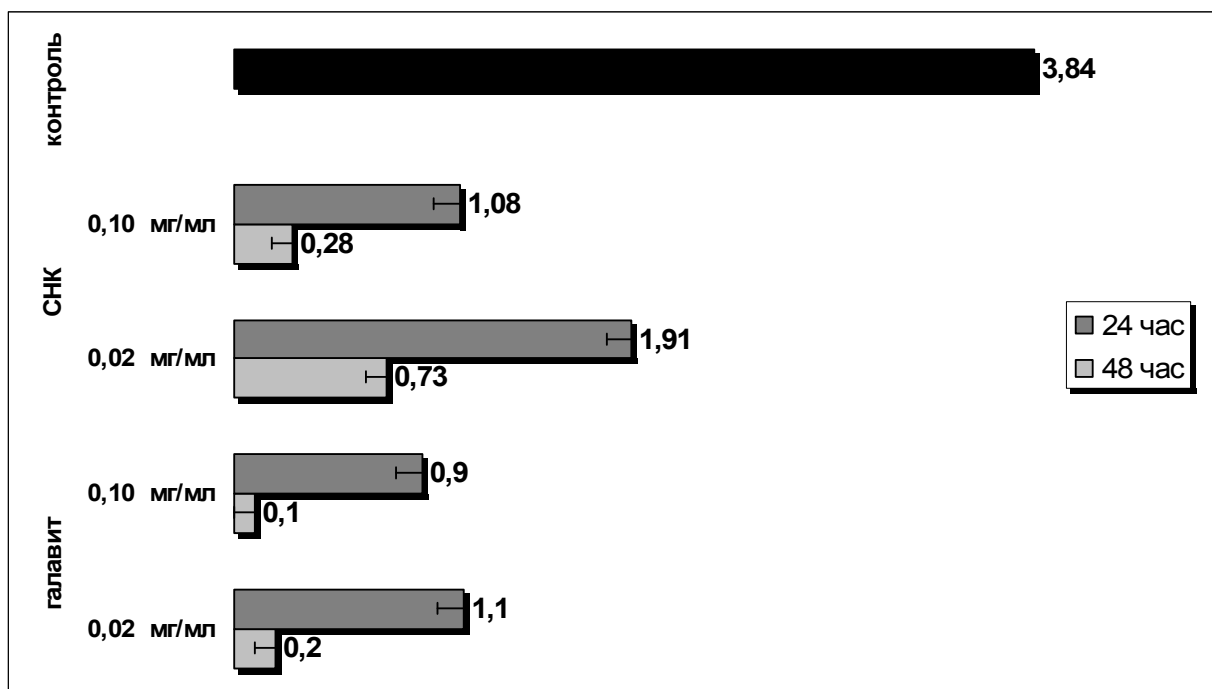


Рис. 3. Динамика изменения митотического индекса (%) в диссоциированных культурах глиобластом человека после инкубации с СНК и галавитом.

Суммируя полученные результаты, можно утверждать, что как СНК из фетального мозга крысы, так и иммуномодуляторный препарат галавит выявляют однонаправленное цитотоксическое воздействие на опухолевые клетки глиобластом человека как в суспензионных, так и в диссоциированных культурах. Правомерно предположить, что такие свойства этих препаратов обусловлены их способностью к проапоптотическому и антимитотическому влиянию. Оба исследованных препарата имели тенденцию к проапоптотическому воздействию на клетки глиобластом в суспензионных культурах, увеличивая количество CD95+ клеток, несущих FAS-рецептор, отображающий готовность к апоптозу, и P1+ клеток в терминальной стадии апоптоза; а также демонстрировали статистически значимое антимитотическое влияние в диссоциированных культурах глиобластом.

Некоторые различия степени влияния на опухолевые клетки исследованных препаратов в суспензионных и диссоциированных культурах глиобластом можно объяснить разным характером и способами оценки воздействия препаратов в каждом из этих методов. В суспензионных (24 ч) культурах опухолевых клеток при подсчете жизнеспособных и P1+ клеток

регистрируется прямое цитотоксическое и опосредованное проапоптотическое влияние препарата с выявлением клеток в необратимой терминальной стадии апоптоза. В отличие от суспензионных культур в диссоциированных культурах формируется гистотипическая динамическая зона роста из опухолевых клеток, наиболее адаптированных к новым условиям существования вне организма, и обладающих высоким пролиферативным потенциалом. При тестировании воздействия препаратов на опухолевые клетки в опытных культурах глиобластом в сравнении с контрольными создается возможность наблюдать пространственные и локальные изменения как в общей архитектонике зоны роста, так и в цитоструктуре ее отдельных клеток, а также в сравнительном аспекте оценить особенности миграционной и митотической активности опухолевых клеток с учетом характера их повреждения. Таким образом, способ тестирования особенностей прямого воздействия СНК и галавита на опухолевые клетки глиобластом в диссоциированных культурах существенно дополняет результаты, полученные в суспензионных культурах глиобластом при исследовании противоопухолевых свойств этих препаратов в эксперименте.

Необходимо подчеркнуть, что часть образцов глиобластом в суспензионных культурах оказалась нечувствительной к тестируемым концентрациям СНК и галавита, что отражает гетерогенность этих опухолей и различия их индивидуальной чувствительности к этим препаратам. Анализ полученных результатов обосновывает актуальность дальнейших исследований, направленных на изучение в клинических условиях влияния этих препаратов на рост глиом головного мозга различной степени злокачественности у нейроонкологических больных. Для решения этой научной проблемы необходима предварительная доклиническая оценка индивидуальной чувствительности этих опухолей к воздействию тестируемых препаратов *in vitro* с целью подбора их оптимальной дозы для клинического применения.

Список литературы

1. **Achanta P., Sedora Roman N.I., Quiñones-Hinojosa A.** Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment. *Anticancer Agents Med.Chem.* 2010,10 (2): 121–130.
2. **Bovenberg M.S., Degeling M.H., Tannous B.A.** Advances in stem cell therapy against gliomas. *Trends Mol.Med.* 2013, 19 (5): 281–291.
3. **Kim S.U.** Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors. *Stem Cell Rev.* 2011, 7(1): 130–140.
4. **Семенова В.М., Любич Л.Д., Лисяный Н.И, Главацкий А.Я., Стайно Л.П.** Исследование биологических свойств супернатанта прогениторных нейроклеток крыс на культурах глиом головного мозга. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 27. Спб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011: 58–68.

5. Лісяний М.І., Любич Л.Д., Хохлов А.Г. Дослідження протипухлинної дії прогеніторних нейроклітин (НК) при експериментальній гліомі головного мозку у щурів. Імунологія та алергологія. 2008, (3): 61–66.
6. Подколзин А.А., Гришина Т.И. Галавит. Клиническое использование и механизмы действия. М.: Внешторгиздат, 2002: 104 с.
7. Vel'sher L.Z., Gabuniia Z.R., Grishina T.I., Germanov A.B., Biakhov M.Iu., Korobkova L.I., Platonov D.A., Argun V.M., Budnenkov A.G., Gens G.P. Galavit-induced change of immunologic parameters in patients with non-small lung cancer. Vopr.Onkol. 2009, 55 (1): 51–55.
8. Примушко Л.І., Семенова В.М., Лісяний О.М. Дослідження протипухлинної дії імуномодельючого препарату галавіт. Укр.нейрохірург.журнал. 2007, (1): 32–36.
9. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: International agency for research on cancer, 2007: 312p.
10. Божкова В.П., Викторов И.В., Брежестовский Л.А., Буравлев В.М., Шунгская В.Е. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. М.: Наука, 1988: 317 с.
11. Пинегин Б.В. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей-лаборантов. М., 2001: 48–53.
12. Schwartzbaum J.A., Xiao Y., Liu Y., Tsavachidis S., Berger M.S., Bondy M.L., Chang J.S., Chang S.M., Decker P.A., Ding B., Hepworth S.J., Houlston R.S., Hosking F.J., Jenkins R.B., Kosel M.L., McCoy L.S., McKinney P.A., Muir K., Patoka J.S., Prados M., Rice T., Robertson L.B., Schoemaker M.J., Shete S., Swerdlow A.J., Wiemels J.L., Wiencke J.K., Yang P., Wrensch M.R. Inherited variation in immune genes and pathways and glioblastoma risk. Carcinogenesis. 2010, 10: 1770–1777.
13. Facoetti A., Nano R., Zelini P., Morbini P., Benericetti E., Ceroni M., Campoli M., Ferrone S. Human leukocyte antigen and antigen processing machinery component defects in astrocytic tumors. Clin. Cancer Res. 2005, 11 (23): 8304–8311.
14. Huang H., Hara A., Homma T., Yonekawa Y., Ohgaki H. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. J.Neuropathol Exp.Neurol. 2005, 64 (10): 891–901.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ IN VIVO И IN VITRO КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИЕЙ ПРИ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ

И.А. Свеженцева, Д.И. Билько, И.З. Руссу, Н.М. Билько

Центр молекулярных и клеточных исследований Национального университета

«Киево-Могилянская академия», Киев, Украина, iilona@ukr.net

В настоящей работе была проведена оценка морфофункциональной активности культивируемых в полужидком агаре *in vitro* и *in vivo* клеток костного мозга пациентов с

хронической миелоидной лейкемией (ХМЛ) при терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) – иматинибом и нилотинибом, а также больных, не подвергавшихся такому лечению.

Исследовали клетки гемопоэтического компонента костного мозга системы гранулоцито-моноцитопоэза, стимулированного в культуре *in vitro* при помощи добавления в среду гранулоцито-макрофагального ростового фактора. Культивирование клеток *in vivo* осуществляли в специальных диффузионных камерах, помещенных в брюшную полость экспериментальных животных (мышей). Во всех вариантах экспериментов подсчитывали количество колоний и кластеров клеток в культурах, оценивали их морфологический состав и индекс созревания гранулоцитов.

Показано, что количество колоний клеток в культурах *in vitro* и *in vivo* у пациентов с оптимальным ответом на терапию иматинибом и нилотинибом было значительно ниже, чем у пациентов с приобретенной резистентностью к препаратам и у пациентов с впервые диагностированным ХМЛ. Кроме того, было обнаружено, что у пациентов, принимавших выше упомянутые ИТК, количество кластеров в полужидком агаре в культурах *in vivo* значительно превышало количество таковых в культурах клеток *in vitro*. Это может свидетельствовать о стимулирующем влиянии факторов микроокружения, имеющих в организме животного-реципиента камер, на пролиферацию коммитированных клеток лейкемического клона с ограниченным пролиферативным потенциалом. Этот факт получил дополнительное подтверждение в выявленной разнице в индексе созревания гранулоцитов в культуральных системах *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: хроническая миелоидная лейкемия, таргетная (целевая) терапия, факторы микроокружения, культура клеток костного мозга в полужидком агаре *in vitro* и *in vivo*.

Согласно современным представлениям хроническая миелоидная лейкемия (ХМЛ) возникает вследствие клональной экспансии примитивных гемопоэтических клеток, что приводит к появлению потомства с иными функциональными характеристиками, отличными от нормального костного мозга [1]. Причиной экспансии является реципрокная транслокация $t(9;22)(q34;q11)$, вследствие которой образуется хромосома 22 с укороченным длинным плечом – так называемая Филадельфийская хромосома (Ph). На ней расположен онкоген BCR-ABL, продуктом которого является онкопротеин BCR-ABL-тирозинкиназа [2]. Она участвует в патогенезе заболевания путем повышения активности митогенов, нарушения межклеточных взаимодействий и подавления апоптоза. В конечном счете, повышенная

пролиферативная активность патологических клеток в сочетании с подавлением апоптоза приводит к неконтролируемой клеточной пролиферации и постепенному замещению нормальных клеток костного мозга на клетки лейкоемического клона [3].

В последние годы для терапии больных с ХМЛ были разработаны препараты таргетного (целевого) действия – ингибиторы тирозинкиназ (ИТК), такие как иматиниб и нилотиниб, способные влиять выборочно только на клетки, содержащие BCR-ABL-тирозинкиназу. Молекула иматиниба встраивается в так называемый АТФ-карман на поверхности BCR-ABL-тирозинкиназы, блокируя фосфорилирование субстрата и дальнейшую передачу митотического сигнала в клетке [4]. Однако лейкоемический клон отличается высокой нестабильностью генома и, со временем, у некоторых больных в гене BCR-ABL могут возникать вторичные мутации, которые приводят к изменению конформации АТФ-кармана одноименной тирозинкиназы. В связи с этим, иматиниб теряет способность блокировать пролиферацию такого клона клеток, и заболевание прогрессирует в фазу бластного криза [3]. Для решения этой проблемы были разработаны ИТК второй линии терапии, такие как нилотиниб, которые со значительно меньшей вероятностью формируют резистентность и непереносимость у пациентов. Однако и к нилотинибу у некоторых больных может возникать резистентность. Существует мнение, что в процессе формирования резистентности к ИТК могут участвовать и факторы микроокружения [5]. Культивирование клеток костного мозга в диффузионных камерах *in vivo* дает возможность определить влияние на клетки растворимых факторов микроокружения. Именно поэтому, целью нашей работы было сравнить результаты изучения морфофункциональной активности культивированных *in vitro* и *in vivo* клеток костного мозга пациентов, характеризующихся разными ответами на препараты первой и второй линии таргетной терапии – иматиниб и нилотиниб.

Материал и методы

Изучали клетки из пунктатов костного мозга пациентов с ХМЛ в хронической фазе заболевания, получающих препараты иматиниб и нилотиниб в качестве первой и второй линии терапии, соответственно. В зависимости от ответа на лечение, пациентов разделили на группы: первая – с впервые диагностированным ХМЛ (n=3); вторая – с резистентностью к иматинибу (n=9); третья – с резистентностью к нилотинибу (n=7); четвертая – с оптимальным ответом на иматиниб (n=8) и пятая – с оптимальным ответом на нилотиниб (n=6). При резистентности к препаратам у больных наблюдалась гематологическая ремиссия, а цитогенетическая ремиссия (отсутствие в костном мозге клеток, имеющих Ph-хромосому)

была либо частичной, либо ее не было. Изолированные клетки костного мозга параллельно культивировали *in vitro* и *in vivo* в полужидком агаре.

Суспензию клеток получали путем центрифугирования пунктатов костного мозга пациентов при 500 G в градиенте плотности Hystopaque (1,077 г/мл) (Sigma, США). Суть методики состоит в том, что эритроидная масса и многоядерные клетки при центрифугировании оседают на дно пробирки, а мононуклеары костного мозга формируют белое кольцо на границе фаз сыворотка-Hystopaque [6]. Кольцо отбирали с помощью автоматической пипетки и трижды промывали в растворе PBS (Sigma, США). С помощью камеры Горяева под инвертированным микроскопом (Zeiss, Германия) подсчитывали количество клеток в полученной суспензии. Подсчет соотношения мертвых и живых клеток осуществляли с помощью стандартного теста с трипановым синим (Sigma, США)

Культивирование *in vitro* производили в культуральной среде RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 0,33 % бактоагара (Difco, США), 20 % фетальной телячьей сыворотки (Sigma, США), гранулоцито-макрофагального колониестимулирующего ростового фактора GM-CSF (Sigma, США) в концентрации 50 нг/мл и антибиотиков (50 МЕ/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина). Культивирование осуществляли в 24-луночной планшете (Nunc, США) при температуре 37°C, абсолютной влажности и атмосфере с содержанием 5% CO₂. Длительность культивирования составляла 14 дней. Именно на этот день наблюдалась наиболее активная пролиферация гранулоцито-макрофагальных клеток-предшественников костного мозга человека при ХМЛ [7]. Учет колоний и клонов производился под инвертированным микроскопом (Nikon, Япония).

Культивирование *in vivo*. Суспензию для культивирования готовили на основе среды RPMI-1640 (Sigma, США), с добавлением 0,33 % бактоагара (Difco, США), 10 % фетальной телячьей сыворотки (Sigma, США) и антибиотиков (50 МЕ/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина). Готовой суспензией клеток наполняли внутреннюю полость гелевых диффузионных камер, которые были изготовлены из прозрачного, биоинертного полимерного материала [8]. Камеры помещали в брюшную полость мышей линии СВА, за сутки до культивирования обработанных циклофосфамидом в дозе 200 мг/кг веса животного. Это способствовало угнетению активности иммунной системы мышей-реципиентов камер и дополнительному выделению факторов роста и цитокинов, способных оказать позитивное влияние на процессы пролиферации и дифференцировки гранулоцито-макрофагальных клеток-предшественников. Для анестезии перед операцией животным вводили 1%-ный

раствор тиопентала натрия. Культивирование длилось 14 дней. После этого животных выводили из опыта путем цервикальной дислокации позвонков, камеры извлекали и изучали под инвертированным микроскопом (Nikon, Япония).

Оценку кластеро- и колониобразующей активности клеток производили путем подсчета количества клеточных агрегатов. За кластер принимали клеточный агрегат, в составе которого было не больше 40 клеток, а за типичную колонию – агрегат, в состав которого входило более 40 клеток (рис. 1).

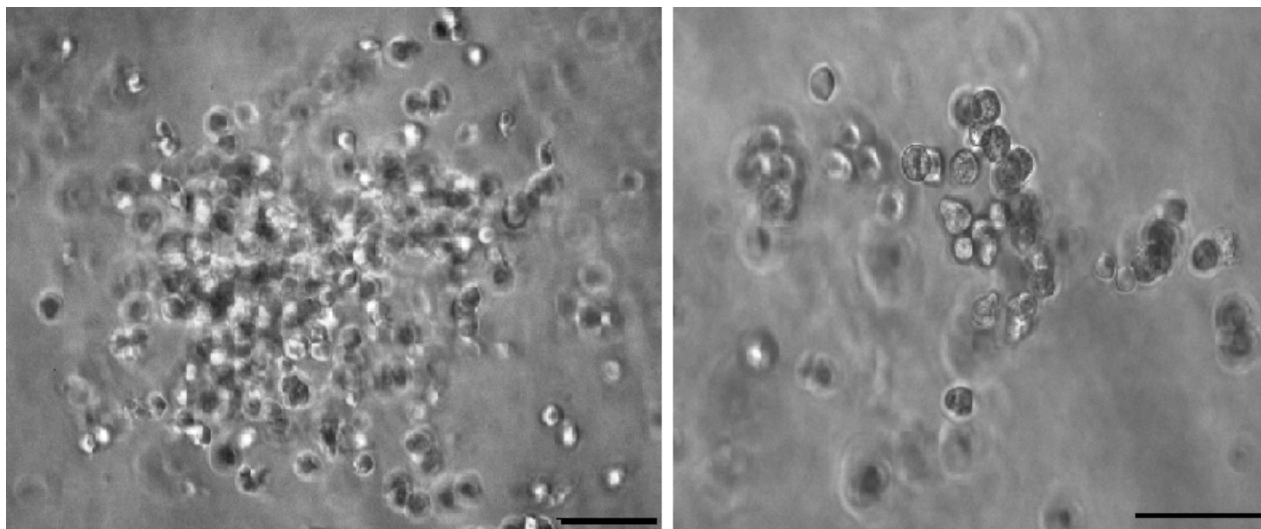


Рис. 1. Типы клеточных агрегатов в культурах костного мозга пациентов с ХМЛ на 14-е сутки культивирования в системе *in vivo*. Фотографии сделаны с неокрашенных клеток под инвертированным микроскопом. Масштабная линейка – 50 мкм.

Изучение морфологических особенностей клеток в культуре. Препараты из клеточных колоний готовили с помощью цитоцентрифуги (Shandon, Великобритания). Для этого при помощи автоматической пипетки под инвертированным микроскопом (Zeiss, Германия) изымали отдельные клеточные агрегаты и переносили в кювету цитоцентрифуги, добавляя 35 мкл среды RPMI-1640 для вымывания клеток с кюветы. С целью лучшего распластывания клеточных агрегатов на предметном стекле и возможности визуализации морфологии отдельных клеток колонии препараты центрифугировали при 250 G. После этого предметные стекла высушивали в вытяжном шкафу.

Для окрашивания клеток на препаратах использовали метод Паппенгейма. Для этого клетки сначала фиксировали 96%-ным этиловым спиртом в течении 5 минут. Далее на стекла наносили краситель Май-Грюнвальда на 45 с, потом, не смывая красителя, добавляли такое же количество воды и окрашивали препараты еще 45 с. По окончании времени окрашивания стекла аккуратно промывали дистиллированной водой и на 35 с окунали в раствор

Романовского-Гимза. После окрашивания препараты высушивали в вытяжном шкафу и изучали под инвертированным микроскопом (Leika, Германия). Подсчет клеток в каждом препарате производили следующим образом: отсчитывали по линии Миандра 100 клеток в поле зрения и среди них определяли количество бластных клеток, промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных клеток, а также макрофагов (зрелых клеток моноцитопозза). Моноцитобласты и промоноциты (клетки моноцитарно-макрофагального звена кроветворения) после культивирования в полужидком агаре трудно морфологически отличить от ранних клеток гранулоцитарного звена кроветворения.

Определяли индекс созревания гемопоэтических клеток костного мозга гранулоцито- и моноцитопозза в культурах *in vitro* и *in vivo* по формуле: $I = N/D$, где I – индекс созревания

клеток костного мозга; N – сумма недифференцированных клеток (бласты, промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты); D – сумма зрелых клеток (палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, а также макрофаги).

Статистический анализ выполнен с использованием теста Манна-Уитни для сравнения двух групп непараметрических выборок. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ колониеобразующей активности гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников костного мозга пациентов с впервые диагностированным ХМЛ и с резистентностью к иматинибу в культурах *in vitro* и *in vivo* показал, что между количеством колоний в этих культурах статистически достоверной разницы не было (рис. 2). Так, у больных с впервые диагностированным ХМЛ количество колоний в диффузионной камере *in vivo* достигало $53,4 \pm 2,1$, а у пациентов с резистентностью к иматинибу насчитывалось $52 \pm 3,5$ колоний. В свою очередь, у пациентов с приобретенной резистентностью к нилотинибу, функциональная активность гемопоэтических клеток была достоверно ниже и составляла около $44 \pm 2,7$ колоний в культуральной системе *in vitro* и $36,9 \pm 2,1$ колоний *in vivo*. У пациентов с оптимальным ответом на терапию препаратами иматиниб и нилотиниб количество колоний в полужидком агаре *in vitro* достоверно отличалось и составило $21,0 \pm 1,8$ и $19 \pm 3,7$, соответственно. Следует отметить, что в случае пациентов с оптимальным ответом на терапию ИТК количество колоний в культуральной системе *in vivo* было достоверно выше,

чем количество таковых в полужидком агаре *in vitro* и достигало $31,2 \pm 1,8$ и $27,4 \pm 2,6$ для пациентов, принимавших иматиниб и нилотиниб, соответственно.

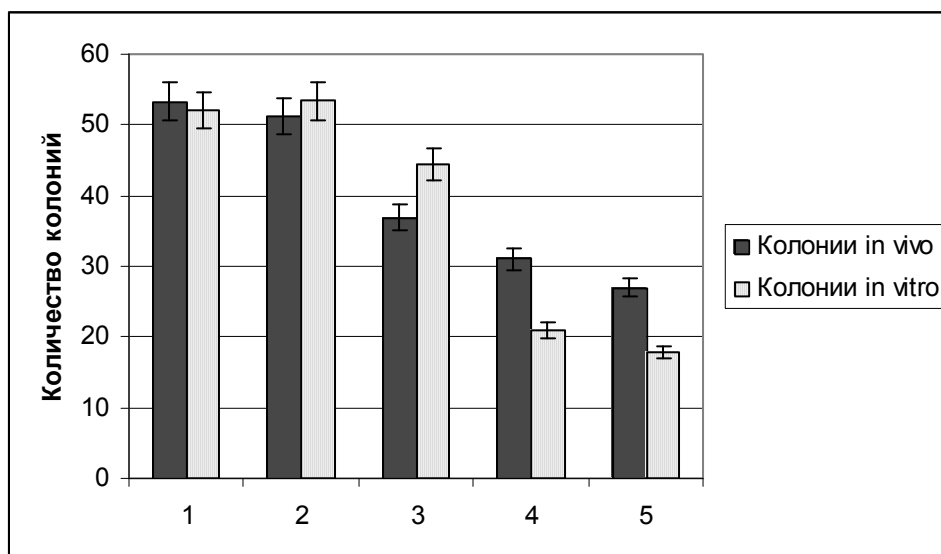


Рис. 2. Показатели колониеобразующей активности клеток костного мозга в культурах *in vitro* и *in vivo* пациентов с ХМЛ: 1 – пациенты с впервые диагностированной ХМЛ; 2 – с резистентностью к иматинибу; 3 – с резистентностью к нилотинибу; 4 – с оптимальным ответом на иматиниб; 5 – с оптимальным ответом на нилотиниб.

Это может объясняться тем, что в костном мозге больных с оптимальным ответом на терапию ИТК преобладают нормальные клетки, которые при культивировании в диффузионных камерах *in vivo* чувствительны к цитокинам и ростовым факторам, которые присутствуют в организме мыши и отсутствуют при культивировании в культуральной системе *in vitro* [9].

Количество кластеров в двух культуральных системах существенно отличалось (рис. 3). Так, в культуре *in vitro* у пациентов с впервые диагностированной ХМЛ кластерообразующая активность достигала $87 \pm 4,7$ единиц. В культуре *in vivo* их количество было значительно меньше и составило $75 \pm 2,1$. У пациентов с приобретенной резистентностью к иматинибу и нилотинибу количество кластеров в культуре клеток *in vivo* достоверно превышало количество кластеров у пациентов с впервые диагностированной ХМЛ и составляло $83 \pm 2,2$ и $91 \pm 4,4$, соответственно. Однако в этих группах пациентов количество кластеров в культуре *in vitro* было значительно ниже по сравнению с пациентами, которые не принимали препараты ИТК.

У больных с оптимальным ответом на терапию ИТК количество кластеров как в культуре *in vitro*, так и в культуре *in vivo* было значительно ниже по сравнению с пациентами, у которых развилась резистентность к препаратам. У больных с оптимальным ответом на иматиниб количество кластеров в культуре *in vivo* было выше, чем в культуре *in vitro* и составило $64 \pm 1,8$ и $48 \pm 0,3$ агрегатов. В свою очередь, у пациентов с оптимальным ответом на

нилотиниб количество кластеров в культуре *in vivo* составляло $59 \pm 1,7$ единиц, а *in vitro* - $16 \pm 4,3$. Можно предположить, что у пациентов, принимавших ИТК в качестве терапии, в костном мозге накапливались кластерообразующие опухолевые клетки с ограниченным пролиферативным потенциалом, которые в культуре *in vivo* активировались цитокинами и факторами роста, вырабатываемыми организмом-реципиентом камер.

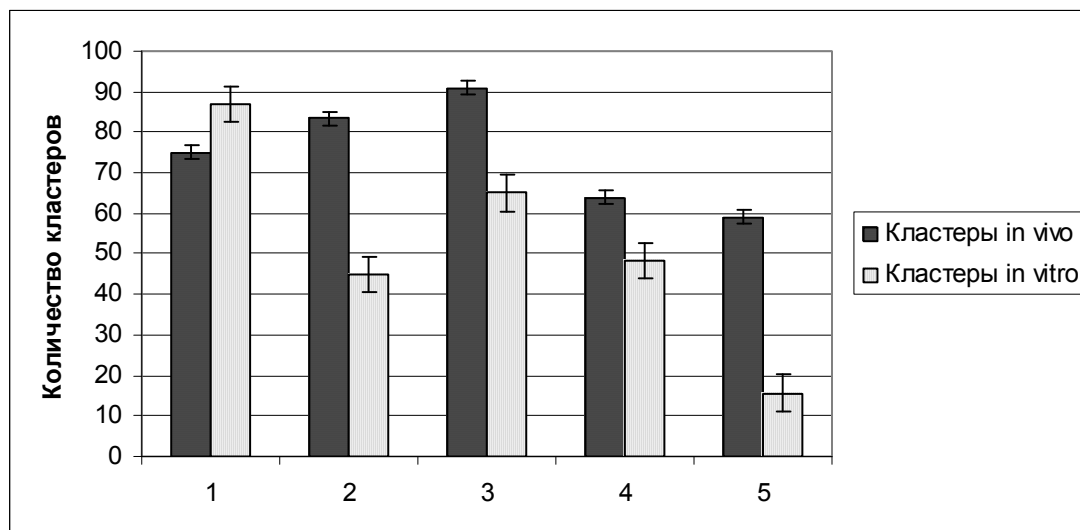


Рис. 3. Показатели кластерообразующей активности клеток костного мозга пациентов с ХМЛ в культурах *in vitro* и *in vivo*: 1 – пациенты с впервые диагностированным ХМЛ; 2 – с резистентностью к иматинибу; 3 – с резистентностью к nilotinibu; 4 – с оптимальным ответом на иматиниб; 5 – с оптимальным ответом на nilotinиб.

Данные литературы свидетельствуют о том, что при культивировании в полужидком агаре клеток костного мозга больных ХМЛ наблюдается накопление миелоцитов [10]. В работе Гриневой с соавторами [11] было показано, что при прогрессировании ХМЛ одновременно с высокой пролиферативной активностью гемопоэтических клеток лейкомиического клона наблюдается нарушение их созревания и уменьшение количества сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов. Влияние ИТК на процесс дифференцировки клеток костного мозга еще до конца не изучено. Сравнение клеточного состава колоний в полужидком агаре при культивировании костного мозга *in vitro* и *in vivo* даёт возможность изучить фракцию коммитированных клеток, которые способны дифференцироваться под действием ростовых факторов и цитокинов в организме мыши-реципиента диффузионных камер [8].

Мы изучали морфологию колоний культивированных клеток на окрашенных по Паппенгейму препаратах и подсчитывали относительное количество (долю в процентах) клеток на разных стадиях созревания гранулоцитов и моноцитов. В культурах клеток пациентов, которым диагноз был поставлен первично (табл. 1), и пациентов с

резистентностью к терапии препаратами ИТК (табл.2) наблюдалось повышенное по сравнению с больными 4-й и 5-й групп количество ранних клеток-предшественников как в системе *in vitro*, так и *in vivo*. Исключением были культуры костного мозга пациентов, которые получали терапию препаратом нилотиниб – этих больных количество бластов в культуре клеток *in vivo* почти в 2 раза превышало их количество в культуре *in vitro*.

Таблица 1.

Клеточный состав колоний клеток костного мозга в культуральных системах *in vitro* и *in vivo* больных с впервые диагностированным ХМЛ

Клетки	Доля клеток <i>in vitro</i> , %	Доля клеток <i>in vivo</i> , %
Бластные клетки	18,2 ± 2,8	16 ± 3,1
Промиелоциты	13 ± 4,2	13 ± 1,3
Миелоциты	20 ± 2,3	21 ± 2,7
Метамиелоциты	29 ± 3,2	24,3 ± 1,9
Палочкоядерные клетки	22 ± 5,1	14 ± 3,4
Сегментоядерные клетки	10,5 ± 5,6	20,6 ± 2,4
Макрофаги	3,5 ± 0,3	6,3 ± 1,4

Кроме того, у пациентов, которые в качестве таргетной терапии принимали иматиниб, количество менее дифференцированных клеток как в культурах *in vitro*, так и в культурах *in vivo* превышало количество таковых в культурах клеток больных, которые принимали нилотиниб.

Результаты исследования индекса созревания гранулоцитов и моноцитов показали, что у пациентов с впервые диагностированным ХМЛ этот показатель в системах *in vitro* и *in vivo* составлял $2,2 \pm 0,1$. При этом у пациентов, которые в качестве терапии принимали нилотиниб, в культуре клеток *in vitro* индекс созревания гранулоцитов превышал таковой в культуре *in vivo* независимо от характера ответа на терапию препаратом (табл. 3). Однако, у пациентов, которые в качестве терапии принимали иматиниб, индекс созревания в культуре клеток *in vivo* был значительно выше, чем в культуре *in vitro*. Можно предположить, что в костном мозге пациентов, которые принимали нилотиниб, количество клеток, чувствительных к цитокинам и ростовым факторам в системе *in vivo* было выше, чем у пациентов, которые в качестве таргетной терапии принимали иматиниб.

Таблица 2.
Клеточный состав колоний клеток костного мозга в культуральных системах *in vitro* и *in vivo* пациентов с ХМЛ с разным характером ответа на терапию ИТК

Клетки	Доля клеток <i>in vitro</i> , %		Доля клеток <i>in vivo</i> , %	
	Иматиниб	Нилотиниб	Иматиниб	Нилотиниб
Пациенты с оптимальным ответом на терапию ИТК				
Бластные клетки	9,6 ± 2,3	6,6 ± 1,8	7,0 ± 2,7	6,7 ± 3,2
Промиелоциты	11,3 ± 5,3	16,0 ± 3,7	11,0 ± 2,3	16,0 ± 1,8
Миелоциты	19,6 ± 6,3	17,9 ± 1,7	16,3 ± 2,6	18,6 ± 4,2
Метамиелоциты	21,0 ± 3,1	24,3 ± 4,8	23,0 ± 1,4	23,6 ± 3,1
Палочкоядерные клетки	11,7 ± 2,1	14,2 ± 2,5	12,0 ± 1,9	13,6 ± 3,3
Сегментоядерные клетки	8,0 ± 0,5	15,7 ± 1,7	7,1 ± 2,1	15,6 ± 2,2
Макрофаги	2,3 ± 0,1	3,2 ± 0,3	4 ± 0,2	3,6 ± 0,1
Пациенты с резистентностью к терапии ИТК				
Бластные клетки	12,2 ± 2,2	8,3 ± 0,9	19,1 ± 1,8	16,2 ± 2,1
Промиелоциты	18,0 ± 1,4	20,1 ± 2,1	16,0 ± 3,2	17,3 ± 0,9
Миелоциты	16,0 ± 2,3	16,7 ± 2,4	19,2 ± 3,4	18,0 ± 1,8
Метамиелоциты	23,5 ± 1,8	20,7 ± 1,9	21,1 ± 2,6	19,3 ± 5,3
Палочкоядерные клетки	12,3 ± 2,5	17,6 ± 0,9	11,6 ± 1,3	15,0 ± 3,7
Сегментоядерные клетки	7,0 ± 0,3	8,3 ± 0,7	8,2 ± 2,1	9,3 ± 1,2
Макрофаги	4,1 ± 0,2	5,7 ± 0,4	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,4

Таблица 3.

Значения индекса созревания гранулоцитов и моноцитов костного мозга в культуральных системах *in vitro* и *in vivo* пациентов с ХМЛ, которые получали терапию препаратами ИТК

Группы пациентов	Культура клеток <i>in vitro</i>		Культура клеток <i>in vivo</i>	
	нилотиниб	иматиниб	нилотиниб	Иматиниб
Резистентность к терапии	2,4±0,3	1,8±0,1	2,1±0,1	2,3±0,1
Оптимальный ответ на терапию	2,3±0,1	2,5±0,2	2,0±0,1	3,1±0,1

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в культурах клеток костного мозга пациентов с ХМЛ, которые в качестве таргетной терапии принимали как иматиниб, так и

нилотиниб, преобладают дифференцированные клетки – гранулоциты и макрофаги. Их созревание может активироваться цитокинами, которые вырабатываются организмом животного-реципиента камер. В свою очередь, у пациентов, у которых ХМЛ был диагностирован впервые, различия в значениях индекса созревания в культуральных системах *in vitro* и *in vivo* не наблюдалось. Это может свидетельствовать о том, что ИТК, такие как иматиниб и nilотиниб, способствуют элиминации нечувствительных к цитокинам и ростовым факторам клеток лейкемического клона, а нормальные клетки костного мозга пациентов получают возможность пролиферировать и дифференцироваться. В свою очередь, у пациентов с впервые диагностированным ХМЛ в костном мозге преобладали нечувствительные к цитокинам и ростовым факторам клетки лейкемического клона, у которых процессы пролиферации преобладали над процессами дифференцировки, способствуя накоплению ранних форм клеток гранулоцито- и моноцитопоза.

Дальнейшее изучение влияния факторов микроокружения на пролиферацию и созревание культивируемых клеток костного мозга с использованием молекулярных методов исследования позволит пролить свет на клеточные и молекулярные механизмы пролиферации и дифференцировки клеток костного мозга больных ХМЛ с разным характером ответа на терапию препаратами ИТК.

Список литературы

1. **Al-Achar W., Wafa A., Moassas A. , Klein E., Liehr T.** Multiple copies of BCR-ABL fusion gene on two isodicentric Philadelphia chromosomes in an imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia patient. *Oncology letters*, 2013, 5: 1579–1582.
2. **Bacco A. D., Keeshan K., Mckenna S. L., Cotter T. G.** Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Deregulation of Cell Growth and Apoptosis. *The Oncologist*, 2000, 5: 405–415.
3. **Deininger M., Goldman J. M., Melo J. V.** The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2000, 96: 3343–3356.
4. **Bing Z. Carter, Duncan D. Mak, Jorge Cortes, Michael Andreeff** The elusive CML stem cell: does it matter and how do we eliminate it? *Semin Hematol.* Author manuscript; available in PMC 2011, October 1.
5. **Mughal A., Muhammad H., Khan A. M., Saleem S., Umah R., Saleem M.** Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors- current status Mughal et al. *Infectious Agents and Cancer*, 2013, 8: 23.
6. **Helgason C.D., Miller Helgason C.L.** Basic cell culture protocols, third edition. Human Press, 2012, 290: 364.
7. **Жалейко І.О., Білько Д.І., Дягіль І.С., Білько Н.М.** Порівняльна оцінка морфофункціональної активності клітин кісткового мозку пацієнтів при хронічній мієлоїдній лейкемії у разі терапії препаратами групи інгібіторів тирозинкіназ першого та другого покоління. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина*, 2014, 2 (5): 104–109.

8. **Білько Н. М.** Патент України № 2692. Спосіб виготовлення камери для культивування клітин / від 15.04.1994. Офіційний бюлетень «Промислова власність», 1994, 5: 218.

9. **Mayani H., Flores-Figueroa E., Chavez-Gonzalez A.** In vitro biology of human myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 2009, 33: 624–637.

10. **Corbin A. S., Agarwal A., Loriaux M., Cortes J., Deininger M., Druker B.J.** Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J. Clin. Invest.*, 2011, 121: 396–409.

11. **Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Шмаров Д.А., Сарычева Т.Г. Тимофеев А.М., Найденова Н.М., Боровкова Т.В., Саркисян Г.П., Гавричкова А.Р., Колосова Л.Ю., Колошейнова Т.И., Ковалева Л.Г., Воронцова А.В., Туркина А.Г.** Различия в пролиферации и дифференцировке Ph⁺ клеток от индивидуальных больных ХМЛ в суспензионной культуре. Ph⁺ клетки с высокой скоростью пролиферации. *Экспериментальная онкология*, 2009, 8: 53–68.

КЛЕТКИ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА В КУЛЬТУРЕ: КЛОНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ

***Н.П. Терюкова, И.В. Воронкина, Л.В. Смагина, В.А. Иванов**

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *npter@yandex.ru

Асцитная гепатома Зайдела крыс является метастатической опухолью, или, точнее, этапом метастатического каскада, и может быть использована в качестве перспективной модели при изучении клеточных механизмов опухолевой прогрессии и метастазирования. Работа проведена на двух культивируемых *in vitro* линиях гепатомы Зайдела с разным уровнем цитодифференцировки и туморогенности – монослойной и суспензионной, представленной флолирующими многоклеточными островками. Для выявления в составе этих клеточных линий субпопуляций, обладающих опухолеиницирующим потенциалом и/или способностью к инвазии и метастазированию, проведено клонирование клеток с помощью метода предельных разведений. Показано, что обе клеточные линии формируют три типа клонов, которые отличаются по форме колоний и пролиферативному потенциалу, причем при клонировании клеток суспензионной линии впервые обнаружено образование сферических клонов в полной ростовой среде. Получены 8 клональных линий гепатомы Зайдела, из которых только клетки сферического клона и двух голоклонов при внутрибрюшинном введении беспородным крысам индуцировали развитие асцитной формы опухоли. Впервые установлено, что клетки монослойной и суспензионной линий и их клонов отличаются по характеру экспрессии адгезионной молекулы эпителиальных клеток (EpcAM) – маркера стволовых клеток печени и

опухолевых стволовых клеток (или опухолеиницирующих клеток), и активности матричной металлопротеиназы 9, уровень секреции которой может служить индикатором инвазивности опухолевых клеток. Выявление опухолевых сферических клонов и голоклонов, отличающихся по своим адгезионным свойствам, экспрессии ЕpCAM и активности матричной металлопротеиназы 9, позволяют сделать заключение о гетерогенности субпопуляции опухолеиницирующих клеток асцитной гепатомы Зайдела.

Ключевые слова: гепатома, клонирование, опухолевые стволовые клетки, опухолеиницирующие клетки, матричные металлопротеиназы, адгезионная молекула эпителиальных клеток.

Гепатома Зайдела была индуцирована у крыс 4-диметиламиноазобензолом [1]. При вскрытии животных оказалось, что одна из первичных опухолей печени имела разрыв, через который островки эпителиальных клеток отделялись от основной массы печени. Образовавшийся в брюшной полости малигнизированный асцит был привит нескольким крысам и дал начало асцитной форме опухоли, клетки которой формируют многоклеточные островки. Особенностью гепатомы Зайдела является высокая частота метастазирования в паратрахеальные лимфатические узлы: метастазы этой локализации наблюдаются у 90–100% животных. Таким образом, гепатома Зайдела прошла длительный путь опухолевой прогрессии в рамках первичной солидной опухоли, и образование асцитной формы гепатомы является промежуточным этапом на пути диссеминации опухолевых клеток в организме, т.е. этапом метастатического каскада. Для клеток первичных опухолей эпителиального происхождения начальные этапы метастатического каскада связаны с эпителиально-мезенхимным переходом, в ходе которого происходит активация цинк-пальцевых (zinc-finger) транскрипционных факторов суперсемейства SNAIL, в числе которых SNAIL1, и матричных металлопротеиназ (ММП), изменение морфологии клеток, увеличение их подвижности и инвазивности.

Ранее с помощью масс-спектрометрического анализа в составе наружных мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела нами были выявлены и идентифицированы некоторые опухолеассоциированные антигены, которые можно рассматривать как маркеры дисдифференцировки зрелых гепатоцитов; в числе этих антигенов ЕpCAM – маркер стволовых/прогениторных клеток печени, альфа-фетопротеин (АФП) – маркер прогениторных клеток печени и басигин/CD147 – индуктор ММП [2]. Синтез ЕpCAM и АФП осуществляется в

низкодифференцированных клетках гепацитарного ряда – гепатобластах и овальных клетках, и прекращается в зрелых гепацитатах [3]. Экспрессия EpCAM в клетках гепацителлюлярных карцином регулируется активностью Wnt-beta-катенинового сигнального пути, непосредственной мишенью которого является ген EpCAM [4]. Вместе с тем активация Wnt-beta-катенинового сигнального пути индуцирует эпителиально-мезенхимный переход через свои нижележащие мишени, в том числе SNAIL1 [5]. Трансмембранный гликопротеид EpCAM с Мол.м. 32–42 кДа состоит из эктодомена, трансмембранного домена и короткого С-терминального эндодомена (EpiCD). В большинстве нормальных EpCAM-позитивных эпителиальных тканей функциональная роль EpCAM сводится только к межклеточной гомотипической адгезии. Однако в опухолях эпителиального происхождения и в опухолеиницилирующих клетках EpCAM участвует в передаче митогенного сигнала и поддержании низкодифференцированного статуса клеток: в результате регулируемого внутримембранного протеолиза молекулы освобождается внутриклеточный домен EpiCD, который в комплексе с FHL2, бета-катенином и Lef-1 перемещается в ядро и связывается с ДНК для непосредственного участия в регуляции транскрипции репрограммирующих генов (c-Myc, Oct4, Nanog, and Sox2) и генов эпителиально-мезенхимного перехода, в числе которых гены виментина и SNAIL1 [6,7]. У человека EpCAM обнаруживается в 35 % опухолей гепацителлюлярного происхождения, и по номенклатуре, предложенной Ямашита с соавт., EpCAM и АФП-позитивные опухоли относятся к подтипу гепацитоканцином, возникшим из печеночных стволовых клеток [8]. EpCAM-позитивные популяции клеток, выделенные из клеточных линий гепацитоканцином человека, содержат высоко туморогенные клеточные субпопуляции с характеристиками опухолевых стволовых, или опухолеиницилирующих клеток [9].

Ранее мы эксплантировали клетки асцитной гепацитомы Зайдела в культуру, и путем отбора прикрепляющихся к субстрату клеток от флоатирующих получили две клеточные линии – монослойную (ZH-ad) и суспензионную (Zd-fl), отличающиеся по уровням цитодифференцировки и туморогенности [10]. С целью выявления в составе асцитной гепацитомы Зайдела клеточных субпопуляций, обладающих опухолеиницилирующими свойствами и участвующих в диссеминации опухолевых клеток в организме, продолжено изучение культивируемых линий гепацитомы – проведено клонирование клеток с помощью метода предельных разведений, определение экспрессии клетками маркеров дисдифференцировки гепацитотов – EpCAM, Ov6 и SNAIL1, а также активности секретируемых ММП.

Материал и методы

Клетки монослойной и суспензионной линий гепатомы Зайдела *in vitro* культивировали в средах DMEM и RPMI-1640 (Биолот, Россия), соответственно, содержащих 10 % сыворотки крови плодов коровы (СПК) Sus-Biol (Биолот, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина, в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Клонирование клеток проводили с помощью метода предельных разведений [11]. Для получения одноклеточной суспензии клетки суспензионной линии дезагрегировали путем пипетирования при 37°C в течение 15 мин в 10 мл буфера следующего состава: 0.02 % ЭДТА, 0.8 % NaCl, 0.02 % KCl, 0.286 % Na₂HPO₄·12H₂O, 0.02 % KH₂PO₄ и 0.02 % глюкозы. Затем суспензию пропускали через нейлоновый фильтр, и клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин. Жизнеспособность клеток контролировали с помощью трипанового синего. Для проведения клоногенного анализа готовили клеточные суспензии из расчета 50–70 клеток на 10 мл соответствующей полной ростовой среды и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного планшета. На 2-е и 3-и сут планшеты просматривали под инвертированным микроскопом ЛОМО Биолам П-1 (объектив 2.5 - 10×, окуляр 6.3×) и отмечали лунки, содержащие не более одной клетки. Наблюдение за ростом клонов продолжалось в течение 2–3 нед и сопровождалось фотофиксацией с помощью цифровой камеры Canon PowerShot A1100 IS с 4х оптическим зумом.

Для определения туморогенности клональных линий клетки вводили внутрибрюшинно беспородным крысам-самцам (питомник “Рапполово” РАМН) в дозе 10–40×10⁶ клеток на крысу.

Маркеры дисдифференцировки гепатоцитов выявляли с помощью методов непрямой иммунофлуоресценции и иммуноблотинга с использованием поликлональных антител к EpCAM (A-20), Ov6 и SNAIL1 (G7) фирмы Santa-Cruz. Для проведения иммунофлуоресцентного анализа клетки монослойных линий выращивали в среде DMEM с добавлением 10 % СПК в чашках Петри с вложенными покровными стеклами. Клетки суспензионных линий осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин, промывали раствором 0.15 М NaCl, приготовленном на 0.01 М натрий-фосфатном буфере (ФБС). Клетки суспендировали в капле 0.04 М раствора NaCl и наносили на покровное стекло; через 1 мин аккуратно удаляли избыток жидкости и в потоке воздуха подсушивали мазок. Клетки на покровных стеклах фиксировали 4 %-ным раствором параформальдегида в ФБС в течение 15 мин и пермеабелизировали 0.5%-ным раствором Тритона X-100.

Неспецифическое связывание антител блокировали 3%-ной нормальной ослиной сывороткой. Обработку клеток первыми антителами проводили при разведении 1/50 в течение 24 ч при 4 °С, вторыми – при разведении 1/100 в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Анализ проводили с использованием микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal.

Для проведения иммуноблотинга клетки лизировали в ФБС, содержащем 0.1 % SDS, 0.5 % Тритон X-100, ингибиторы протеаз и фенилметилсульфонилфторид. Белки разделяли с помощью SDS-электрофореза в 12.5%-ном полиакриламидном геле с последующим иммуноблотингом.

Протеолитическую активность секретируемых ММП оценивали с помощью метода зимографии, как описано ранее [12]. В качестве образцов были взяты пробы среды, кондиционированной исследуемыми клетками на 4-е сут их культивирования.

Результаты

Клонирование клеток с помощью метода предельных разведений. Впервые три типа колоний, отличающихся по морфологии и пролиферативному потенциалу, были обнаружены при клонировании кератиноцитов человека, а термины голоклон (holoclone), мероклон (meroclone) и параклон (paraclone) стали синонимами клонов, происходящих от стволовой клетки и транзитных амплифицированных клеток-предшественников ранней и поздней стадий, соответственно [13]. Клеточные линии опухолей эпителиального происхождения при клонировании также формируют три типа клонов, а "тест на голоклоны", состоящие из самообновляющихся опухолеиницирующих клеток, стал суррогатным тестом на опухолевые стволовые клетки [11]. При клонировании клеток суспензионной линии гепатомы Зайдела мы выявили три типа образующихся клонов – неприкрепляющиеся сферические клоны и два типа монослойных клонов, различающихся по пролиферативному потенциалу, форме колоний и клеточному составу. Сферические клоны образуются в результате деления неприкрепленной к субстрату клетки. Достигая критических размеров, флотирующие колонии расщепляются на островки меньших размеров и одиночные клетки, часть которых прикрепляется к субстрату и расплывается (рис. 1, А, Б). Формирование сферических клонов в полной ростовой среде выявлено впервые и не описано в литературе. Два типа монослойных колоний, образованных клетками суспензионной линии, соответствуют меро- (рис. 1, В) и параклонам (рис. 1, Г).

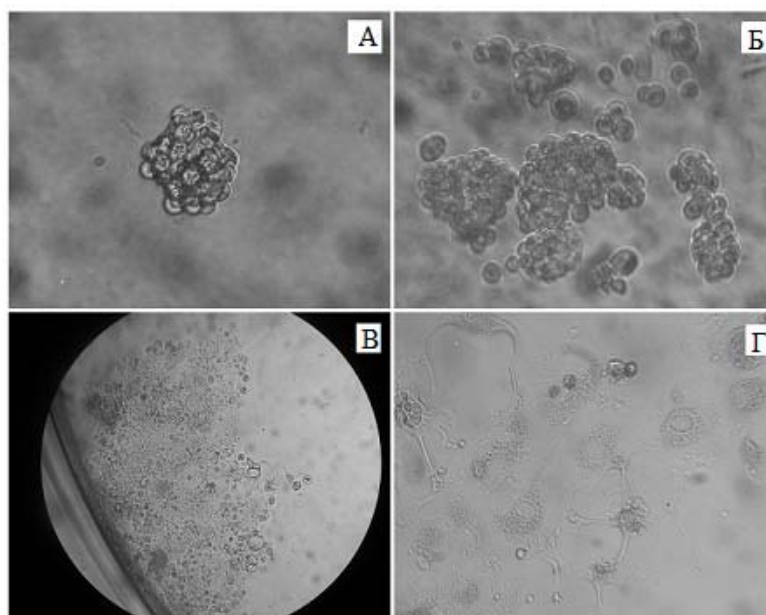


Рис. 1. Формирование сферического клона, меро- и параклонов при клонировании клеток суспензионной линии гепатомы Зайдела. А – сферический неприкрепляющийся к субстрату клон 1С, 6 сут., 10х; Б – флотирующие островки того же клона на 10 сут., 10х; В – мероклон 4G, 10 сут., 2.5х; Г – погибающие клетки параклона 10F, 14 сут., 10х.

С разрастанием мероклонов в среде появляются флотирующие клеточные кластеры, которые отделяются от монослоя в результате спонтанного открепления (*shedding*). В то же время не исключено, что в составе мероклонов (переходная форма между голоклонами и параклонами) присутствуют клетки-предшественники, способные генерировать сферические колонии. Клетки параклонов обладают низким пролиферативным потенциалом и через 2 недели их рост прекращается. Получены 3 клональные линии клеток: 1С – в результате экспансии сферического клона, 4G и 10Е – из мероклонов. При культивировании *in vitro* все три линии преимущественно состоят из флотирующих клеток.

При клонировании клеток монослойной линии получено 6 отличающихся по форме клонов, два из которых – 3Н и 6Н – классические компактные голоклоны округлой формы с четко очерченной границей образованы плотно упакованными мелкими клетками (рис. 2, А, В). Клон 5F в первые дни формирования похож на голоклон, но по мере развития утрачивает округлую форму и правильный контур (рис. 2, Б). Клон 1F состоит из “разбегающихся”, почти не контактирующих между собой клеток с низким пролиферативным потенциалом, и по своим характеристикам соответствует параклонам (рис. не представлен). Через две недели культивирования клон состоит из погибающих клеток. Два других клона – 1Е и 9С – мероклоны имеют неправильную форму и изрезанную пограничную линию (рис. 2, Г, Д). В результате

культивирования клеток голо- и мероклонов получены 5 клональных монослойных линий гепатомы Зайдела – 1Е, 3Н, 5F, 6Н и 9С.

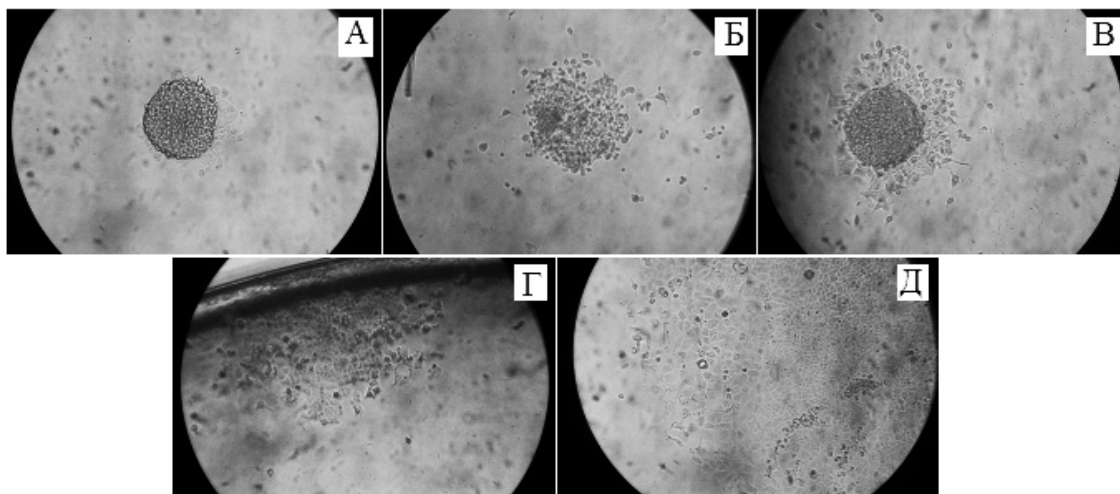


Рис. 2. Формирование голо- и мероклонов при клонировании клеток монослойной линии гепатомы Зайдела. А, Б, В – голоклоны 3Н, 5F и 6Н, соответственно; Г, Д – мероклоны 1Е и 9С; 2,5х.

Определение туморогенности клональных линий гепатомы Зайдела.

Туморогенность клеточных линий является основным доказательством наличия в их составе субпопуляции опухолеиницирующих клеток. Как правило, тест на туморогенность проводят на иммунодефицитных бестимусных голых мышах. В нашем исследовании туморогенность клональных клеточных линий *in vivo* определяли на иммунокомпетентных беспородных крысах-самцах, обычно используемых нами для ведения перевиваемой асцитной гепатомы Зайдела. Клетки клональных линий 1С, 4G и 10Е, полученных при клонировании суспензионной линии, вводили животным внутривентриально в дозе 1×10^7 на одну крысу. Развитие асцитной формы опухоли у двух животных из четырех наблюдалось через 4 недели только после введения клеток сферического клона 1С. При введении животным клональных линий, полученных из голо- и мероклонов монослойной культуры, доза варьировала в пределах $10\text{--}40 \times 10^6$ клеток на крысу. В этом случае развитие малигнизированного асцита происходило у одной крысы из трех в течение трех недель только после введения клеток голоклонов 5F и 6Н в дозе 20×10^6 (рис. 3).

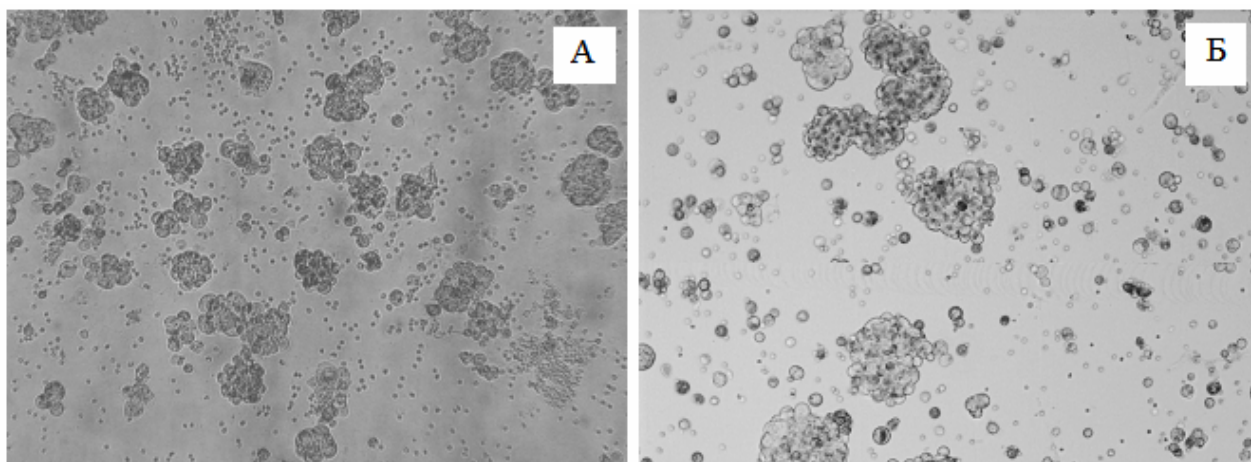


Рис. 3. Развитие асцитной формы гепатомы Зайдела при внутрибрюшинном введении крысам клеток клональных линий 6H (А) и 5F(Б): образование многоклеточных кластеров.

Фенотипирование клеток культивируемых линий гепатомы Зайдела. Для выявления в клетках гепатомы Зайдела опухолеассоциированных антигенов ErCAM, Ov6 и SNAIL1 использовали методы иммунофлуоресцентного анализа и иммуноблотинга. С помощью поликлональных антител, полученных против ErICD, показана внутриклеточная локализация ErCAM в клетках гепатомы Зайдела. Причем многоклеточные островки суспензионной линии и ее клонов (рис. 4, А–В) отличаются интенсивным точечным свечением в районе ядра, тогда как для клеток монослойных линий характерно диффузное распределение флуоресцентной метки в цитоплазме (рис. 4, Г–И). Интенсивность флуоресценции клеток монослойных клональных линий оценивали в усл. ед. с помощью программы анализа изображений ImageJ (NIH, USA). Высокий уровень флуоресценции клеток обнаружен для голоклонов, тогда как клетки мероклонов отличаются умеренным, или даже слабым свечением (линия 9С).

При обработке клеток моноклональными антителами к Ov6 и SNAIL1 наблюдается слабое диффузное свечение цитоплазмы клеток, уровень которого мало отличается от контрольных значений, что не позволяет на основании иммунофлуоресцентного анализа судить об экспрессии этих маркеров клетками.

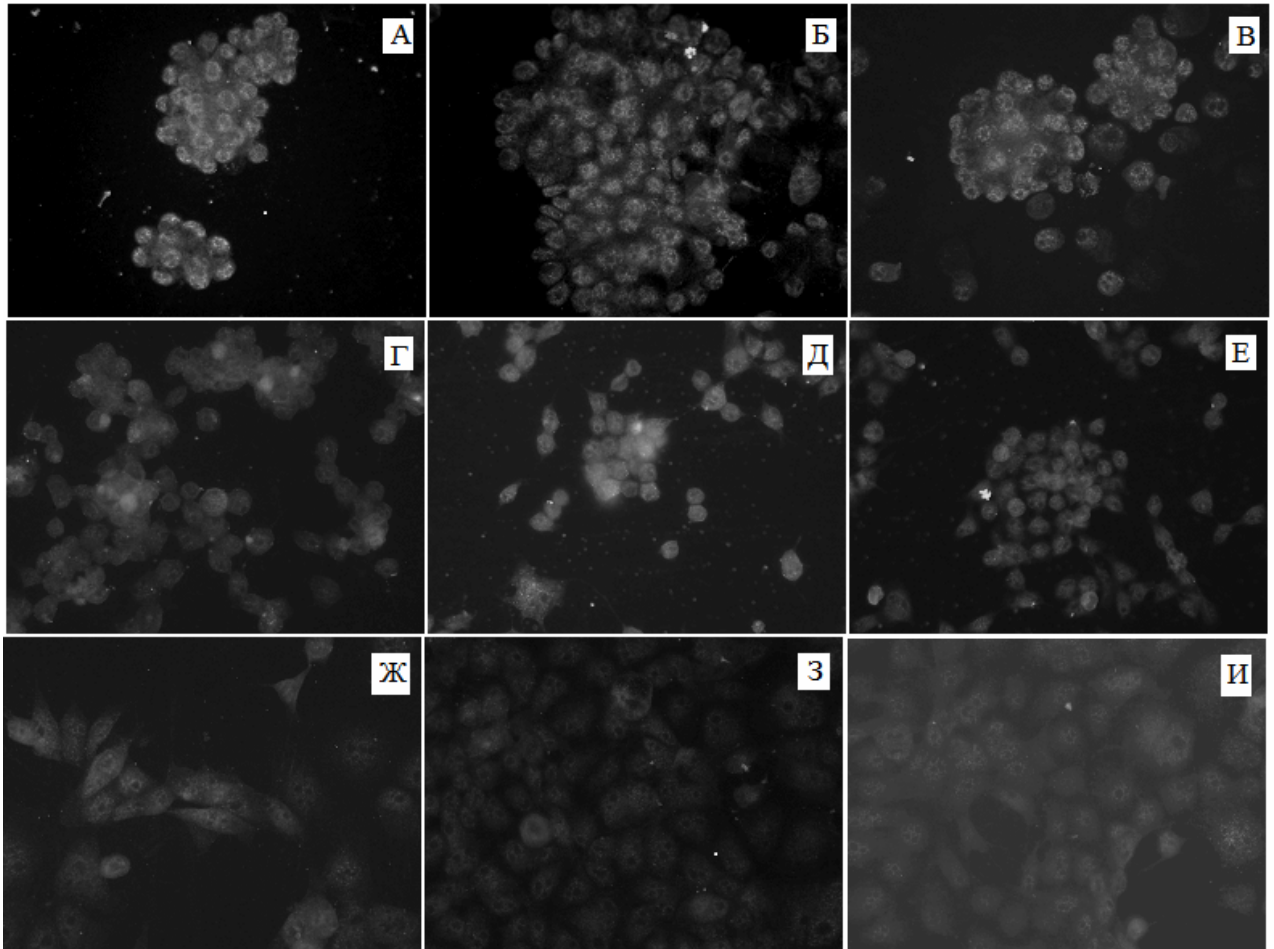


Рис. 4. Экспрессия EpCAM клетками гепатомы Зайдела. А – суспензионная линия; Б, В – клональные линии 1С и 10Е, соответственно; Г, Д, Е – клональные линии 3Н, 5F и 6Н, полученные из голоклонов, соответственно; Ж, З – клональные линии 1Е и 9С, полученные из мероклонов, соответственно; И – монослойная линия; 40х.

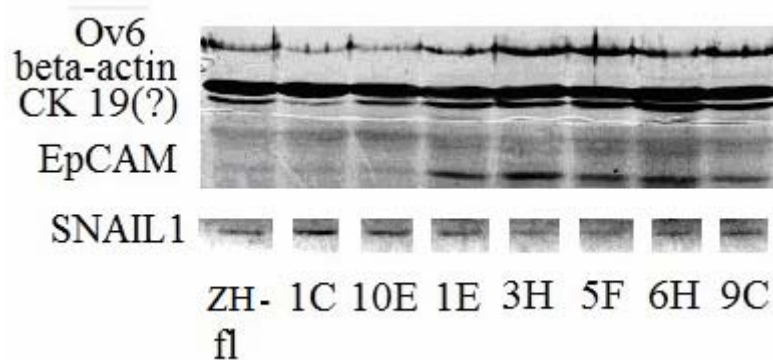


Рис. 5. Выявление маркеров дисдифференцировки гепатоцитов – EpCAM, Ov6 и SNAIL1 – с помощью метода иммуноблоттинга.

В то же время все антитела успешно взаимодействуют с маркерами дисдифференцировки при анализе клеточных лизатов с помощью метода иммуноблоттинга (рис. 5). В клетках клональных линий, полученных при клонировании монослойной линии, выявлена полоса с

Мол.м. 32 кДа, соответствующая ЕрСAM. При этом, несмотря на интенсивную флуоресценцию многоклеточных островков, антитела к ЕрСAM не реагируют с антигенами клеточных лизатов суспензионной линии и ее клонов.

При обработке блота антителами к Ovb в составе всех клеточных линий выявляется протеин с Мол.м. 56 кДа, соответствующий маркеру овальных клеток Ovb. По данным литературы цитокератин (СК) Ovb имеет общие эпитопы с СК19, который также синтезируется овальными клетками и тесно связан с повышенной инвазивностью и устойчивостью клеток к химиотерапевтическим препаратам. Показано, что антитела к Ovb также связываются с СК19, поэтому выявленная нами в клетках гепатомы Зайдела тонкая четкая полоса в области 40 кДа, по-видимому, соответствует СК19. При обработке блота антителами к SNAIL1 обнаруживается слабая полоса в области 36 кДа, соответствующая маркеру эпителиально-мезенхимного перехода. Однако не выявлены различия в экспрессии SNAIL1 клетками суспензионных и монослойных линий, или между клональными линиями голо- и мероклонов

Определение активности секретируемых матриксных металлопротеиназ.

Активность ММП 9, 2 и 1 определяли в культуральной среде на 4-е сутки культивирования клеток с помощью метода зимографии на желатине и казеине, соответственно (рис. 6).

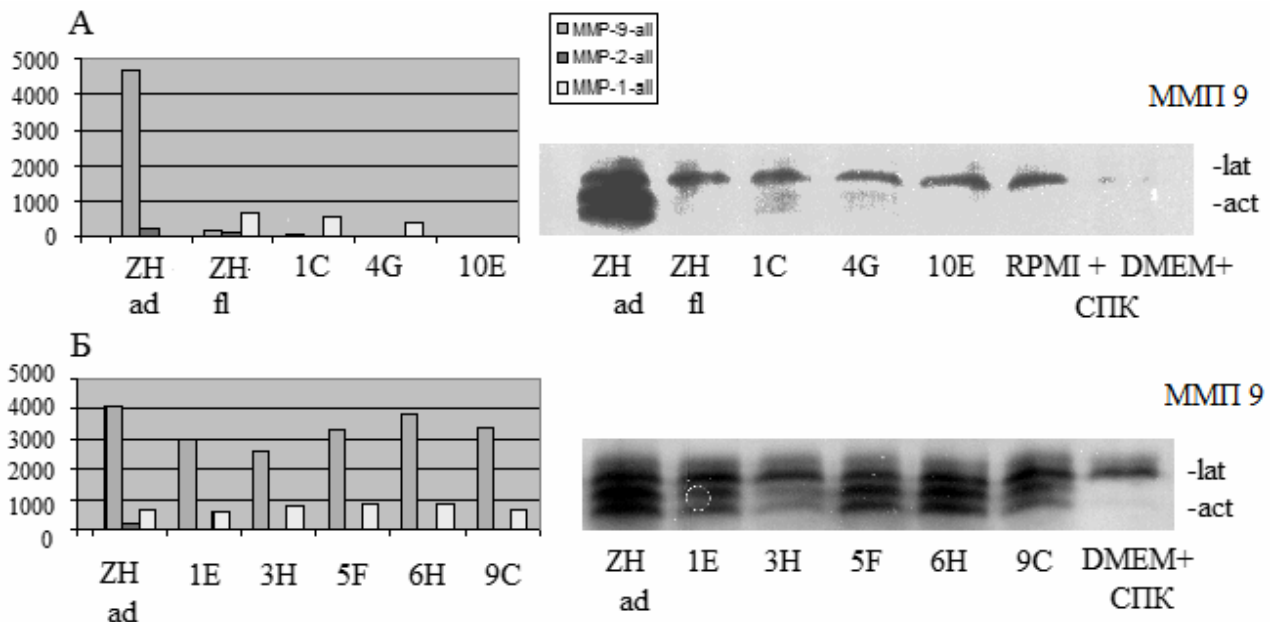


Рис. 6. Определение активности матриксных металлопротеиназ с помощью метода зимографии.

Выявлены принципиальные различия в активности одной из трех протеиназ – ММП 9 – для клеток монослойных и суспензионных линий гепатомы Зайдела: клетки монослойной линии и ее клонов характеризуются высокой суммарной активностью ММП 9 (рис. 6, Б – диаграмма) за счет активных форм ММП 9 (рис. 6, Б – зимограмма), тогда как в культуральной среде

флотирующих островков суммарная активность ММП 9 практически отсутствует (рис.6, А - диаграмма, зимограмма). Важно также отметить, что клетки клональных линий, полученных из голо- и мероклонов, не только характеризуются очень высоким уровнем активности ММП 9, но и близки между собой по этому показателю.

Обсуждение

Для выявления в составе монослойной и суспензионной линий гепатомы Зайдела субпопуляций опухолевых стволовых клеток и их фенотипирования в нашей работе был использован “тест на голоклоны”. Мероклоны изучены в меньшей степени, и данные по их клеточному составу и опухолеиницирующему потенциалу противоречивы. Клонирование клеток монослойных и флотирующих линий гепатомы Зайдела с помощью метода предельных разведений демонстрирует значительную гетерогенность клеточного состава метастатической опухоли. Впервые обнаружено формирование клетками суспензионной линии неприкрепляющихся сферических клонов, а также мероклонов, клетки которых стремятся к откреплению от субстрата. Важно отметить, что сферические клоны обладают более высоким уровнем туморогенности, чем голоклоны. На наш взгляд, сферические клоны являются аналогами голоклонов, формирующихся при клонировании монослойных культур кератиноцитов и опухолевых клеток иного происхождения, и содержат субпопуляцию злокачественных опухолеиницирующих клеток. Можно ожидать, что в клетках суспензионных линий, в которых ЕрСAM не определяется с помощью метода иммуноблоттинга, происходит регулируемый внутримембранный протеолиз ЕрСAM с образованием низкомолекулярных фрагментов ЕрICD (6кДА), которые мигрируют в низкомолекулярную область геля.

Все клетки гепатомы Зайдела синтезируют ЕрСAM, Ov6 и СК19, что, по-видимому, указывает на происхождение опухоли от низкодифференцированных овальных клеток. Также во всех клетках монослойных и суспензионных линий, голо- и мероклонов обнаружен синтез SNAIL1, при том, что активация ММП 9 – другого маркера эпителиально-мезенхимного перехода – связана только с монослойными линиями гепатомы. По данным литературы существуют SNAIL1-негативные и SNAIL1-позитивные линии опухолевых клеток с цитоплазматической локализацией SNAIL1. Процесс эпителиально-мезенхимного перехода связан с ядерной экспрессией SNAIL1, но даже при низком его содержании в цитоплазме существует возможность быстрого ответа на изменившееся микроокружение с модуляцией SNAIL-чувствительных генов [14]. Требуются дальнейшие исследования для решения вопроса об участии клеток монослойных линий в процессе метастазирования.

Представленные в работе данные позволяют сделать заключение о гетерогенности субпопуляции опухолеиницирующих клеток гепатомы Зайдела, клетки которой различаются по адгезивности, характеру экспрессии EpCAM и активности ММП 9.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 12-04-0115-а).

Список литературы

1. **Зайдела Ф.** Применение асцитной гепатомы для изучения цитологии рака. Вопросы онкологии, 1963, 9(5): 25–33.
2. **Терюкова Н.П., Миргородская О.А., Серебрякова М.В., Иванов В.А.** Выявление и идентификация опухлеассоциированных антигенов в составе фракции, обогащенной плазматическими мембранами клеток асцитной гепатомы Зайдела. Цитология, 2010, 52(10): 827–834.
3. **Schmelzer E., Wauthier E., Reid L.M.** The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. Stem Cells, 2006, 24:1852–1858.
4. **Yamashita T., Budhu A., Forgues M., Wang X.W.** Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. Cancer Res., 2007, 67:10831–10839.
5. **Yang M., Li S.N., Anjum K.M., Gui L.X., Zhu S.S., Liu J., Chen J.K., Liu Q.F., Ye G.D., Wang W.J., Wu J.F., Cai W.Y., Sun G.B., Liu Y.J., Liu R.F., Zhang Z.M., Li B.A.** A double-negative feedback loop between Wnt- β -catenin signaling and HNF4 α regulates epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. J. Cell Sci., 2013, 126 (Pt 24): 5692–5703.
6. **Lin C.W., Liao M.Y., Lin W.W., Wang Y.P., Lu T.Y., Wu H.C.** Epithelial cell adhesion molecule regulates tumor initiation and tumorigenesis via activating reprogramming factors and epithelial-mesenchymal transition gene expression in colon cancer. J. Biol. Chem., 2012, 287: 39449–39459.
7. **Munz M., Baeuerle P.A., Gires O.** The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. Cancer Res., 2009, 69: 5627–5629.
8. **Yamashita T., Ji J., Budhu A., Forgues M., Yang W., Wang H.Y., Jia H., Ye Q., Qin L.X., Wauthier E., Reid L.M., Minato H., Honda M., Kaneko S., Tang Z.Y., Wang X.W.** EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. Gastroenterology, 2009, 136: 1012–1024.
9. **Kimura O., Takahashi T., Ishii N., Inoue Y., Ueno Y., Kogure T., Fukushima K., Shiina M., Yamagiwa Y., Kondo Y., Inoue J., Kakazu E., Iwasaki T., Kawagishi N., Shimosegawa T., Sugamura K.** Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. Cancer Sci. 2010, 101: 2145–2155.
10. **Терюкова Н.П., Блинова Г.И., Иванов В.А.** Клетки гепатомы Зайдела при культивировании in vitro. Цитология, 2013, 55(1): 36–44.
11. **Li H., Chen X., Calhoun-Davis T., Claypool K., Tang D.G.** PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. Cancer Res., 2008, 68:1820–1825.
12. **Воронкина И.В., Кирпичникова К.М., Смагина Л.В., Гамалей И.А.** Изменение активности матриксных металлопротеиназ нормальных и трансформированных фибробластов мыши при действии антиоксидантов. Цитология, 2008, 50 (10): 877–881.
13. **Barrandon Y., Green H.** Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84: 2302–2306.

14. Domínguez D., Montserrat-Sentís B., Virgós-Soler A., Guaita S., Grueso J., Porta M., Puig I., Baulida J., Francí C., García de Herreros A. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.*, 2003, 23: 5078–5089.

ВЫЯВЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКОЙ СТАДИИ АВТОНОМНОСТИ ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

Н.Н. Круглова, А.Е. Зинатуллина

Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, Kruglova@anrb.ru

В экспериментальных условиях эмбриокультуры *in vitro* с использованием безгормональной питательной среды выявлено, что сформированный зародыш пшеницы (17.5–20 сут после опыления, длина 2,1–2,2 мм), характеризующийся наличием всех типичных для зародышей злаков органов, соответствует стадии автономности.

Ключевые слова: эмбриокультура *in vitro*, автономность зародыша, яровая мягкая пшеница.

В многочисленных исследованиях эмбриогенеза растений установлено, что развитие зародыша растений представляет собой единый процесс, в результате которого из одной исходной клетки – зиготы – формируется зрелый зародыш, обладающий всеми морфогенетическими потенциями взрослого растения. Вместе с тем в своем развитии зародыш проходит через ряд дискретных стадий (или, в терминологии различных авторов – периодов, фаз, этапов), различающихся по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, значению для дальнейшего развития растения. Каждая из стадий эмбриогенеза, несмотря на все разнообразие происходящих в это время процессов, направлена на реализацию как морфогенетического потенциала зародыша, так и онтогенетической программы особи в целом [1].

Системный подход к дифференциации зародыша с учетом морфогенетических и морфофизиологических корреляций позволил выявить ряд критических стадий эмбриогенеза растений, во время которых закрепляется жесткая детерминация пути развития зародыша. Последовательные стадии развития зародыша рассматриваются как процесс, при котором в различные критические точки времени и пространства происходит переключение на

альтернативные пути, а те или иные части организма становятся «детерминированными» в отношении их дальнейшей дифференциации. В целом зародыш демонстрирует свойства динамичной системы с пульсирующим характером функционирования своих элементов [2].

Одна из критических стадий эмбриогенеза растений – автономность зародыша как особое структурно-функциональное состояние развивающегося организма, отражающее его способность к саморегуляции, независимость от окружающих тканей и проявляющееся в его способности завершить нормальный эмбриогенез вне материнского организма. Автономность зародыша может рассматриваться как один из этапов автономизации онтогенеза, с которого зародыш (новый спорофит) переходит на относительно самостоятельный путь развития [3].

Высказано мнение, что стадия автономности зародыша для цветковых растений разных таксонов будет совершенно различна, поскольку определяется в основном специфичной генетикой, т.е. разнообразием структур материнского организма, которые окружают зародыш и обуславливают как специфику его строения и развития, так и особенности формирования проростка и растения в целом [2]. Предложен экспериментальный способ выявления стадии автономности зародыша с помощью метода эмбриокультуры *in vitro* разновозрастных зародышей по способности изолированного зародыша завершить нормальный эмбриогенез и дать в условиях *in vitro* нормальный проросток на простой безгормональной среде [3]. Такой подход вполне оправдан. Действительно, с одной стороны, именно культура *in vitro* позволяет создать условия для наиболее полной реализации всех (в том числе потенциальных) онтогенетических программ развития зародыша, а значит, и особи в целом, поскольку зародыш обладает всеми морфогенетическими потенциями взрослого организма. С другой стороны, именно в культуре *in vitro* экспериментатор может моделировать условия материнского организма и выявить ту стадию эмбриогенеза, когда зародыш способен к дальнейшей дифференциации и прорастанию во взрослое нормальное растение независимо от экзогенных гормонов питательной среды. В то же время, по нашему мнению, следует дать оценку автономности зародыша не только по признаку формирования нормального проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка полноценного фертильного растения далее, в условиях развития *ex vitro*.

Цель исследования состояла в выявлении стадии автономности зародыша яровой мягкой пшеницы с помощью метода эмбриокультуры *in vitro* и определении цито-гистологического статуса автономного зародыша.

Материал и методы

В качестве объекта исследования использовали сорт яровой мягкой пшеницы Симбирка, перспективный для климатической зоны Южного Урала и районированный в Республике Башкортостан в 1988 г. Сорт выведен на Ульяновской государственной сельскохозяйственной опытной станции с помощью метода индивидуального отбора из гибридной комбинации (Минская х Безостая) х Саратовская 36 [4]. Ранее нами [5] для растений этого сорта в условиях культуры *in vitro* отмечены как сохранение жизнеспособности зародышей, так и способность их к дальнейшему развитию. Семена были любезно предоставлены лабораторией селекции яровой пшеницы Башкирского НИИ СХ РАСХН (заведующий лабораторией – к. с.-х.н. В.И. Никонов) согласно Договору о творческом сотрудничестве на 2011-2015 гг.

Растения выращивали в полевых условиях согласно рекомендациям Доспехова Б.А. [6] на экспериментальных участках научного стационара Уфимского Института биологии РАН (Уфимский район). Вели фенологические наблюдения за их сезонным ритмом роста и развития по методике Челак В.Р. [7].

Использовали метод эмбриокультуры *in vitro* яровой мягкой пшеницы с учетом оригинальных методических нюансов [8]. При этом для культивирования использовали незрелые зародыши, изолированные после искусственного опыления на следующих стадиях эмбриогенеза согласно авторской периодизации [9]: четырехклеточный зародыш (2.5 сут после опыления, длина зародыша 0,12–0,14 мм); многоклеточный зародыш (3.0–4.0 сут после опыления, длина зародыша 0,15–0,2 мм); органогенез в трех подстадиях: подстадия 1 (4.5–8.0 сут после опыления, длина зародыша 0,4–0,6 мм), подстадия 2 (8.5–12.0 сут после опыления, длина зародыша 0,8–1,3 мм), подстадия 3 (12.5–17.0 сут после опыления, длина зародыша 1,5–2,0 мм); сформированный зародыш (17.5–20.0 сут после опыления, длина зародыша 2,1–2,2 мм). Незрелые зародыши на стадии зиготы и стадии двуклеточного зародыша в экспериментах не использовали: миниатюрность зародышей на этих стадиях эмбриогенеза представляет значительную методическую трудность.

Часть зародышей на всех выделенных этапах эмбриогенеза изучали с применением цитогистологических методов, модифицированных применительно к биотехнологическим исследованиям [10]. Для этого зародыши фиксировали в реактиве Чемберлена (этиловый спирт 70%-ный – 90 частей, формалин 40%-ный – 5 частей, уксусная кислота ледяная – 5 частей) и готовили постоянные препараты, которые окрашивали 2%-ным ацетокармином и

0.1%-ным алциановым синим. Препараты просматривали и фотографировали при помощи микровизора проходящего света μ VIZO-103 (ОАО «ЛОМО», г. Санкт-Петербург).

Инокулируемые зародыши размещали щитком вниз на индукционную питательную среду, составленную по полной прописи Murashige, Skoog [11], с добавлением в качестве гормонального компонента синтетического аналога ауксина 2,4-Д в различной концентрации: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 мг/л. Культивирование проводили в темноте, при температуре +26°C. В контроле гормональный компонент не добавлялся.

Проводили морфологический анализ сформировавшихся каллусов, отмечая их цвет, форму, плотность. Образовавшиеся проростки в фенофазе 3-го листа переносили на среду для регенерации, составленную по традиционной прописи Blaydes [12], с добавлением в качестве гормонального компонента 0.2 мг/л кинетина. Растения-регенеранты в фенофазе кущения переносили в почвенные условия вегетационного сосуда и вели наблюдения за их дальнейшим развитием.

Результаты

Анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует о следующем:

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на стадиях четырехклеточного и многоклеточного зародыша, на подстадии 1 стадии органогенеза при всех концентрациях 2,4-Д в питательной среде и в контроле ответной реакции зародышей не наблюдали. Такие зародыши постепенно дегенерировали.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 2 стадии органогенеза на всех вариантах сред с 2,4-Д через 5–7 сут культивирования наблюдали формирование неморфогенных обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции. Пролиферация каллусов была скудной, и в ходе дальнейшего культивирования такие каллусы постепенно дегенерировали. В контрольном варианте каллусообразования не наблюдали, экспланты постепенно дегенерировали.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза, через 5–7 суток культивирования при концентрации 2,4-Д в питательной среде 1.0–3.0 мг/л наблюдали формирование морфогенных каллусов плотной компактной консистенции, матового желтовато-белого цвета, узловатой формы. В остальных случаях, в том числе в контрольном варианте, формировались неморфогенные каллусы.

Сформированные зародыши после 10–12 сут культивирования *in vitro* на безгормональной питательной среде без 2,4-Д (контроль) давали начало проросткам и далее, после переноса

на среду для регенерации и в почвенные условия *ex vitro*, – нормальные фертильные растения. При культивировании сформированных зародышей на питательной среде с добавлением 2,4-Д (все концентрации) через 5–7 сут наблюдали образование неморфогенного водянистого каллуса.

Обсуждение

Автономным следует считать сформированный зародыш, имеющий определенный уровень эндогенных регуляторов роста, обеспечивающих в сочетании с другими веществами его дальнейшее нормальное прорастание. Согласно полученным цито-гистологическим данным, такой зародыш характеризуется наличием всех типичных для зародышей злаков органов: щиток (семядоля), лигула, колеоптиль, колеориза, эпибласт, дифференцированная почечка, состоящая из апекса побега и зачатков первого, второго и третьего листьев, зародышевый корень с корневым чехликом. Со стороны щитка зародыш окружен эндоспермом.

Полученные результаты подтвердили высказанное нами предположение о том, что оценку автономности зародыша следует давать не только по признаку формирования нормального проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка полноценного фертильного растения в условиях *ex vitro*.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта по программе «Ведущие научные школы РФ» № НШ-5282.2014.4 (лидер школы – член-корр. РАН Т.Б. Батыгина).

Список литературы

1. **Батыгина Т.Б.** Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей. Физиология растений, 1999, 46 (6): 884–898.
2. **Батыгина Т.Б., Васильева В.Е.** Целесообразность системного подхода к проблеме дифференциации зародыша покрытосеменных растений. Онтогенез, 1983, 14 (3): 304–311.
3. **Батыгина Т.Б.** Хлебное зерно. Л.: Наука, 1987. 103 с.
4. Характеристика сортов сельскохозяйственных культур, включенных в Госреестр по Республике Башкортостан. Под ред. Д.Б. Гареева. Уфа, 1997. 96 с.
5. **Круглова Н.Н., Катасонова А.А.** Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплантат. Физиология и биохимия культурных растений, 2009, 41 (2): 121–131.
6. **Доспехов Б.А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
7. **Челак В.Р.** Система размножения пшеницы *Triticum* L. Кишинев: Штиинца, 1991. 320 с.
8. **Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А.** Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
9. **Круглова Н.Н.** Периодизация развития зародыша пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок. Известия Уфимского научного центра Российской академии наук, 2012, 2: 21–24.
10. **Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Зинатуллина А.Е.** Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. Уфа: Гилем, 2013. 128 с.

11. **Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15 (3): 473–497.

12. **Blaydes D.F.** Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean. *Physiol. Plant.*, 1966, 19 (3): 748–753.

ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦИТОКИНИНОВ НА НАЧАЛЬНОМ ЭТАПЕ ПОЛИЭМБРИОИДОГЕНЕЗА *IN VITRO* ПШЕНИЦЫ

О.А. Сельдимирова, Д.Ю. Зайцев, Н.Н. Круглова

Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, Kruglova@anrb.ru

В экспериментальных условиях культуры *in vitro* выявлена иммунолокализация эндогенных цитокининов в клетках морфогенетических очагов и меристематических зон каллусов, а также в клетках формирующихся апексов побегов и корней развивающихся полиэмбрионидов пшеницы. Это свидетельствует об участии цитокининов в начальных этапах полиэмбрионидогенеза пшеницы *in vitro*.

Ключевые слова: культура *in vitro*, каллус, полиэмбрионид, яровая мягкая пшеница.

Использование нетрадиционных систем размножения в культуре *in vitro* – важное направление современных исследований в области биологии развития растений. Одна из таких систем размножения – эмбрионидогения, состоящая в формировании и развитии эмбриоида – зародышеподобной структуры – и дальнейшем развитии эмбриоида до полноценного растения [1], в том числе в каллусах *in vitro*. На примере пшеницы нами установлено образование в культуре *in vitro* особого типа эмбрионидов – полиэмбрионидов, для которых характерно формирование в их апикальной части множественных точек роста; выявлены основные этапы полиэмбрионидогенеза [2].

Полиэмбрионидогенез оценивается как частный случай морфогенеза – совокупности протекающих в развивающемся организме процессов дифференцировки клеток с образованием специализированных тканей и органов [3]. Важнейшая задача в области изучения этого пути морфогенеза состоит в выявлении связей между процессами, контролирующими развитие органов полиэмбриоида на клеточном и тканевом уровнях. Анализ экспериментальных данных и теоретических обобщений в области клеточной

культуры *in vitro* растений дает возможность предложить каллус в качестве удобной модели для исследования полиэмбриогенеза у растений [4].

Механизмы, контролирующие развитие клеток каллусов по конкретному пути морфогенеза *in vitro*, до настоящего времени окончательно не выяснены. В то же время установлено, что основными координаторами морфогенеза *in vitro* являются фитогормоны, в частности цитокинины и ауксины [5, 6]. Сформировалось представление о том, что характер деления и дифференцировки клеток, определяющий формирование органов растений в условиях *in vitro*, зависит от концентрации цитокининов и ауксинов в этих клетках [7]. Однако неизвестно, существуют ли какие-то особенности в распределении и накоплении фитогормонов, в том числе цитокининов, в тех клетках каллуса, из которых в дальнейшем сформируются полиэмбриониды и их органы. В связи с этим цель данной работы состояла в выявлении локализации эндогенных цитокининов в клетках каллусов пшеницы на начальных этапах полиэмбриогенеза *in vitro*.

Материал и методы

Материалом для исследования послужил сорт яровой мягкой пшеницы Башкирская 26. Для получения каллусов из незрелых зародышей (15 сут после искусственного опыления) использовали полную среду Murashige, Skoog [8], в состав которой был введен синтетический ауксин 2,4-Д в концентрации 2.0 мг/л. Каллусы культивировали в темноте при 26° С [9].

Растительный материал для выявления локализации цитокининов готовили согласно методике Веселова с соавт. [10]: каллусы фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и 0.1%-ном глутаровом альдегиде, отмывали в 0.1М фосфатном буфере (ФБ) (рН=7.3), обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, заключали в метакрилатную смолу JB-4. Полутонкие срезы каллусов получали с помощью ротационного микротомы НМ-325 (Microm, Germany).

Для иммунного окрашивания срезы обрабатывали ФБ, содержащим 0.2% желатина и 0.05% Tween 20, затем антизеатинрибозидной сывороткой кролика; промывали ФБ, содержащим 0.05% Tween 20 (ФoT); наносили меченные коллоидным золотом иммуноглобулины козы против антител кролика; промывали ФoT; обрабатывали препаратом серебра для усиления окрашивания.

Для гистологического анализа срезы окрашивали 0.2%-ным раствором толуидинового синего в 2.5%-ном растворе карбоната натрия [11]. Постоянные препараты анализировали и

фотографировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Результаты и обсуждение

Формирование каллусов наблюдали на 5–7 сут культивирования эксплантов *in vitro*. На начальных этапах развития каллусов (1-10 сут) выявлено интенсивное иммунное окрашивание в группах клеток, которые, по данным параллельно проведённого цитогистологического анализа, представляли собой морфогенетические очаги. Клетки, составляющие морфогенетические очаги, характеризуются как меристематические [12]. Хорошо известно, что цитокинины контролируют деление клеток, а также повышают аттрагирующую способность, характерную, как правило, именно для меристематических клеток [5]. Таким образом, локализация цитокининов, обнаруживаемая в меристематических клетках морфогенетических очагов, вполне ожидаема.

К 14–15 сут развития, по цито-гистологическим данным, первоначально однородные морфогенетические очаги становились трехслойными и состояли из центральной зоны слабовакуолизованных клеток, промежуточной зоны меристематических клеток и периферической зоны сильновакуолизованных клеток. Иммунное окрашивание выявило локализацию цитокининов в центральной и промежуточной зонах, при этом окрашивание клеток центральной зоны было относительно слабым. Имеются данные о влиянии цитокининов на процессы дифференцировки клеток [13], поэтому низкая интенсивность иммунного окрашивания клеток центральной зоны морфогенетического очага, возможно, являлась индикатором их дифференцированного состояния как паренхиматозных клеток. В то же время интенсивное окрашивание клеток промежуточной зоны подтверждало их меристематический статус.

Результаты цито-гистологического анализа показали, что к 24–26 сут морфогенетические очаги преобразовывались в меристематическую зону. При этом морфогенетические очаги увеличивались в размерах за счет делений клеток промежуточной зоны; клетки периферической зоны подвергались постепенной деструкции, а под слоем дегенерирующих клеток оформлялась зона, ориентированная параллельно поверхности каллуса. Ранее нами было установлено, что с деятельностью клеток меристематической зоны связана реализация различных путей морфогенеза *in vitro* в каллусах пшеницы различного происхождения [12].

Локализация цитокининов была выявлена именно в меристематической зоне, при этом иммунное окрашивание было равномерным и интенсивным во всех клетках. Это еще раз

свидетельствует о потенциале клеток меристематической зоны к дальнейшему полиэмбриоидогенезу как пути морфогенеза *in vitro*. Кроме того, дальнейшему развитию каллусных клеток по пути полиэмбриоидогенеза *in vitro*, по-видимому, может способствовать свойство цитокининов повышать способность клеток аккумулировать питательные вещества за счет их транспорта из других тканей, как это было показано для естественных условий [5].

Постепенно в каллусе формировался полиэмбриоид, развивались его органы – апексы побегов и корня. Иммуноокрашивание наблюдалось как в клетках формирующихся апексов побегов (на 30–32 сут развития), так и в клетках формирующихся корней (на 35–38 сут развития).

Согласно многочисленным данным [5–7; 14–15 и мн. др.], ауксины необходимы для формирования корней, а цитокинины – побегов; цитокинины рассматриваются как положительный регулятор роста побега, но отрицательный регулятор роста корня [5]. Однако полученные нами данные позволяют предположить, что цитокинины необходимы и для развития корня. Это согласуется с результатами изучения роли цитокининов в развитии корня в естественных условиях [16–18].

В целом, полученные нами данные о иммунолокализации эндогенных цитокининов в клетках морфогенетических очагов и меристематических зон каллусов пшеницы, а также в примордиях апексов побегов и корней формирующихся полиэмбриоидов в условиях *in vitro* свидетельствуют об участии этих гормонов в индукции и регуляции формирования органов растений на различных стадиях их развития.

Список литературы

1. **Батыгина Т.Б.** Эмбриоидогения – новый тип вегетативного размножения. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. Ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 2000: 334–349.
2. **Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Галин И.Р., Круглова Н.Н.** Структурные механизмы становления симметрии у микроспориальных эмбриоидов пшеницы: данные сканирующей электронной микроскопии. Известия Самарского научного центра РАН, 2013, 15 (3(5)): 1676–1679.
3. **Бутенко Р.Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999, 160 с.
4. **Круглова Н.Н.** Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения. Известия Уфимского научного центра РАН, 2011, 2: 32–35.
5. **Медведев С.С., Шарова Е.И.** Биология развития растений. Т. 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны: Учебник. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2011, 253 с.
6. **Cheng Z.J.** Pattern of Auxin and Cytokinin Responses for Shoot Meristem Induction Results from the Regulation of Cytokinin Biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. Plant Physiol., 2013, 161 (1): 240–251.

7. **Kakani A., Li G., Peng Z.** Role of AUX1 in the control of organ identity during *in vitro* organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin interaction in *Arabidopsis*. *Planta*, 2009, 229 (3): 645–657.
8. **Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15 (3): 473–497.
9. **Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А.** Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011, 124 с.
10. **Веселов С.Ю., Вальке Р.С., ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р.** Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака. *Физиология растений*, 1999, 46 (1): 34–40.
11. **Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений.** Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдиминова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, 2013, 128 с.
12. **Сельдиминова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н.** Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллюсах различного происхождения у пшеницы. *Физиология и биохимия культурных растений*, 2011, 43 (4): 297–306.
13. **Dello I.R.** Genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 2008, 322 (5906): 1380–1384.
14. **Brenner W.G., Schmulling T.** Transcript profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* roots and shoots discovers largely similar but also organ-specific responses. *BMC Plant Biol.*, 2012, 12 (1): 112–142.
15. **Yoshida S., Saiga S., Weijers D.** Auxin regulation of embryonic root formation. *Plant Cell Physiol.*, 2013, 54 (3): 325–332.
16. **Высоцкая Л.Б.** Содержание цитокининов в клетках разных зон корней пшеницы. *Цитология*, 2011, 53 (11): 884–890.
17. **Gupta S., Rashotte A.M.** Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. *Plant Cell Rep.*, 2012, 31 (5): 801–812.
18. **Zhao Y.** The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2008, 11 (1): 16–22.

ХАРАКТЕРИСТИКА КАРИОТИПА КЛЕТОК ЛИНИИ DXB-11, ДЕРИВАТА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА СНО-К1

В.И. Турилова, Т.С. Горячая, Т.К. Яковлева

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

Линии клеток яичника китайского хомячка СНО (Chinese hamster ovary) являются основой биотехнологического производства широкого спектра белков, используемых в фармакологических целях. Многообразие клеточных линий СНО, их культивирование в разных условиях и разных лабораториях, определяет необходимость цитогенетического контроля. С использованием метода дифференциального окрашивания хромосом на G-диски выполнен анализ кариотипа клеток линии DXB-11 (дериват клеток СНО-К1), дефицитных по

дигидрофолатредуктазе. Это первый анализ кариотипа клеточной линии DXB-11 из Российской коллекции клеточных культур. Показано, что модальный класс клеток (78%) содержал 20 хромосом при выраженной кариотипической гетерогенности, обусловленной неклональными хромосомными перестройками. В кариотипе клеток DXB-11 выявлено 6 нормальных и 14 структурно перестроенных хромосом, из которых происхождение 8-ми не установлено (маркерные хромосомы, *mar*1—*mar*8). При сравнении с кариотипом клеток родительской линии СНО-К1 (Филатов, Мамаева, 1985) в кариотипе клеток DXB-11 в неизменном виде сохранялись хромосомы 1-й и 5-й пар, хромосомы 8, 9 и ряд аномальных хромосом (*del*(2)(q11q22), *add*(6), *der*(X) и 5 маркерных хромосом). В то же время в клетках DXB-11 обнаружены специфичные для этой линии хромосомы *del*(2)(p16p25), *der*(6), *mar*7 и *mar*8. Появление этих хромосом в кариотипе клеток DXB-11 связано с перестройками хромосом 2 и 7, интактных в СНО-К1, а также фрагментацией и реаранжировками одной из аномальных хромосом кариотипа клеток СНО-К1. В целом, значительное сходство кариотипов клеток линий DXB-11 и СНО-К1 свидетельствует о стабильности генетического материала в клетках СНО.

Ключевые слова: клеточная линия китайского хомячка DXB-11, кариотип, кариотипическая гетерогенность.

Линии клеток яичника китайского хомячка СНО широко используются для синтеза рекомбинантных белков [1]. Клеточная линия DXB-11 получена из клеток СНО-К1 в результате химического мутагенеза с последующим гамма-облучением, и является радиационным мутантом с делецией одного аллеля гена дигидрофолатредуктазы (*dhfr*), локус 2p23 [2], и миссенс-мутацией (T137R) во втором аллеле [1, 3]. Двойная инактивация гена *dhfr* сделала эту клеточную линию удобной системой для введения генетических конструкций, содержащих функциональный ген *dhfr* и ген, продукт которого планируется синтезировать. Дальнейшая селекция рекомбинантных клеток в среде с добавлением метотрексата приводит к амплификации как гена *dhfr*, так и интересующего трансгена. Таким образом, клеточная линия DXB-11 служит родительской линией по отношению к получаемым на ее основе клеточным штаммам-продуцентам.

Многолетнее существование клеток линии DXB-11, культивирование их в разных условиях и разных лабораториях определяют необходимость цитогенетического контроля. Кроме того, кариологическая характеристика родительской линии важна для подтверждения клонального

происхождения штаммов-продуцентов, а также для определения влияния особенностей кариотипа родительских клеток на стабильность и продуктивность дериватных рекомбинантных клеточных штаммов. Хромосомы клеточной линии DXB-11 были представлены в публикации Milbrandt с соавторами [4] без детального анализа кариотипа. Целью настоящей работы был цитогенетический анализ и выявление особенностей кариотипа клеток DXB-11 по сравнению с клетками родительской линии СНО-К1.

Материал и методы

Для культивирования клеток постоянной линии DXB-11 (Российская коллекция клеточных культур) использовали ростовую среду, содержащую 90 % F12 (Биолот, Россия) и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Hy Clone standard, США). Клетки культивировали во флаконах площадью 25 см³ (Nunc, Дания) в атмосфере 5% CO₂ и 90 % влажности при 37 °С в течение 4 недель. Цитогенетический анализ клеточной линии DXB-11 проведен на 8-м пассаже после декриоконсервации (30 сут культивирования). Для накопления клеток в метафазе митоза в культуральную среду добавляли колцемид (CaroMax, Gibco, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл на 1 час. Препараты метафазных хромосом готовили с помощью общепринятого метода. Клетки обрабатывали гипотоническим раствором (0.075 М KCl) в течение 15 мин при комнатной температуре и фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты [3: 1]. Суспензию клеток раскапывали на охлажденные влажные предметные стекла. Дифференциальное окрашивание метафазных хромосом на G-диски выполняли по методу Ozkinay, Mitelman [5].

Модальное число хромосом и размах изменчивости клеток по числу хромосом определяли при их подсчете в 100 метафазных пластинках. Долю полиплоидных клеток в популяции оценивали при просмотре 1000 метафазных пластинок. Кариотипировали 25 метафазных пластинок.

Препараты анализировали под световым микроскопом AxioPhot (Opton, Германия). Для анализа кариотипов клеток использовали микроскоп Axio Imager. M1 (Carl Zeiss, Германия), оборудованный системой автоматического кариотипирования Ikaros4 Karyotyping System (MetaSystems, Германия). Идентификацию хромосом китайского хомячка, окрашенных на G-диски, проводили в соответствии с номенклатурой, предложенной Ray, Mohandas [6]. Кариотип и структурно перестроенные хромосомы описаны и представлены в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека, ISCN 2009 [7].

Результаты

Число хромосом в клетках DXB-11 варьировало от 18 до 22-х (табл. 1). Модальный класс клеток (78 %) содержал 20 хромосом. Уменьшение числа хромосом в кариотипе было связано с появлением дицентрических хромосом, а увеличение – с фрагментацией хромосом и присутствием их коротких и длинных плеч в виде самостоятельных хромосом. Доля полиплоидных клеток в популяции составляла 9.8 %.

Таблица 1

Распределение клеток по числу хромосом

Число хромосом в клетке	18	19	20	21	22
Число клеток	2	6	78	13	1

При ограниченной количественной изменчивости и четко выраженном модальном числе хромосом клетки DXB-11 характеризовались хромосомной нестабильностью и разнообразием структурных перестроек. Анализ 25 метафазных пластинок с числом хромосом, равным 20, показал, что 7 клеток (28 %) имели вариант кариотипа, представленный на рисунке. В составе кариотипа выявлено 6 нормальных и 14 структурно перестроенных хромосом, включая 8 маркерных, происхождение которых не установлено. В остальных 18 клетках (72 %) отмечены неповторяющиеся структурные перестройки с вовлечением разных хромосом кариотипа.

В кариотипе клеток DXB-11 среди нормальных хромосом только хромосомы 1-й и 5-й пар представлены двумя гомологами, хромосомы 8 и 9 – одним гомологом, остальные хромосомы структурно перестроены. Эти перестройки представляют собой сложную комбинацию делеций, инверсий и транслокаций хромосомного материала, что позволяет лишь частично идентифицировать материал нормальных хромосом в составе аномальных. Так, материал одного из гомологов хромосомы 3 присутствует в составе короткого плеча *mar1* (часть 3p) и длинного плеча *mar4* (часть 3q). *Mar6* по существу является структурно перестроенным вторым гомологом хромосомы 3. Материал хромосомы 4 распределен между *der(X)* и *mar1*, в которых частично присутствуют 4p и 4q, соответственно. Материал хромосомы 7 обнаруживается в составе *mar7*, а хромосомы X — предположительно в составе *mar8*. Небольшие размеры и реаранжировки хромосом 8, 9 и 10 не позволяют их выявить. По-видимому, материал этих хромосом находится в составе неидентифицированных хромосом.

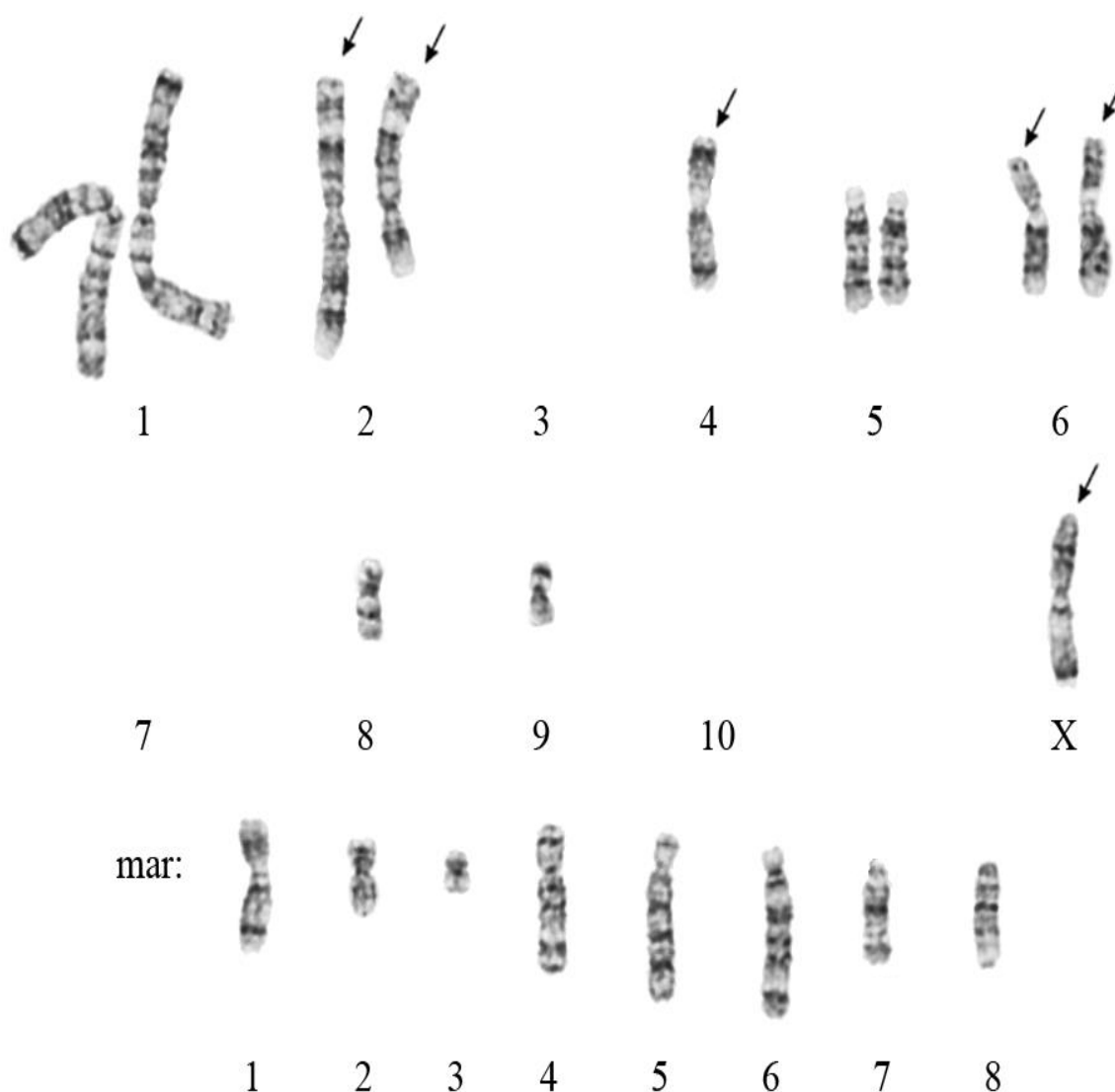


Рисунок. Вариант кариотипа клеток линии DXB-11.

20,-X,der(X)(Xpter→Xq11::?:4p21→4pter),del(2)(pter→p25::p16→qter),
del(2)(pter→q11::q22→qter),-3,-3,-4,del(4)(pter→q11::q12→qter),add(6)(?:p11→qter),
der(6)(?:6q14→6p13::6q14→6qter),-7,-7,-8,-9,-10,-10,+8mar.

mar1: der(?4)(3p?ter→3p21::?:?4cen→4q16::4q?:4q110→4qter),

mar3: der(?9)(?:9q21→9cen→9p12::?), mar4: der(?)(?→?cen→3q?13→3q27::?),

mar6: der(?3)(3?q12→3p27::3q13→3q27::?), mar7: der(?)(?→?cen::?:7q?13→7q?26::?).

Стрелками обозначены структурно перестроенные хромосомы.

В соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека (ISCN, 2009) к маркерам (mar) отнесены аномальные хромосомы, центромерный район которых не идентифицирован.

В редкие структурные перестройки с разной частотой вовлекались все хромосомы кариотипа. Наиболее нестабильными хромосомами оказались mar2 и mar5. Делеции разных районов длинного плеча (q-плеча) mar5 выявлены в 8 из 18 (44,4%) клеток. Перестройки mar2 — появление дополнительного материала на q-плече или делеции разных его локусов —

обнаружены в 7 из 18 (38,9%) клеток. Неоднократно в структурные перестройки, в основном, транслокации, вовлекались хромосомы 1, 4, 5, 8, add(6), mar6, mar7 и mar8.

В целом, несмотря на кариотипическую гетерогенность, между клетками не выявлено существенных различий по составу хромосомного материала, что свидетельствует о значительной сбалансированности кариотипа клеток DXB-11.

Обсуждение

Сравнительный анализ кариотипов клеток DXB-11 и СНО-К1 [Филатов, Мамаева, 8] показал, что обе клеточные линии имеют одинаковое гиподиплоидное число хромосом ($2n=20$), при этом в клетках DXB-11 структурно перестроенных хромосом было больше. Представляет интерес сопоставить состав нормальных и перестроенных хромосом в клетках этих линий.

При первом описании кариотипа клеток линии СНО в 1969 г. 9 рутинно окрашенных аномальных хромосом были обозначены буквой Z [9]. При анализе кариотипа с использованием дифференциального окрашивания хромосом, 13 перестроенных хромосом клеток СНО были идентифицированы и обозначены Z1—Z13 [10]. В настоящей работе сопоставление структурно перестроенных хромосом клеток линий DXB-11 и СНО-К1 проведено в соответствии с описанием хромосом клеточной линии СНО, представленном в работе Deaven, Petersen [10].

В отличие от клеток СНО-К1, в кариотипе которых было обнаружено 9 нормальных и 11 аномальных хромосом [8], в клетках DXB-11 в результате структурных перестроек хромосом 2, 4 и 7 число аномальных хромосом увеличилось до 14 (табл. 2).

Сравнительный анализ состава нормальных и структурно перестроенных хромосом в трех родственных линиях СНО показал, что хромосомы 1-й и 5-й пар, 8, 9, а также аномальные хромосомы del(2)(q11q22), add(6), mar1, mar2, mar6, возможно, del(4) и mar3, являются общими для всех линий (табл. 2).

Маркерные хромосомы mar4 и mar5, а также der(X) отсутствуют в клетках СНО, характерны для клеток СНО-К1 и сохраняются в клетках DXB-11. Аномальные хромосомы del(2)(p16p25), der(6), mar7 и mar8 специфичны для клеток DXB-11 и отличают их от клеток СНО-К1. Так, появление аномальной хромосомы del(2)(p16p25) связано со способом получения клеточной линии DXB-11 и делецией локуса гена *dhfr*. Вместо der(6), выявленного в клетках DXB-11, в клетках СНО-К1 и клетках СНО присутствует другая структурно перестроенная хромосома, также der(6), обозначенная Z11 (СНО-К1) и Z9 (СНО). Хромосома

X и хромосома 7 в клетках CHO присутствуют в неизменном виде [10]. В клетках линии CHO-K1 хромосома 7 остается интактной, а хромосома X вовлекается в перестройки и образует $der(X) - Z2$ и $Z1$, который включает материал хромосом X и 7 [8]. По-видимому, появление маркерных хромосом $mar7$ и $mar8$ в клетках DXB-11 связано с фрагментацией и дальнейшими перестройками хромосомы, обозначенной $Z1$ в кариотипе клеток CHO-K1.

Таблица 2.

Сопоставление структурно перестроенных хромосом в клетках линий DXB-11, CHO-K1 и CHO.

DXB-11 2n=20	CHO-K1 2n=20 (8)	CHO 2n=21 (10)
$del(2)(p16p25)$	—	—
$del(2)(q11q22)$	Z3	Z2
$del(4)(q11q12)$	—	Z5
$add(6)(p11)$	Z5	Z8
$der(6)(?::6q14 \rightarrow 6p13::6q14 \rightarrow 6qter)$	—	—
$der(X)t(X;?;4)(q11;?;p21)$	Z2	—
$mar1$	Z6	Z7
$mar2$	Z8	Z11
$mar3$?Z12	?Z13
$mar4$	Z4	—
$mar5$	Z10	—
$mar6$	Z9	Z4
$mar7$	—	—
$mar8$	—	?Z10

Таким образом, сходство хромосомного материала в клетках DXB-11 и CHO-K1, несмотря на вариации структурных перестроек, свидетельствует о стабильности генетического материала в клетках CHO при их длительном существовании в условиях *in vitro*.

Предполагается, что способность хромосом китайского хомячка к структурным перестройкам может быть обусловлена локализацией теломерных повторов $(TTAGGG)_n$ в прицентромерных районах, которые наиболее часто вовлекаются в образование аномальных хромосом [11,12].

В отличие от клеток CHO [13] и CHO-K1 [8] клетки DXB-11 характеризовались выраженной кариотипической гетерогенностью. Высокая доля клеток с неклональными перестройками может быть связана как с условиями культивирования, так и с особенностями генома мутантных клеток DXB-11. Кариотипическая гетерогенность (сосуществование клеток с разными вариантами кариотипа) отмечена для ряда клонов и субклонов клеток линии CHO-K1, что не исключает стабильности кариотипической структуры популяции [14]. Хотя выполненный нами анализ ограниченного числа клеток DXB-11 не позволил судить о кариотипической структуре популяции, вполне вероятно, что такая форма стабильности свойственна и клеточной линии DXB-11.

Известно, что мутантные сублинии клеток CHO-K1, устойчивые к колхицину, несмотря на перестройки отдельных хромосом, в значительной степени сохраняют структуру кариотипа клеток родительской линии [15]. Такая же закономерность обнаружена и при анализе рекомбинантных клеточных линий CHO, полученных на основе другой дефицитной по дигидрофолатредуктазе клеточной линии DG44 [16]. При этом не выявлено корреляции между стабильной продукцией зеленого флуоресцентного белка, ген которого был введен в качестве трансгена, и присутствием (или отсутствием) в кариотипе клеток дополнительных хромосомных перестроек [16].

Таким образом, вопрос о зависимости стабильности и продуктивности клеточных штаммов-продуцентов от структурного варианта кариотипа и/или особенностей кариотипической структуры популяции родительской линии остается открытым. В связи с кариотипической гетерогенностью клеточной линии DXB-11 представляет интерес проводить клонирование и кариотипирование отдельных клонов данной линии и оценку продуктивности получаемых на основе этих клонов штаммов-продуцентов.

Авторы выражают глубокую благодарность Н.Н. Мамаеву и Т.Л. Гиндиной (Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова) за возможность использования автоматического анализатора изображений хромосом (Ikaros4 Karyotyping System for transmitted light, MetaSystems, Германия).

Список литературы

1. **Wurm F.M.** CHO quasispecies — implications for manufacturing processes. *Processes*, 2013, 1: 296–311.
2. **Funanage V.L., Myoda T.T.** Localization of Chinese hamster dihydrofolate reductase gene to band p23 of chromosome 2. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 1986, 12, 6: 649–655.

3. **Urlaub G., Chasin L.A.** Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1980, 77, 7: 4216–4220.
4. **Milbrandt J.D., Azizkhan J.C., Hamlin J.L.** Amplification of a cloned Chinese hamster dihydrofolate reductase gene after transfer into a dihydrofolate reductase-deficient cell line. *Mol Cell Biol.*, 1983, 3, 7: 1274–1282.
5. **Ozkinay C., Mitelman F.** A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas*, 1979, 90, 1: 1–4.
6. **Hamerton J.L.** Report of the committee on chromosome markers. *Cytogenet Cell Genet.*, 1976, 16, 1-5: 83–91.
7. **ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**, Shaffer L.G., Slovak M. L., Campbell L. J. (eds); S. Karger, Basel 2009.
8. **Филатов Л.В., Мамаева С.Е.** Стабильность кариотипа двух постоянных линий клеток китайского хомячка — CHO-K1 и V-79. *Цитология*, 1985, 27, 9: 1031–1038.
9. **Kao F.T., Puck T.T.** Genetics of somatic mammalian cells. IX. Quantitation of mutagenesis by physical and chemical agents. *J Cell Physiol.*, 1969, 74, 3: 245–258.
10. **Deaven L.L., Petersen D.F.** The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses. *Chromosoma*, 1973, 41, 2:129–144.
11. **Bravo M.V., Bianchi M.S., Bolzán A.D.** Bleomycin induces delayed instability of interstitial telomeric sequences in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.*, 2012, 731, (1-2): 133–139.
12. **Cao Y., Kimura S., Itoi T., Honda K., Ohtake H., Omasa T.** Construction of BAC-based physical map and analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnol Bioeng.*, 2012, 109, 6: 1357–1367.
13. **Worton R.G., Ho C.C., Duff C.** Chromosome stability in CHO cells. *Somatic Cell Genet.*, 1977, 3, 1: 27–45.
14. **Полянская Г.Г., Абрамян Д.С., Глебов О.К.** Кариотипическая структура клоновых популяций клеток китайского хомячка при длительном культивировании. *Цитология*, 1981, 23, 7: 818–830.
15. **Гринчук Т.М., Игнатова Т.Н., Ефимова Е.В., Сорокина Е.А.** Кариотипические особенности клеток китайского хомячка линии CHO-K1, устойчивых к колхицину. *Цитология*. 1986, 28, 1: 63–68.
16. **Derouazi M., Martinet D., Besuchet N., Schmutz N., Flaction R., Wicht M., Bertschinger M., Hacker D.L., Beckmann J.S., Wurm F.M.** Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 340, 4: 1069–1077.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ, АПОПТОЗ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

С.С. Смирнова, Д.М. Даниленко, Т.Д. Смирнова, Н.В. Дунаева, К.В. Сивак

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

При экспериментальном тестировании противовирусных препаратов широко используются культивируемые клетки. В настоящей работе проведено сравнительное изучение влияния противовирусных препаратов – ингавирина, триазавирина, рибавирина и ремантадина на

пролиферацию, апоптоз и дифференцировку интактных культивируемых клеток человека. Эксперименты выполнены на нормальных и опухолевых клетках нескольких линий: ФЛЭЧ (диплоидные фибробласты легкого эмбриона человека), ECV-304 (спонтанно трансформированные клетки эндотелия), A-549 (эпителиоидные клетки карциномы легкого) и K-562 (клетки миелогенной лейкемии человека). На линии K-562 впервые исследовано влияние противовирусных препаратов на дифференцировку гемопозитических клеток эритроидного ряда. Наличие гемоглобина в клетках этого ряда служило маркером их дифференцировки.

Показано, что характер и степень влияния противовирусных препаратов на функции исследуемых клеток *in vitro* зависели от концентрации препаратов и продолжительности их воздействия на клетки. Реакции клеток на добавление противовирусных препаратов в культуральную среду на протяжении трех пассажей были различны; наименьшие изменения показателей пролиферации и апоптоза были выявлены у диплоидных фибробластов линии ФЛЭЧ.

Сравнительный анализ полученных данных показал, что ремантадин и рибавирин в высоких и средних концентрациях подавляли пролиферацию всех исследуемых клеток, в то время как ингавирин и триазавирин в большинстве опытов ее стимулировали. При этом ростстимулирующая активность ингавирина была значительно выше, чем триазавирина. Апоптоз в клетках изученных линий в разной степени индуцировали все препараты, кроме ремантадина, который практически не влиял на этот показатель в опытах с клетками суспензионной линии K-562. Дифференцировку клеток эритроидного ряда линии K-562 стимулировали рибавирин (в наибольшей степени), а также ингавирин и триазавирин. При добавлении ремантадина не было выявлено статистически значимых отличий показателей дифференцировки клеток от контроля.

В результате проведенного исследования получены дополнительные данные, позволяющие оценить воздействие известных противовирусных препаратов на пролиферацию, апоптоз и дифференцировку как нормальных, так и опухолевых клеток, что может способствовать более обоснованному назначению данных препаратов в терапии и профилактике различных вирусных инфекций.

Ключевые слова: клеточные культуры ФЛЭЧ, ECV-304, A-549, K-562, противовирусные препараты, пролиферация, апоптоз, дифференцировка.

Клеточные культуры человеческого происхождения в последние годы широко используются не только для выделения вирусов и изучения их репродукции на молекулярном уровне, но и для поиска эффективных средств защиты от вирусных инфекций. При отборе противовирусных препаратов на клеточных культурах проводится оценка их токсичности и противовирусной активности. Основное тестирование противовирусных препаратов проводится по их способности подавлять цитопатическое действие вируса (ЦПД) в перmissive клеточных линиях, однако существует ряд препаратов, не проявляющих противовирусной активности *in vitro*, но оказывающих защитный эффект в условиях *in vivo*. Ранее нами было изучено изменение пролиферации и апоптоза в ряде монослойных и суспензионных клеточных линий при инфицировании разными дозами вирусов гриппа А. Было показано, что противовирусные препараты способны влиять на эти измененные вирусом характеристики клеток [1, 2]. В большинстве опытов исследуемые противовирусные препараты использовались в ограниченных (не токсичных) концентрациях и учет результатов обычно проводился на ранних сроках (1–3 сут). В этих условиях влияние самих препаратов на клеточные функции, как правило, было минимальным. Было показано также, что ряд противовирусных препаратов при добавлении к интактным, не инфицированным вирусом культивируемым клеткам, проявляет собственную активность в отношении индукции или ингибирования пролиферации и апоптоза клеток.

При тестировании противовирусных препаратов интересным представляется изучение их влияния на дифференцировку клеток. Сюе с соавт. [3] описали один из методов исследования дифференцировки клеток *in vitro*, который был основан на способности эритробластов линии К-562 к дифференцировке в гемоглобин-синтезирующие клетки под воздействием некоторых индукторов эритропоэза (гемина и масляной кислоты).

Цель нашего исследования состояла в изучении воздействия некоторых известных противовирусных препаратов на пролиферацию, апоптоз и дифференцировку культивируемых нормальных и опухолевых клеток человека. При этом препараты использовали в расширенном диапазоне концентраций и добавляли в среду культивирования клеток на протяжении длительного времени: до 12 сут при однократном внесении или на протяжении трех пассажей при добавлении препаратов во время каждого пересева.

Материал и методы

Клеточные линии. В работе использовали 3 монослойные клеточные линии человека из Коллекции клеточных культур ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ: ФЛЭЧ (диплоидные фибробласты легкого эмбриона человека), ECV-304 (спонтанно трансформированные клетки эндотелия),

А-549 (клетки карциномы легкого человека). Клетки культивировали с использованием питательной среды альфа-МЕМ с добавлением 5% фетальной сыворотки (ФС) для линии ФЛЭЧ и 2% ФС – для линий ECV-304 и А-549. Пересев клеток проводили на 6–7 сут, используя для снятия монослоя клеток раствор версен/химопсин.

Эксперименты выполняли, также, на суспензионной линии клеток К-562 миелогенной лейкемии человека, полученной из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки этой линии культивировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 5% ФС, пересев клеток проводили на 5–6 сутки. Все клеточные линии культивировали без антибиотиков. Производитель питательных сред и ФС – фирма «БИОЛОТ».

Исследуемые препараты. Триазавирин (отечественный препарат, разработанный в Институте органического синтеза Уро РАН, находящийся на 3-й стадии клинических испытаний) и ингавирин («Валента Фармацевтика», Россия) использовали в концентрациях 31.2, 62.5, 125, 250 и 500 мкг/мл; ремантадин (Sigma, Германия) – в концентрациях 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25 мкг/мл; рибавирин-1 (ICN, США) – в концентрациях 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 и 100 мкг/мл и его аналоги: рибавирин-2 («Озон», Россия) и копегус (Roche, Швейцария) – в концентрациях 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 62.5, 125 мкг/мл. Эпокрин (рекомбинантный эритропоэтин человека, производства НИИ особо чистых биопрепаратов) использовали в концентрациях 31.2, 62.5, 125 и 250 МЕ/мл. Навески препаратов растворяли в бессывороточной питательной среде альфа-МЕМ (для опытов на монослойных культурах) или RPMI-1640 (для опытов на суспензионной культуре клеток К-562). Приготовленные растворы пропускали через фильтры с диаметром пор 0,25 мкм. Контролем служили интактные клетки, культивируемые параллельно с опытными образцами.

Проведение опытов на монослойных клеточных культурах.

Исследование выполняли на 24-луночных планшетах на протяжении 3-х пассажей. Для посева использовали 4-суточную культуру с концентрацией 5×10^4 кл/мл. В лунки планшета вносили по 1 мл препарата двукратной концентрации и по 1 мл клеток. Все последующие пассажи клеток проводили на 4–5 сутки. Для снятия клеток в лунки вносили по 0,1 мл раствора версен/химопсин. Затем клеточную суспензию пипетировали в 1 мл среды альфа-МЕМ с 2–5 % ФС. Из каждой лунки отбирали по 0,1 мл для подсчета клеток; 0,5 мл клеточной суспензии переносили в другой планшет с покровными стеклами (для изучения апоптоза). В контрольные лунки добавляли по 0,5 мл среды без сыворотки, а в опытные – по 0,5 мл среды с противовирусными препаратами в соответствующих разведениях.

Проведение опытов на клетках суспензионной культуры K-562.

Изучение пролиферации, апоптоза и дифференцировки клеток K-562 на протяжении 3-х пассажей проводили по методике, описанной выше, за некоторыми исключениями: посевная концентрация клеток составляла 1×10^5 кл/мл, для получения клеточной суспензии во время посева использовали мягкое пипетирование. Из 2 мл полученной суспензии клеток 0,2 мл отбирали для подсчета клеток, 0,65 мл переносили в другой планшет с покровными стеклами и 0,5 мл отбирали в эппендорфы для проведения окрашивания на гемоглобин с целью оценки дифференцировки клеток. Затем вносили в контрольные лунки планшетов по 0,65 мл среды RPMI-1640 без сыворотки, в остальные лунки – по 0,65 мл среды с препаратами в соответствующих двукратных разведениях. Далее во все лунки вносили по 0,65 мл среды RPMI-1640 с 5 % ФС.

Для проведения опытов в течение 12 дней использовали для посева 1-суточную культуру с концентрацией клеток $2,5 \times 10^5$ кл/мл с одновременным посевом на планшеты для каждого срока учета опыта (3, 7 и 12 сут). В этой серии опытов из лунок отбирали клетки для подсчета и для оценки дифференцировки.

Пролиферацию клеток определяли с помощью подсчета в камере Фукса-Розенталь. Долю выросших клеток выражали в процентах от контроля, который принимали за 100 % [4].

Индекс апоптоза (ИА) оценивали по степени деградации хроматина в клетках, выросших на покровных стеклах и окрашенных флуоресцентным красителем Hoechst-33258, как описано ранее [4]. В каждом препарате просматривали от 100 до 500 клеток в 10 полях зрения под люминесцентным микроскопом. Индекс апоптоза высчитывали по формуле: $ИА = (b/c) \times 100\%$, где b – количество апоптозных клеток, c – общее количество просмотренных клеток. Конечный результат выражали в виде разности: $ИА' = ИА$ в опыте – $ИА$ в контроле.

Определение индекса дифференцировки (ИД). Наличие гемоглобина в клетках эритроидного ряда линии K-562 является маркером их дифференцировки. Гемоглобин в клетках выявляли с помощью окрашивания раствором бензидина по методике, описанной в статье de Сароа с соавторами [5]. Суспензию клеток K-562 из контрольных и опытных лунок дважды отмывали PBS, окрашивали 10 мин при $+37\text{ }^\circ\text{C}$ 0,2%-ным раствором бензидина (20 мг бензидина фирмы Sigma–Aldrich растворяли в 50 мкл ДМСО и 10 мл $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$ с 0,3 % H_2O_2 в 5 М уксусной кислоте), центрифугировали при 1500 об/мин 10 мин, отмывали в PBS, ресуспендировали осадок в 0,5 мл PBS и раскапывали на предметные стекла. Препараты анализировали под световым микроскопом с иммерсией при увеличении $\times 900$. В каждом

препарате в 10 полях зрения просматривали от 100 до 500 клеток. Результат определяли в виде индекса дифференцировки (ИД) по формуле: $ИД = (b/c) \times 100 \%$, где b – количество целиком окрашенных (синтезирующих гемоглобин) клеток, c – количество просмотренных клеток. Конечный результат выражали в виде разности: $ИД' = ИД \text{ в опыте} - ИД \text{ в контроле}$.

Для каждого контроля и опыта использовали по две лунки, эксперименты проводили в двух повторностях.

Статистический анализ выполнен с использованием теста U–Манна-Уитни для сравнения двух групп непараметрических выборок. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Влияние препаратов на пролиферацию клеток в исследуемых клеточных линиях при культивировании на протяжении нескольких пассажей.

В результате проведения серии экспериментов было показано, что ингавирин, в основном в высоких и средних концентрациях (500 и 125 мкг/мл), достоверно стимулировал пролиферацию клеток во всех используемых клеточных линиях (рис. 1). Максимальная пролиферация клеток ФЛЭЧ достигала 148,4% (относительно контроля), клеток ECV-304 – 164% на 3-м пассаже при воздействии ингавирина в концентрации 125 мкг/мл. Пролиферация клеток А-549 достигала максимума – 169,2% при воздействии ингавирина в концентрации 125 мкг/мл на 2-м пассаже, а клеток К-562 – 159,7 % при концентрации ингавирина 500 мкг/мл на 2-м пассаже.

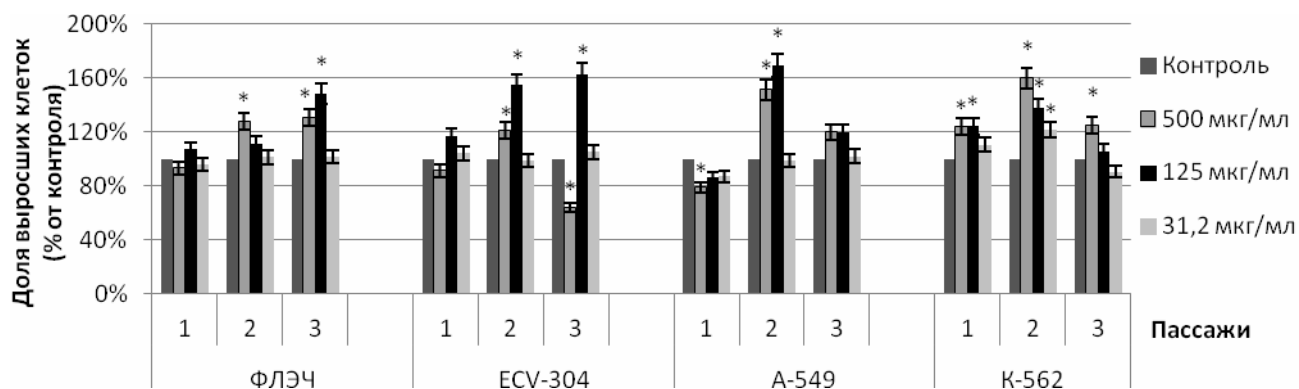


Рис. 1. Влияние ингавирина на пролиферацию клеток ФЛЭЧ, ECV-304, А-549 и К-562 на протяжении 3-х пассажей (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

Триазавирин не влиял на пролиферацию клеток ФЛЭЧ, но вызывал достоверное повышение пролиферации клеток ECV-304 при средней концентрации 125 мкг/мл на 2-м и 3-м пассажах (до 167,4 % и 150,6 %, соответственно) и при высокой концентрации 500 мкг/мл – на 3-м пассаже (до 137,0 %). Достоверная стимуляция пролиферации клеток А-549 отмечена при

воздействии триазавирина в концентрации 500 мкг/мл на 2-м и 3-м пассажах (до 142,3% и 139,6%, соответственно) и на 2-м пассаже (до 125,6%) при концентрации 31,2 мкг/мл (рис. 2). В то же время триазавирин подавлял пролиферацию клеток К-562 в высокой концентрации (500 мкг/мл) на 1-м и 2-м пассажах, а на 3-м пассаже пролиферацию достоверно ингибировали уже более низкие концентрации триазавирина (31,2 и 125 мкг/мл).

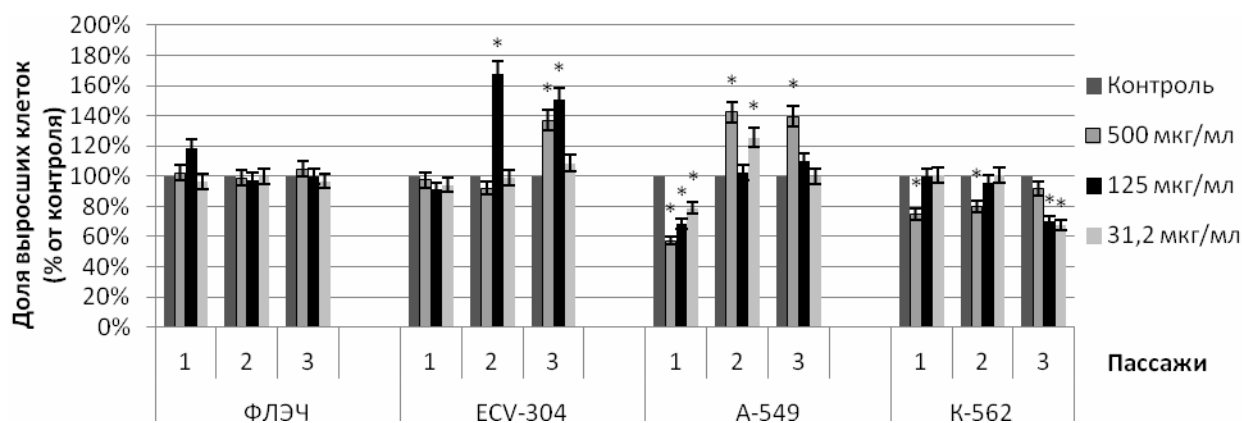


Рис. 2. Влияние триазавирина на пролиферацию клеток ФЛЭЧ, ECV-304, A-549 и K-562 на протяжении 3-х пассажей (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

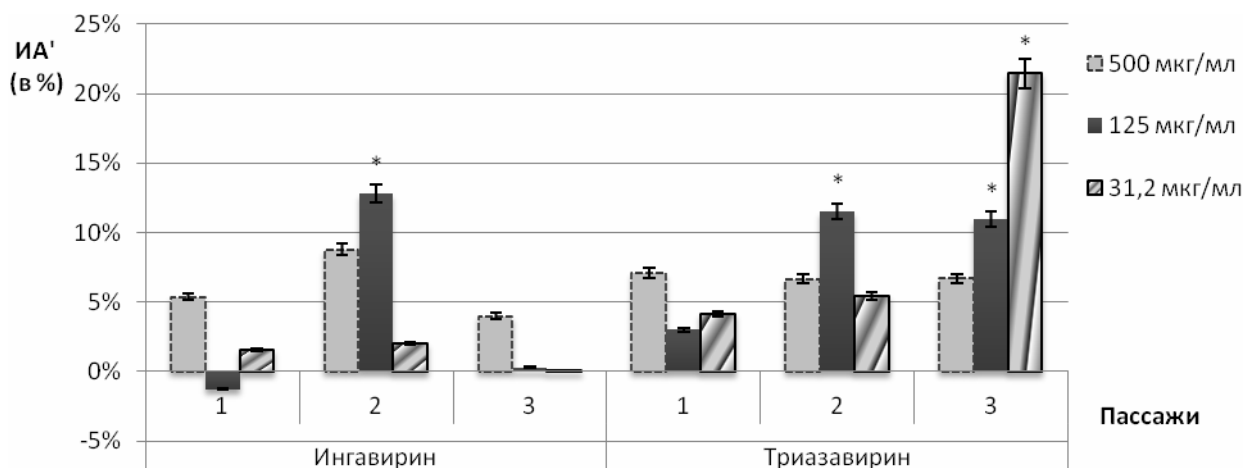
Препараты ремантадин, рибавирин-1 и его аналоги дозозависимо подавляли пролиферацию всех клеточных линий. При воздействии ремантадина в концентрации 25 мкг/мл и рибавирина-1 в концентрациях 50 и 100 мкг/мл все клетки погибали к 3-му пассажу. Ремантадин в концентрации 12,5 мкг/мл ингибировал пролиферацию до 30–70% от уровня контроля, в концентрации 6,2 мкг/мл – до 55–80%. Концентрация 3,1 мкг/мл была практически не токсична для клеток на протяжении 3-х пассажей. Рибавирин в концентрации 25 мкг/мл подавлял пролиферацию клеток ФЛЭЧ и ECV-304 до 40–60%, а опухолевых клеток A-549 и K-562 – до 8–19%; при концентрации 12,5 мкг/мл пролиферация клеток ФЛЭЧ и ECV-304 ингибировалась до 60–80% и до 11,5% в клетках K-562. Более низкие концентрации рибавирина (6,2 и 3,1 мкг/мл) достоверно подавляли пролиферацию только клеток K-562.

Влияние препаратов на апоптоз клеток в исследуемых клеточных линиях при культивировании на протяжении нескольких пассажей.

В результате исследования выявлено, что все тестируемые противовирусные препараты в разной степени индуцировали апоптоз культивируемых клеток человека. Наименее чувствительны к индукции апоптоза были диплоидные фибробласты ФЛЭЧ. В клетках A-549

триазамирин был способен индуцировать апоптоз (до 25 %) на 3-м пассаже при добавлении препарата в концентрациях 62,5 и 250 мкг/мл. В клетках ECV-304 на 2-м и 3-м пассаже все препараты вызывали апоптоз (не выше 10%). В клетках K-562 все препараты, за исключением ремантадина, вызывали апоптоз на 2-м и 3-м пассажах при добавлении практически всех используемых концентраций (рис. 3). Максимальный ИА в клетках K-562 при воздействии ингавирина был на уровне 12% на 2-м пассаже при концентрации препарата 125 мкг/мл, триазамирин – около 22% при концентрации препарата 31,2 мкг/мл, но самый высокий ИА был обнаружен при воздействии рибавиринов (ИА' до 30–49,5 %) в концентрациях 50, 25 и 12,5 мкг/мл (рис. 3.Б)

А



Б

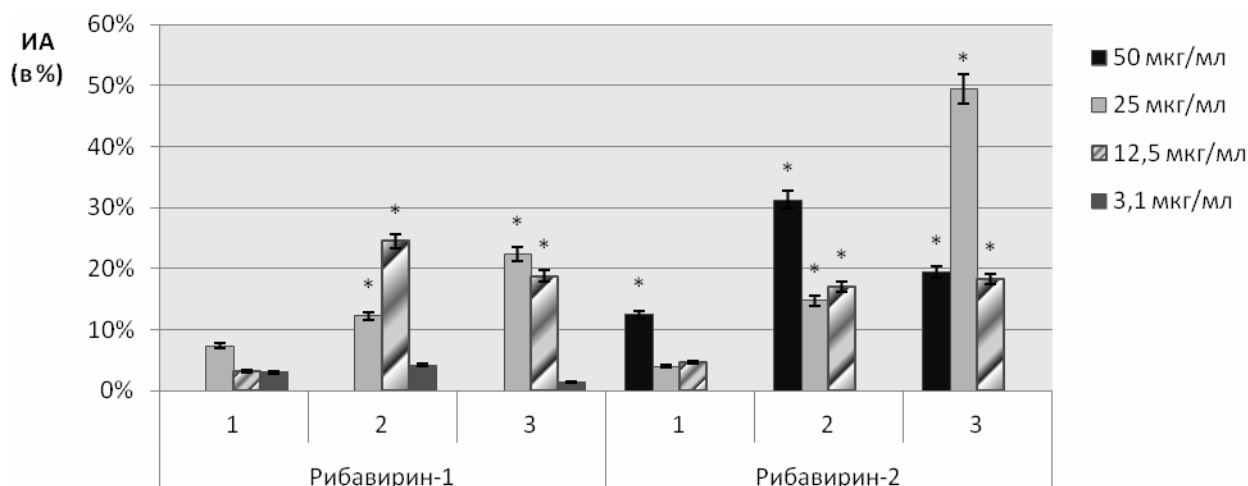


Рис. 3. Влияние ингавирина и триазамирин (А) и рибавиринов (Б) на апоптоз в клетках K-562 на протяжении 3-х пассажей (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

Влияние препаратов на дифференцировку клеток К-562.

В начале этой серии экспериментов было проведено изучение способности клеток эритроидного ряда линии К-562 к синтезу гемоглобина под воздействием стимулятора эритропоэза, в качестве которого был выбран аптечный препарат «Эпокрин». В некоторых контрольных клетках на третьи сутки культивирования было выявлено небольшое количество бензидин-положительных (содержащих гемоглобин) мелких гранул, количество которых постепенно увеличивалось к 12-м сут, что свидетельствовало о спонтанной дифференцировке клеток эритроидного ряда. При индукции эритропоэза эпокрином появлялись клетки, целиком окрашенные раствором бензидина. Максимальная индукция синтеза гемоглобина в клетках под воздействием эпокрин в концентрации 62,5 МЕ/мл (ИД' до 46,25%) была отмечена на 7-е сутки при однократном внесении препарата в культуральную среду. Эти результаты явились подтверждением возможности использования клеток линии К-562 в наших экспериментах по изучению влияния противовирусных препаратов на дифференцировочный потенциал клеток.

При изучении дифференцировки клеток К-562 были использованы две схемы применения противовирусных препаратов: 1) однократное внесение препарата на длительный срок (до 12 суток) и 2) добавление препарата при каждом пересеве клеток на протяжении 3-х пассажей.

При однократном внесении препаратов на длительный срок без смены среды максимальное количество целиком окрашенных на гемоглобин клеток обнаруживалось на 7–12 сутки. Количество дифференцированных клеток в присутствии ремантадина в концентрациях 6,2 и 25 мкг/мл было, в основном, ниже, чем в контроле, а при концентрации 3,1 мкг/мл – на уровне контроля (рис.4). Ингавирин (500, 125 и 62,5 мкг/мл), добавленный в культуральную среду на 3 сутки, вызывал подавление синтеза гемоглобина в клетках К-562. Синтез гемоглобина обнаруживался на 7-е сутки при добавлении ингавирина в концентрациях 125 и 62,5 мкг/мл (ИД', 22,8 и 18,8% соответственно), а максимальная индукция синтеза гемоглобина под воздействием ингавирина (ИД' 36,2 и 27,2 %) была отмечена на поздних сроках (12 сутки) при концентрациях 500 и 125 мкг/мл, соответственно (рис. 4).

Триазавирин в высоких и средних концентрациях (500, 125 мкг/мл) вызывал подавление синтеза гемоглобина на 3-и, 7-е и 12-е сутки. В то же время, низкие концентрации триазавирина (62,5 мкг/мл) вызывали стимуляцию синтеза гемоглобина до 13,8 и 16,3 % на 7-е и 12 –е сутки, соответственно (рис. 4).

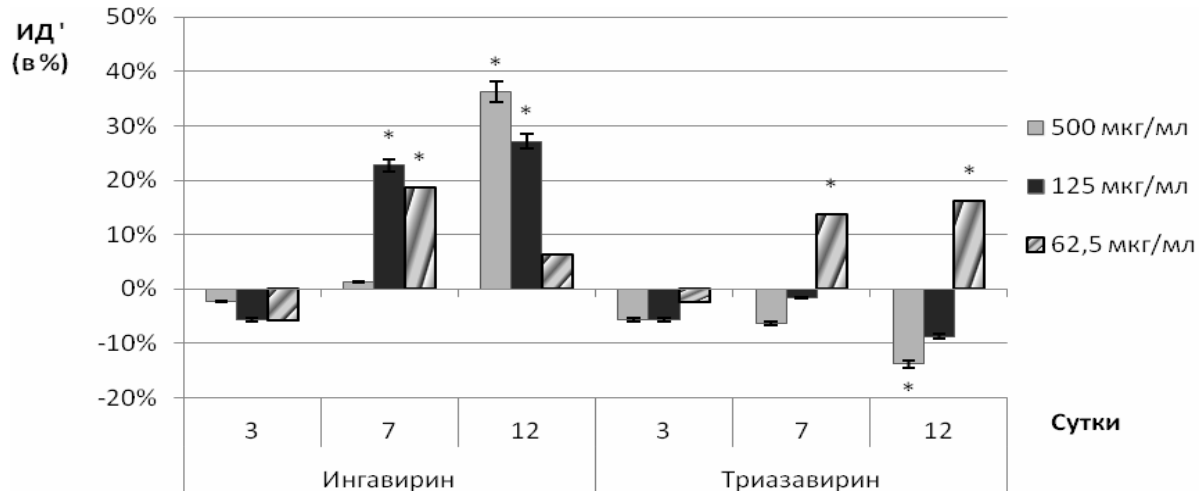


Рис. 4. Влияние ингавирина и триазавирина на дифференцировку клеток К-562 в течение 12 суток (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

Сравнительное изучение трех препаратов рибавирина показало (рис. 5), что все они в разной степени были способны стимулировать синтез гемоглобина. На 7-е сутки только рибавирин-1 обнаружил способность к индукции синтеза гемоглобина при концентрации 25 мкг/мл (ИД' 41,2%). Активный синтез гемоглобина в присутствии всех трех препаратов наблюдался только на 12 сут, причем наибольшая стимулирующая активность отмечена у рибавирина-1 в концентрации 25 мкг/мл (ИД' 26,3%), ниже – у рибавирина-2 при всех концентрациях и копегуса при концентрациях 25 и 50 мкг/мл (ИД' 16,6 и 18,0%, соответственно).

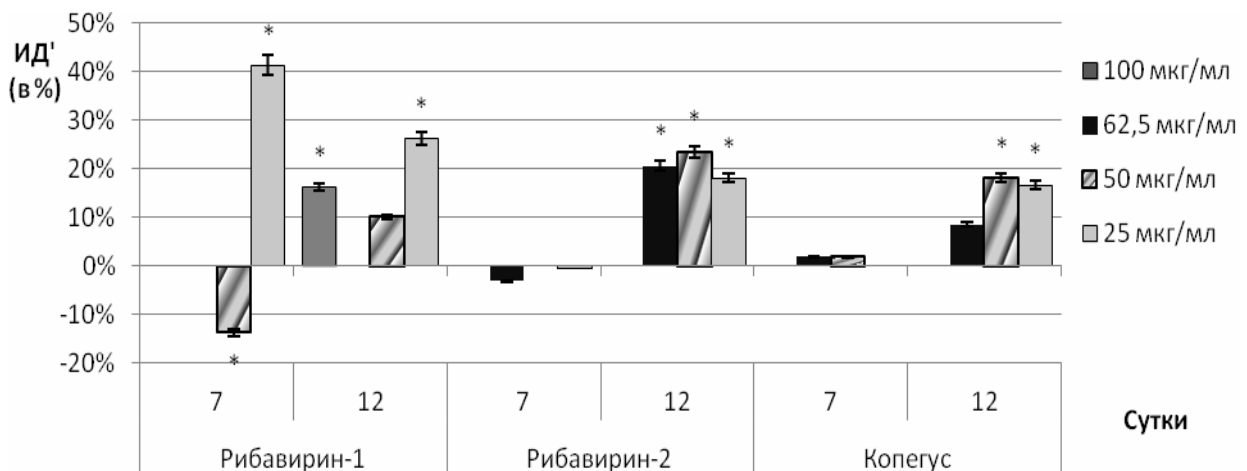


Рис. 5. Влияние рибавиринов на дифференцировку клеток К-562 в течение 12 суток (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

При использовании второй схемы добавления препаратов (на 3-х пассажах при пересеве клеток) не было выявлено достоверной стимуляции синтеза гемоглобина под воздействием триазавирина и ингавирина. Появление гемоглобин-синтезирующих клеток в присутствии рибавиринов 1 и 2 обнаруживалось уже на 1-м пассаже (рис. 6). Рибавирины активно стимулировали дифференцировку, так как по своей структуре они являются аналогами нуклеотида гуанозина, который, как показано в работе Волковой с соавт. [6], обладает дифференцирующим действием на клетки K-562.

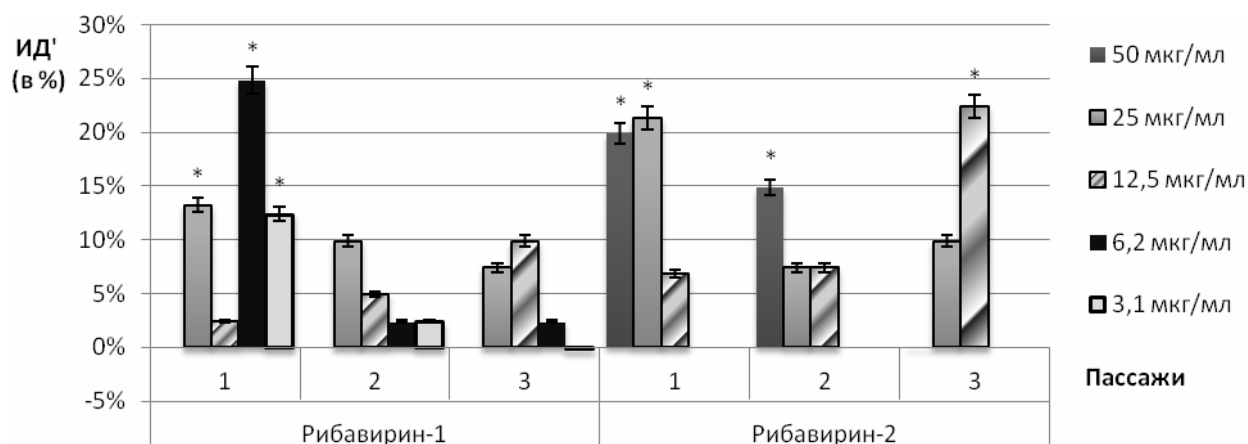


Рис. 6. Влияние рибавирина-1 и рибавирина-2 на дифференцировку клеток K-562 на протяжении 3-х пассажей (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

Таким образом, в своей работе мы провели сравнительное изучение способности некоторых противовирусных препаратов влиять на основные характеристики интактных клеток *in vitro*: пролиферацию, апоптоз и дифференцировку. Для этого нами было использовано несколько клеточных линий различного происхождения. В наших опытах мы также расширили диапазон используемых концентраций препаратов и увеличили продолжительность их применения. Были выявлены следующие закономерности: нормальные диплоидные фибробласты проявили минимальную чувствительность к исследуемым препаратам в тестах по выявлению их влияния на пролиферацию и апоптоз. Изменение состояния исследуемых клеток усиливалось с увеличением продолжительности применения препаратов. В этих случаях низкие концентрации препарата могли вызвать эффект, сравнимый с эффектом от воздействия высоких концентраций на ранних сроках.

На основании данных, полученных в настоящей работе, а также результатов, опубликованных ранее [1, 2, 4], можно следующим образом охарактеризовать воздействие

исследуемых препаратов на функциональные характеристики интактных и инфицированных вирусами клеток:

1. В настоящей работе показано, что **ингавирин** (имидазоллэтанами́д пентандиовой кислоты) [7] вызывает усиление пролиферации как трансформированных, так и нормальных клеток, незначительно индуцирует апоптоз и стимулирует дифференцировку клеток K-562 после продолжительного применения. Ранее нами было обнаружено, что ингавирин не индуцирует экспрессию фактора некроза опухоли (ФНО) в клетках ECV-304 и A-549, а в присутствии вируса гриппа А ингавирин не подавляет ЦПД вируса, но усиливает вирус-стимулированную пролиферацию клеток и ингибирует вирус-индуцированный апоптоз, также как и индуцированную вирусом экспрессию ФНО [2].

2. **Триазавирин** (2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-С]-1,2,4-триазин-7(4Н)-ОН-дегидрат натриевой соли) [7, 8] незначительно стимулирует пролиферацию интактных клеток эндотелия, но ингибирует пролиферацию опухолевых клеток K-562; индуцирует апоптоз в клетках (кроме ФЛЭЧ), и незначительно стимулирует дифференцировку клеток K-562 при низких концентрациях. Ранее нами было показано, что триазавирин способен к индукции экспрессии ФНО, а при инфицировании клеток вирусом гриппа А не подавляет ЦПД вируса, но ингибирует транслокацию вирусного нуклеопротеина из ядра в цитоплазму, ингибирует вирус-стимулированную пролиферацию клеток, усиливает вирус-индуцированный апоптоз клеток и незначительно снижает вирус-индуцированную экспрессию ФНО [1, 2, 4].

3. **Ремантадин** (альфа-метил-1-адамантанметиламин – производное адамантана) [7] вызывает дозозависимое подавление пролиферации клеток, слабую индукцию апоптоза в клетках эндотелия и не обладает способностью к стимуляции дифференцировки клеток K-562. Ранее нами было показано, что ремантадин при заражении клеток вирусом гриппа А подавляет ЦПД ремантадин-чувствительных штаммов вируса, но ингибирует транслокацию вирусного нуклеопротеина из ядра в цитоплазму как у чувствительных, так и у ремантадин-устойчивых штаммов вирусов; ингибирует вирус-стимулированную пролиферацию клеток и вирус-индуцированный апоптоз; не индуцирует экспрессию ФНО и ингибирует вирус-индуцированную экспрессию ФНО [1, 2, 4].

4. **Рибавирин** (упрощенный аналог гуанозина, лишенный пиримидинового кольца [7, 9] обладает дозозависимой токсичностью для всех клеток. Низкие концентрации препарата индуцируют слабый апоптоз в клетках эндотелия, но в клетках K-562 рибавирин вызывает высокий уровень апоптоза, особенно при длительном применении. Препарат активно

стимулирует дифференцировку клеток K-562 как при однократном добавлении на 7-12 суток, так и уже на первом пассаже. Из трех исследованных препаратов различных фирм-изготовителей наибольшей активностью обладал рибавирин-1 – очищенное действующее вещество без вспомогательных добавок. Ранее нами было показано, что рибавирин подавляет ЦПД вируса, подавляет транслокацию вирусного нуклеопротеина из ядра в цитоплазму, ингибирует вирус-стимулированную пролиферацию клеток, усиливает вирус-индуцированный апоптоз клеток; не обладает способностью вызывать экспрессию ФНО и подавляет индуцированную вирусом экспрессию ФНО [1, 2, 4].

В результате проведенного исследования получены дополнительные характеристики известных противовирусных препаратов, которые позволяют по-новому оценить их биологическое воздействие на клетки, и могут способствовать более обоснованному назначению данных препаратов в терапии и профилактике различных вирусных инфекций.

Список литературы

1. **Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Еропкин М.Ю., Деева Э.Г., Киселев О.И.** Изучение влияния ремантадина, рибавирина и триазавирина на репродукцию вирусов гриппа А в монослойных и лимфобластоидных клеточных линиях человеческого происхождения. Антибиотики и химиотерапия. 2011, 56: 11–16.
2. **Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Плотникова М.А., Кадырова Р.А., Слита А.В., Еропкин М.Ю.** Изучение влияния разных субтипов вируса гриппа А в присутствии противовирусных препаратов на пролиферацию и индукцию фактора некроза опухоли в клеточных линиях человека А-549 и ECV-304. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2012, 28: 37–49.
3. **Cioe L., McNab A., Hubbell HR, Meo P., Curtis P., Rovera G.** Differential expression of the globin genes in human leukemia K562(S) cells induced to differentiate by hemin or butyric acid. Cancer Res. 1981, 41: 237–243.
4. **Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М., Кузнецова И.К., Рыжак Г.А.** Разработка модели взаимоотношения вируса гриппа А с перевиваемыми лимфобластоидными клетками человека для изучения биологических особенностей вируса и определения активности антивирусных препаратов. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2009, 24: 25–34.
5. **de Capoa A., Baldini A., Marlekaj P., Gambari R., Raschellà G., Fantoni A.** Cytologic evidence for increased rRNA gene activity in hemin-induced K562(S) cells. Cancer Genet. Cytogenet. 1985, 17 (2): 113–122.
6. **Волкова Т.О., Малышева И.Е., Немова Н.Н.** Сравнительный анализ дифференцирующего и апоптогенного действий цитидина, тимидина и гуанозина на клетки эритромиелозной линии человека K562. Вопросы мед. химии. 2002, 6: 586–593.
7. **Киселев О.И.** Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. – СПб.: Росток. 2012, 272.
8. **Karpenko I., Deev S., Kiselev O., Charushin V, Rusinov V, Ulomsky E, Deeva E, Yanvarev D, Ivanov A, Smirnova O, Kochetkov S, Chupakhin O, Kukhanova M.** Antiviral properties, metabolism, and pharmacokinetics of a novel azolo-1,2,4-triazine-derived inhibitor of influenza A and B virus replication. Antimicrob. Agents Chemother. 2010, 54: 2017–2022.

9. Галегов Г.А., Львов Н.Д., Петрова И.Р., Флорентьев В.Л. Рибавирин как противовирусный химиопрепарат: химия, молекулярный механизм действия, возможности клинического применения. *Вопр. Мед. Хим.* 1986, 32 (1): 10–19.

ИЗМЕНЕНИЕ РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПОЛИОКСОМЕТАЛЛАТОВ

*И.А. Суетина¹, М.В. Мезенцева¹, Е.А. Гущина¹, Ф.А. Лисицин¹, Л.И. Руссу¹,
О.А. Лопатина¹, Е.Л. Фирсова¹, С.А. Ковалевский², Б.А. Буданов², Ф.И. Далидчик²,
А.С. Селезнев³, Р.А. Морозов³*

¹ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва cells@rambler.ru; ² ФГБУ Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва; ³ Зеленоградский нанотехнологический центр, Москва.

С целью изучения влияния наноматериалов на морфофункциональные характеристики клеток проведено сравнительное тестирование препаратов наночастиц – полиоксометаллатов (ПОМ) в культуре фибробластов эмбриона человека линии ФЭЧ-Т. Эксперименты выполнены с полиоксиметаллатами $H_3PW_{12}O_{40}$, $H_4SiW_{12}O_{40}$, $H_4SiMo_{12}O_{40}$ и $H_3PMo_{12}O_{40}$, которые в разных концентрациях добавляли в среду культивирования клеток. Показано различное токсическое воздействие исследуемых препаратов на клетки. С помощью МТТ-теста выявлено снижение пролиферации клеток в процессе их инкубации с изучаемыми препаратами в концентрации 625–5000 мкМ/мл. Наибольшая цитотоксичность через 24 часа инкубации выявлена у препарата $H_3PW_{12}O_{40}$, содержащего атомы вольфрама, наименьшая – у препарата $H_4SiMo_{12}O_{40}$, содержащего атомы молибдена, что может свидетельствовать о зависимости степени воздействия тестируемых ПОМ на клетки от физико-химических свойств препаратов.

На электронных микрофотографиях, полученных с помощью трансмиссионной и растровой электронной микроскопии, обнаружены патологические изменения морфологии клеток при их инкубации в течение 48 часов с исследуемыми ПОМ – разрушение мембранных структур цитоплазмы клеток, деструкция ядер, увеличение количества и размеров вакуолей в цитоплазме, появление множества аутофагосом и др.

Изучено потенциальное влияние тестируемых препаратов наночастиц на параметры иммунитета. Все препараты в разведениях 1\100–1\500 способствовали активации в

культивируемых фибробластах транскрипции цитокинов ИЛ-18, ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО- α , а также активации экспрессии генов интерферонов I, II, III типов (ИФН- α/β , ИФН- γ , ИФН- λ).

Ключевые слова: наночастицы, полиоксометаллаты, пролиферация клеток, электронная микроскопия, цитокины.

В результате быстрого развития нанотехнологии, а также применения её разработок в разных областях науки и в медицине, исследования биологических эффектов наноматериалов становятся все более актуальными и тесно связаны с изучением их цитотоксичности, генотоксичности и экотоксичности. Частицы наноматериалов радикальным образом отличаются по своим свойствам от исходных веществ и, обладая более высокой активностью, нежели крупные молекулы, могут оказывать токсическое воздействие на клетки животных и человека. Показано, что препараты наночастиц – полиоксометаллаты (ПОМ), относящиеся к классу металл–оксидных кластеров, могут подвергаться различным модификациям, что делает их перспективными для создания противовирусных и противоопухолевых препаратов [1, 2, 3]. Наиболее интересными в этом аспекте являются ПОМ на основе молибдена, вольфрама, ванадия, ниобия и тантала. Однако, несмотря на то, что эти ПОМ являются наиболее изученными, нельзя утверждать, что в настоящее время их влияние на живые объекты уже полностью известны [4, 5].

В связи с этим представляло интерес сравнить влияние 4-х препаратов ПОМ, содержащих вольфрам и молибден, на морфофункциональные характеристики культивируемых нормальных клеток человека.

Материал и методы

Препараты наночастиц. В работе были использованы стерильные водные растворы полиоксиметаллатов:

А – $H_3PW_{12}O_{40}$ – 0.01 М/мл

В – $H_3PMo_{12}O_{40}$ – 0.01 М/мл

С – $H_4SiW_{12}O_{40}$ – 0.01 М/мл

Д – $H_4SiMo_{12}O_{40}$ – 0.01 М/мл

Культуры клеток и питательные среды.

Для экспериментов была выбрана из Коллекции культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского линия ФЭЧ–Т нормальных фибробластов эмбриона человека. Для культивирования клеток использовали стандартную питательную среду Игла производства Московского института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) фирмы «ПанЭко».

Клетки рассевали на 96-луночную панель фирмы «Costar» (США) в концентрации 200 тыс.кл/мл в каждую лунку в объеме 100 мкл среды с 10% ЭТС и культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C. Через 24 ч после посадки клеток в лунки вносили по 100 мкл изучаемого препарата в заданных разведениях. Эксперименты выполняли с тремя повторами. Контролем служили интактные клетки, культивируемые параллельно с опытными.

Для изучения цитотоксического действия наночастиц ПОМ на клетки линии ФЭЧ применяли **МТТ–тестирование** [6, 7]. Этот метод основан на способности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ живых, метаболически активных клеток восстанавливать бесцветный водорастворимый МТТ-реагент до голубого формазана, который кристаллизуется внутри клеток. Кристаллы формазана переводят в раствор с помощью органического растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) с последующей спектрофотометрией. Таким образом, восстановленный клетками МТТ-реагент является показателем жизнеспособности клеток в культуре, что позволяет оценить гибель клеток, вызванную тем или иным цитотоксическим препаратом.

После культивирования клеток с препаратом наночастиц в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C культуральную среду из лунок отбирали, добавляли по 100 мкл среды с 20 мкл МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия, Sigma) в исходной концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 4 ч. Затем среду с МТТ удаляли и добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся в живых клетках кристаллов формазана. Осадок клеток ресуспендировали в течение 5 мин пипетированием. Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности окраски раствора формазана, измеряя его оптическую плотность при длине волны 545 нм на спектрофотометре Immunochem 2100 (США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, «Statistica 6,0». Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

Трансмиссионная электронная микроскопия.

Изучение влияния препаратов наночастиц на морфологию культивируемых фибробластов после инкубации клеток с препаратами в течение 48 ч проводили с помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии. Использовали общепринятую методику фиксирования материала в 2,5 % глутаральдегиде и 1% водном растворе OsO₄, обезвоживания, пропитки и заливки в эпоксидную смолу. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Полученные контрольные и опытные препараты изучали под электронным микроскопом JEOL 100XC с ускоряющим напряжением 80 кВ.

Растровая электронная микроскопия (РЭМ).

С помощью растровой электронной микроскопии предполагалось получить ответ на вопрос о месте локализации наночастиц на поверхности или внутри клеток. Клетки исследовали через 48 ч после сокультивирования с препаратами ПОМ. Покровные стёкла с клетками фиксировали по стандартной методике в 2,5 % глутаральдегиде, промывали в 0,2 М фосфатном буфере, дегидрировали в серии спиртов и высушивали.

При использовании РЭМ поверхность исследуемого образца сканируют электронным пучком с помощью электронной пушки, отраженные от поверхности вторичные электроны воспринимаются детектором. Затем в соответствии с интенсивностью и положением полученных детектором вторичных электронов восстанавливается трехмерное изображение поверхности объекта в черно-белых градациях, при этом яркость оттенка характеризует свойства электропроводности изучаемого материала: высокая электропроводность соответствует более светлым участкам, а низкая – более темным [8, 9]. Изображения были получены на электронном микроскопе JEOL JSM-6490 LV с использованием ускоряющего напряжения 3 кВ.

Изучение продукции цитокинов.

Продукцию цитокинов изучали на уровне их транскрипции *in vitro* после инкубации клеток с препаратами ПОМ в течение 24 ч. Клетки помещали в 6-луночные панели в посевной дозе 200 тыс.кл/мл, инкубировали 24 ч до образования монослоя, и затем после смены среды в лунки вносились препараты в разведениях 1/10, 1/20, 1/100, 1/500. Экспрессия генов интерлейкинов ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, фактора некроза опухолей ФНО-α, интерферонов ИФН-α, ИФН-β, ИФН-γ, ИФН-λ1, ИФН-λ2, ИФН-λ3 оценивалась по активности их

мРНК. Определение активности мРНК цитокинов в клетках проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). В качестве положительного контроля использовали β -актин. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли электрофоретически в 2,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы Promega (G 1758) [10–13].

Результаты и обсуждение

При отборе перспективных для фармакологии образцов ПОМ необходимо выбирать из них наименее токсичные для нормальных клеток человека. Количественная оценка цитотоксичности используемых в работе препаратов наночастиц была выполнена с помощью МТТ-тестирования. Получены спектрофотометрические данные показателей оптической плотности растворов формазана в опытах и в контроле. Эти данные позволяют оценить гибель клеток, вызванную тем или иным цитотоксическим агентом. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Определение цитотоксичности препаратов ПОМ на клетках ФЭЧ с помощью МТТ-теста.

ПРЕПАРАТ	Показатели оптической плотности при длине волны 545 нм									
	Разведения препаратов									
	1\2	1\4	1\8	1\16	1\32	1\64	1\128	1\256	1\512	1\1024
А	0.047 ± 0.021	0.052 ± 0.00	0.052 ± 0.01	0.569 ± 0.03	0.715 ± 0.04	0.762 ± 0.09	0.808 ± 0.11	0.862 ± 0.03	0.891 ± 0.02	0.913 ± 0.01
В	0.054 ± 0.009	0.06 ± 0.00	0.053 ± 0.00	0.664 ± 0.02	0.785 ± 0.03	0.833 ± 0.02	0.810 ± 0.01	0.826 ± 0.02	0.866 ± 0.04	0.868 ± 0.08
С	0.032 ± 0.006	0.073 ± 0.01	0.076 ± 0.019	0.697 ± 0.04	0.879 ± 0.05	0.945 ± 0.05	0.966 ± 0.02	0.99 ± 0.01	0.97 ± 0.03	0.988 ± 0.08
Д	0.035 ± 0.0035	0.039 ± 0.01	0.143 ± 0.01	0.828 ± 0.06	0.965 ± 0.02	0.966 ± 0.05	0.968 ± 0.03	0.972 ± 0.00	0.955 ± 0.05	0.969 ± 0.04
Контроль	0.91 \pm 0.09									

Полученные с помощью МТТ-теста данные свидетельствуют о том, что 4 исследуемых препарата ПОМ при воздействии на клетки в течение 24 ч вызывают достоверное уменьшение пролиферативной активности и жизнеспособности нормальных клеток человека ФЭЧ-Т только в разведениях 1/2–1/8, а препарат А токсичен еще и в разведении 1/16. Эти

разведения соответствуют концентрациям препаратов от 625 до 5000 мкМ/мл. Все остальные данные, приведенные в таблице, достоверно не отличаются от контроля.

Наибольшая цитотоксичность через 24 ч выявлена у препарата А ($H_3PW_{12}O_{40}$) содержащего атомы вольфрама, наименьшая – у препарата Д ($H_4SiMo_{12}O_{40}$) с атомами молибдена, что может свидетельствовать о зависимости степени воздействия ПОМ на клетки от физико-химических свойств тестируемых препаратов.

В сравнении с ранее изученными металлическими наночастицами (окислов меди и железа) и стабилизированных крахмалом наночастиц серебра цитотоксический эффект у всех исследуемых нами полиоксиметаллатов был гораздо ниже [14,15]. Важно подчеркнуть, что цитотоксичность на клетках ФЭЧ всех 4 изучаемых нами препаратов ПОМ через 24 ч инкубации также была ниже, чем токсичность в МТТ-тесте аналогичного, обладающего антивирусной активностью на клетках МДСК, препарата ПОМ-4960 [16].

При изучении электронных микрофотографий клеток в контроле в их цитоплазме были выявлены расширенные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, митохондрии, лизосомы, небольшое количество фагосом, липидные включения и внутриклеточные вакуоли различной величины (рис.1). Плазматическая мембрана клеток ФЭЧ образовывала многочисленные складки и редкие микроворсинки. Ядра клеток ФЭЧ были вытянутой овальной формы. Конденсированный хроматин располагался под внутренней мембраной кариолеммы, а неконденсированный хроматин – диффузно в середине ядра.

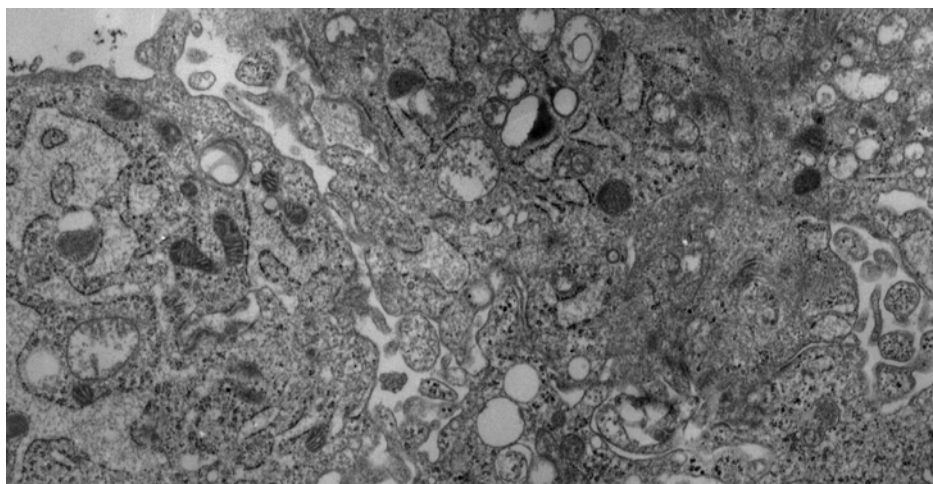


Рис. 1. Электронная микрофотография цитоплазмы клетки культуры ФЭЧ. Контроль. x 25000

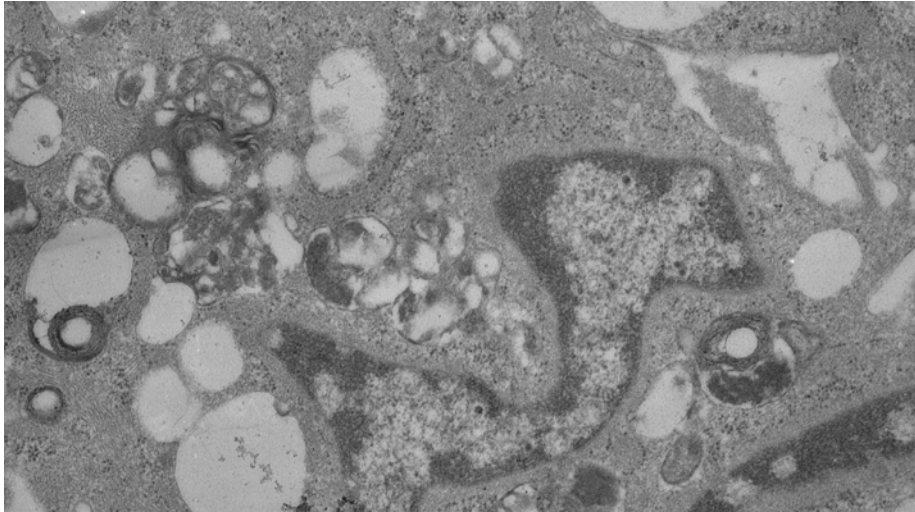


Рис. 2. Электронная микрофотография клетки культуры ФЭЧ, сокультивированной с полиоксометаллатом (В). Ядро извитой формы, в цитоплазме многочисленные вакуоли и аутофагосомы. x 25000

Для ультраструктуры клеток линии ФЭЧ, сокультивированных в течение 48 часов с ПОМ (В) в разведении 1/32 было характерно увеличение количества и размеров вакуолей в цитоплазме и появление в ней множества аутофагосом. Ядра некоторых клеток приобретали извитую форму (рис. 2).

Исследования ультратонких срезов клеток культуры ФЭЧ, в таких же условиях сокультивированных с ПОМ (С) в разведении 1/16, выявили резкое ухудшение состояния клеток: в цитоплазме обнаружены многочисленные скопления вакуолей типа аутофагосом, наблюдалась деструкция мембран ЭПР, клзматоз; ядра большинства клеток стали извитой формы. Некоторые клетки подверглись полному разрушению (рис. 3).

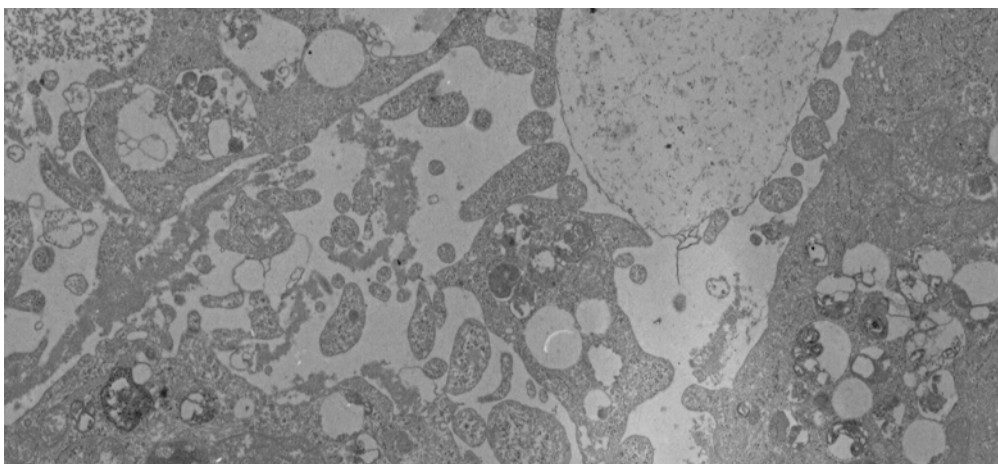


Рис. 3. Электронная микрофотография. Ультратонкий срез цитоплазмы клетки культуры ФЭЧ, сокультивированной с полиоксометаллатом (С). Видны многочисленные вакуоли, клзматоз цитоплазматической мембраны клетки. x 25000

При изучении ультратонких срезов клеток культуры ФЭЧ, сокультивированных с ПОМ (Д) в разведении 1/16, также была выявлена полная деструкция и деградация клеток, в которых разрушены ядра и мембранные структуры цитоплазмы (рис. 4).

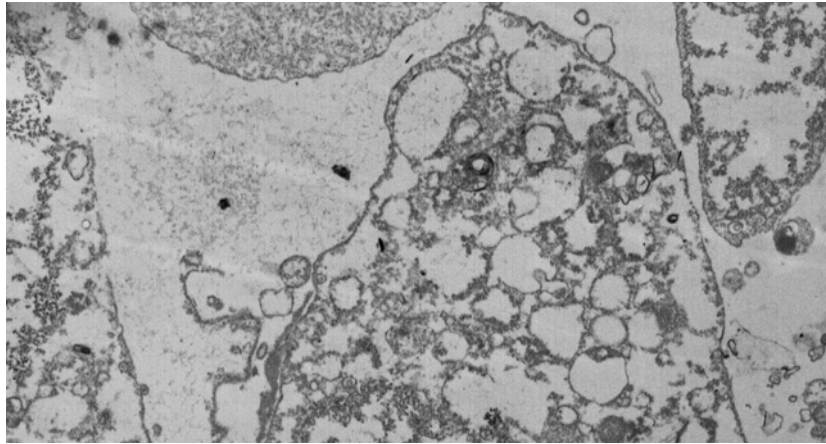


Рис.4 Электронная микрофотография. Ультратонкий срез цитоплазмы клеток культуры ФЭЧ, сокультивированных с полиоксиметаллатом (Д). Полная деструкция клеток ФЭЧ. x 25000

При этом с помощью растровой электронной микроскопии монослая клеток ФЭЧ после 48-ми часовой инкубации с образцами ПОМ в разведении 1/100 (0,0001 М/мл) было показано, что в контрольном образце очень плотный монослой состоял из вытянутых клеток, связанных между собой отростками. В образцах с препаратами ПОМ количество клеток было гораздо меньше, чем в контроле, плазмолемма изменена, разорваны связи между клетками (рис. 5, рис. 6).

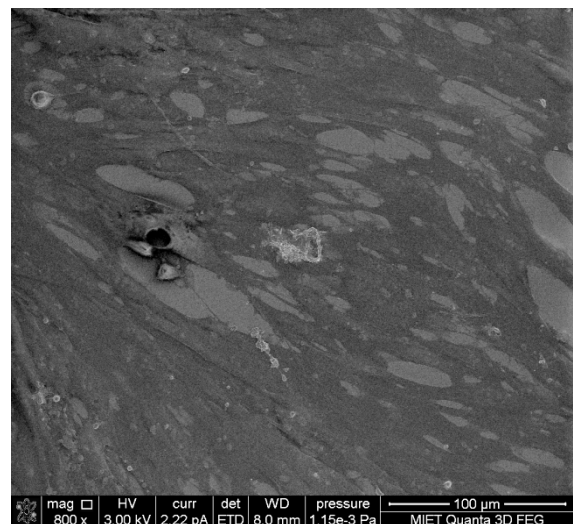
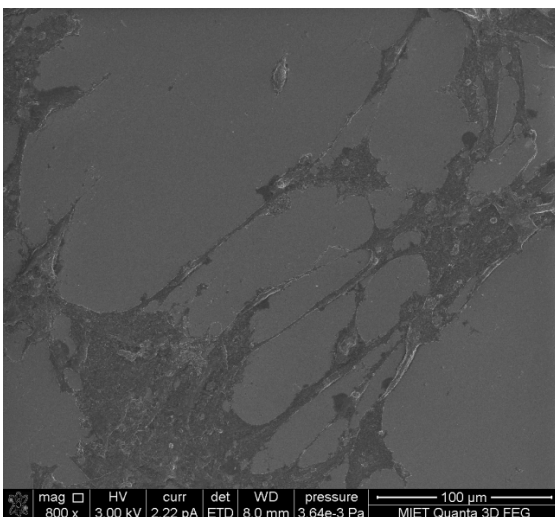


Рис. 5. РЭМ-фотография. Клетки, сокультивированные с ПОМ (В), слева и контроль клеток справа. Масштаб шкалы: 100 мкм.

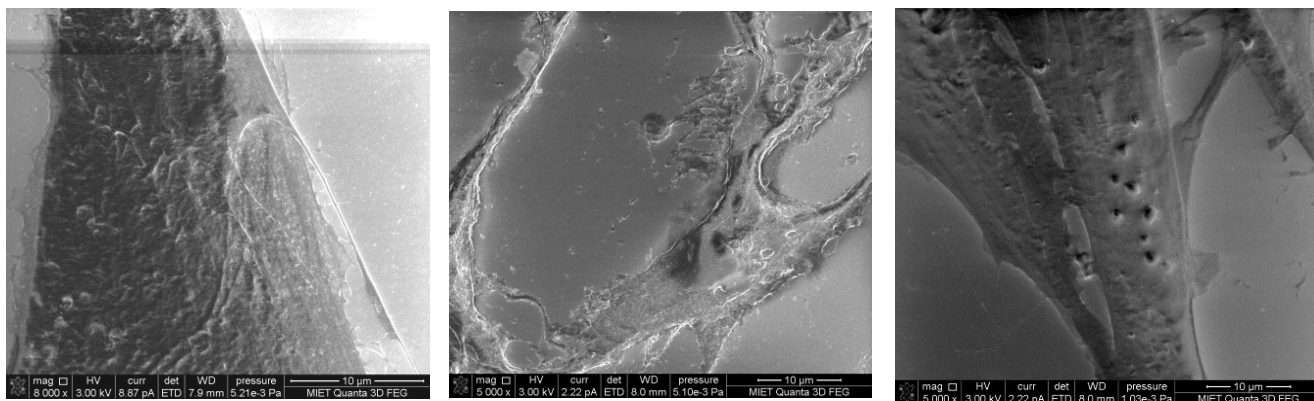


Рис. 6. РЭМ – фотография. Клетки, сокультивированные с ПОМ (А и В), и контроль клеток по порядку. Масштаб шкалы – 10 мкм.

В данном случае необходимо отметить, что поиск и визуализация частиц ПОМ на поверхности или внутри клеток является комплексной и нетривиальной задачей. На сегодняшний день известно, что используемые наночастицы имеют размеры около 1 нм. Поэтому, даже если предполагаемый рельеф поверхности подложки имеет толщину в несколько ангстрем, столь малые частицы было бы очень сложно обнаружить на фоне «молекулярного шума». Он создается присутствующими на поверхности монослоя клеток остатками питательной среды, молекулами аминокислот, белков и других продуктов метаболизма клеток, имеющими размеры в диапазоне от 10 нм до 1 мкм. При помощи РЭМ исследования не удалось однозначно зарегистрировать положение частиц ПОМ. Предположительно, они могут находиться под слоем биологической пленки, состоящей из остатков органических материалов.

В дальнейшем предполагается в целях повышения эффективности детектирования ПОМ внутри клеток проведение исследований с помощью рентгеновской дифракции. Этот метод позволит получить спектрограмму и выявить закономерные пики дифракции для частиц ПОМ [17]. Однако для определения их положения необходимо будет зарегистрировать спектрограмму и топографию поверхности в каждой точке для создания 4-х-мерной карты поверхности, для чего может быть также использована микро-Рамановская спектроскопия [18].

Исследования синтеза цитокинов в клетках ФЭЧ на уровне их транскрипции *in vitro* уже через 24 ч после введения 4-х ПОМ в разведениях 1/100–1/500 в культуральную среду показали, что исследуемые препараты способствовали активации транскрипции ИФН- γ , ИЛ-18, ИЛ-1 β , ИЛ-8, ФНО- α , а также способствовали активации экспрессии генов интерферонов I, II, III типов (ИФН- α/β , ИФН- γ , ИФН- λ (табл. 2, рис. 7).

Экспрессия генов цитокинов в клетках ФЭЧ-Т под действием ПОМ

ПОМ	Наличие (+) /отсутствие (-) мРНК цитокинов в клетках ФЭЧ-Т								
	ИФН- α	ИФН- β	ИФН- γ	ИФН- λ	ИЛ-1 β	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-18	ФНО- α
H3PW12O40	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H4SiW12O40	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H4SiMo12O40	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H3PMo12O40	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Контроль клеток без ПОМ	-	-	-	-	-	-	+	-	-

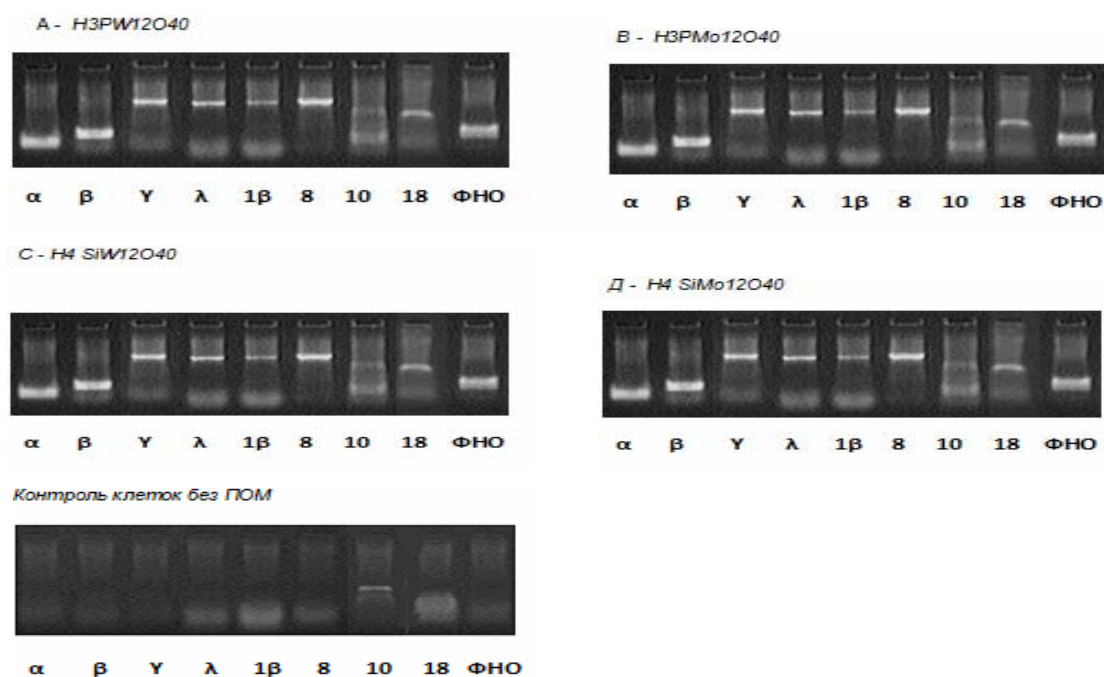


Рис. 7. Экспрессия генов цитокинов в клетках ФЭЧ-Т под действием ПОМ. Фотография – гель документирования.

Активация данных цитокинов, обуславливающих развитие клеточного иммунитета и макрофагального звена иммунитета в организме, является важным при инфекционных и неврологических заболеваниях, а генов интерферонов, как первого барьера для инфекций.

Поскольку все препараты ПОМ активировали экспрессию гена фактора некроза опухолей ФНО- α , который участвует в противоопухолевом и противовирусном иммунитете, а в отношении ряда опухолей обладает также цитостатическим и цитолитическим эффектом,

возможно, что исследуемые нами ПОМ будут эффективны и для лечения или доставки лекарств при злокачественных новообразованиях.

Кроме того, в опытах *in vitro* в малых (субтоксических) концентрациях исследуемые ПОМ способствовали активации синтеза ИФН- β и угнетению ИЛ-10 – одного из противовоспалительных цитокинов, играющего ключевую роль в развитии аутоиммунных заболеваний и являющегося негативным прогностическим признаком при таких аутоиммунных заболеваниях, как рассеянный склероз и пр. Возможно, данные ПОМ могут быть применены и в данных случаях.

Таким образом, полученные в опытах *in vitro* на нормальных клетках ФЭЧ-Т результаты, показали, что разработка препаратов на основе обладающих иммуномодулирующей активностью ПОМ в субтоксических концентрациях перспективна для использования их как в моно-, так и в комплексной терапии вирусных, аутоиммунных, неврологических и онкологических заболеваний. Из изученных нами 4-х препаратов ПОМ наиболее перспективным для создания противовирусных и противоопухолевых препаратов может быть препарат $H_4SiMo_{12}O_{40}$ в концентрациях 625–5000 мкМ/мл.

Список литературы

1. **Rhule J.T., Hill C.L., Judd D.A., Schinazi, R.F.** Polyoxometalates in medicine. *Chem.Rev.* 1998, 98: 327–358.
2. **Shigeta S., Mori S., Yamase T., Yamamoto T.** Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. *Biomed. Pharmacother* 2006, 60: 211–219.
3. **Yanagie H., Ogata A., Mitsui S., Hisa T., Yamase T., Eriguchi M.** Anticancer activity of polyoxomolybdate. *Biomed. Pharmacother* 2006, 60: 349–352.
4. **Остроушко А.А., Гетте И.Ф., Данилова И.Г., Медведева С.Ю., Тонкушина М.О., Прокофьева А.В.** Исследование хронической токсичности молибденовых и железо-молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов. *Уральский медицинский журнал*, 2011, 11(89): 75–79.
5. **Остроушко А.А., Гетте И.Ф., Медведева С.Ю., Тонкушина М.О., Данилова И.Г., Прокофьева А.В., Морозова М.В.** Оценка безопасности железо-молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов, предназначенных для адресной доставки лекарственных веществ. *Вестник уральской академической медицинской науки*, 2011, 2 (34):107–110.
6. **Харбиев Р.У.** Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина. 2005, 832 с.
7. **Подчерняева Р.Я., Суетина И.А., Михайлова Г.Р., Лопатина О.А., Бобринецкий И.И., Морозов Р.А., Селезнев А.С.** Культивирование перевиваемых клеточных линий на подложках из углеродных нанотрубок и влияние электростимуляции на пролиферацию клеток. *Вопросы вирусологии*. 2012, 57, (5): 46–48 .

8. **Braet F., Seynaeve C., de Zanger R., Wisse E.** Imaging surface and submembranous structures with the atomic force microscope: a study on living cancer cells, fibroblasts and macrophages. *Journal of microscopy*. 1998, 190, (3): 328–338.

9. **Braet F, de Zanger R, Seynaeve C, Baekeland M, Wisse E.** A comparative atomic force microscopy study on living skin fibroblasts and liver endothelial cells. *J Electron Microsc.* 2001, 50: 283–290.

10. **Chomezynski P., Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162: 156–159.

11. **Gelder C.M., Thomas P.S., Yates D.H., Adcock I.M., Morrison J.F.J., Barnes P.** Cytokine expression in normal, atopic and asthmatic subject using the combination of sputum induction and the polymerase chain reaction. *Thorax*, 1995, 50: 1033–1037.

12. **Lin Y., Zhang M., Barnes P.F.** Chemokine production by human alveolar epithelial cell line in response by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 1998, 66 (3): 1121–1126.

13. **Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Firsova E.L., Gushhina E.A.** Effect of Single-walled Carbon Nanotubes on Biological Properties of the cell Cultures of Human Embryonic Fibroblasts. 3rd International Scientific and Practical Conference “Science and Society” ISPC, 2013, 3: 175–184.

14. **Суетина И.А., Подчерняева Р.Я., Гущина Е.А., Лопатина О.А., Поклонов В.А., Остроумов С.А.** Использование клеточных технологий для оценки токсичности наночастиц окислов металлов. Фармацевтические и медицинские биотехнологии, Материалы международной научно практической конференции М.: Экспо-биохим-технологии, РХГУ им. Д.И.Менделеева. 2013: 134–135.

15. **Сосенкова Л.С., Егорова Е.М., Подчерняева Р.Я., Суетина И.А.** Наночастицы серебра, стабилизированные крахмалом: синтез и взаимодействие с клетками *in vitro*. *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2013, 5,1(14): 10–13.

16. **Hosseini S.M., Amini E., Kheiri M.T., Mehrbod P., Shahidi M., Zabihi M.** Anti-influenza Activity of a Novel Polyoxometalate Derivative (POM-4960). *Int. J. Mol. Cell Med.* Winter 2012, 1, (1): 21–29.

17. **Crans, D.C., Mahroof-Tahir, M., Anderson, O.P., Miller M.M.** X-ray Structure of (NH₄)₆ (Gly-Gly)₂V₁₀O₂₈ · 4H₂O: Model Studies for Polyoxometalate-Protein Interactions. *Inorganic Chemistry*. 1994, 33, (24): 558–65590.

18. **Fournier M., Thouvenot R., Rocchiccioli-Deltcheff C.** Catalysis by polyoxometalates. Part 1.—Supported polyoxoanions of the Keggin structure: spectroscopic study (IR, Raman, UV) of solutions used for impregnation *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 1991, 87, (2): 349–356.

ХРОНИКА. КОНФЕРЕНЦИИ 2015

1). «Всемирный конгресс по регенеративной медицине» состоится в Южной Корее с 19 по 21 марта 2015 г.

Информация на сайте: <http://www.bitcongress.com/RMSC-Korea2015/default.asp>.

2). Конференция: «Успехи в клеточной биологии» состоится в Америке (Reston, Virginia) с 20 по 22 марта 2015 г. Тел: 8-86-155-277- 52-170. E-mail: us_mar@engii.org.

3). 3-я Научно-практическая конференция молодых ученых «Трансляционная медицина: от теории к практике» состоится 22 апреля 2015 г. в Санкт-Петербурге в СЗГМУ им. И.И.Мечникова. Информация на сайте университета: <http://szgmu.ru/rus/m/2116/>.

Тел.: 8 (812) 303-50-00. доб. 8656.

4) Конференция: «Эмбриология и биология развития» состоится в Китае (Suzhou) с 12 по 14 июня 2015 г. Тел.: 8-86-151- 724- 79-625. E-mail: bio_june@engii.org.

5). 7-й Российский симпозиум: «Белки и пептиды» состоится в Новосибирском Академгородке с 12 по 17 июня 2015 г. Организаторы: ФГБУН РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и ФГБУН РАН Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемакина и Ю.Ф.Овчинникова. В рамках симпозиума состоится Школа для молодых ученых. Оргкомитет: Кулигина Елена Владимировна. Тел.: 8 (383) 363-51-90.

Информация на сайте: <http://www.proper2015.ru>.

6). Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием: «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии» состоится в Иркутске с 25 по 27 июня 2015 г. Оргкомитет: Филатова Елена Геннадьевна. Тел.: 8-950-140-82-05.

7). «12-й Международный конгресс по клеточной биологии» состоится в Праге (Республика Чехия) с 21 по 25 июля 2015 г.

Информация на сайте: <http://www.cscb.cz/ICCB2016>.

8). Международная научная конференция: «Генетика и биотехнология 21-го века: проблемы, достижения, перспективы», посвященная 50-летию Института генетики и цитологии НАН Беларуси, состоится в Минске с 13 по 16 октября 2015 г. Секретариат: Конюшкевич Лариса Николаевна. Тел.: 8-375-17-294-91-35.

9). Конференция «Транспорт, сигнализация, цитоскелет» состоится с 20 по 22 октября 2015 г. в Санкт-Петербурге в Институте цитологии РАН.

Информация на сайте: <http://www.cytspb.rssi.ru>

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи принимаются редакцией в электронном варианте и в рукописи. Электронный вариант статьи высылается в редакцию по электронной почте в виде **одного файла в формате Microsoft Word для Windows** (рисунки и таблицы вставляются в текст статьи). При создании файла необходимо соблюдать следующие требования:

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

Размер рукописи статьи не должен превышать 10 машинописных страниц. Перед основным текстом статьи приводится краткое **резюме** (не более 1 стр.) и **ключевые слова**. Экспериментальная статья должна состоять из следующих разделов: **вводная часть, материал и методы, результаты, обсуждение и список литературы**. Теоретические и обзорные статьи могут иметь произвольную структуру, но обязательно должны содержать резюме и ключевые слова. В ссылках на литературу в тексте статьи указываются в круглых скобках номера работ в порядке их цитирования. В конце статьи приводится список литературы, который должен содержать библиографические данные всех цитируемых работ. Для статей указываются фамилии и инициалы всех авторов (выделяются жирным шрифтом), название статьи, журнала, год его издания, том, выпуск, страницы. Для книг указываются фамилии и инициалы авторов, год издания, название книги, место издания, издательство и общее число страниц.

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

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

**Адрес редакции: 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4. Институт цитологии РАН.
Отв. редактору Инф. бюлл. «Клеточные культуры» М.С. Богдановой.**

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

Электронный адрес: msb2051@rambler.ru

О Г Л А В Л Е Н И Е

Любич Л.Д., Семенова В.М., Стайно Л.П., Главацкий А.Я. Сравнительная оценка цитотоксического воздействия супернатанта нейрогенных клеток крысы и препарата галавит на культуры глиобластом человека.....	3
Свеженцева И.А., Билько Д.И., Руссу И.З., Билько Н.М. Сравнительное исследование морфофункциональной активности культивируемых <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> клеток костного мозга больных хронической миелоидной лейкемией при терапии ингибиторами тирозинкиназ.....	14
Терюкова Н.П., Воронкина И.В., Смагина Л.В., Иванов В.А. Клетки гепатомы Зайдела в культуре: клонирование и характеристика клональных линий.....	25
Круглова Н.Н., Зинатуллина А.Е. Выявление критической стадии автономности зародыша пшеницы с помощью метода эмбриокультуры <i>in vitro</i>	37
Сельдиминова О.А., Зайцев Д.Ю., Круглова Н.Н. Иммунолокализация цитокинов на начальном этапе полиэмбриогенеза <i>in vitro</i> пшеницы.....	42
Турилова В.И., Горячая Т.С., Яковлева Т.К. Характеристика кариотипа клеточной линии DXB -11, деривата клеточной линии китайского хомячка CHO-K1.....	46
Смирнова С.С., Даниленко Д.М., Смирнова Т.Д., Дунаева Н.В. Изучение влияния противовирусных препаратов на пролиферацию, апоптоз и дифференцировку культивируемых клеток человека.....	54
Суетина И.А., Мезенцева М.В., Гущина Е.А., Лисицин Ф.А., Руссу Л.И., Лопатина О.А., Фирсова Е.Л., Ковалевский С.А., Буданов Б.А., Далидчик Ф.И., Селезнев А.С., Морозов Р.А. Изучение ростовой активности и жизнеспособности культивируемых фибробластов эмбриона человека под воздействием полиоксаметаллатов.....	67
Хроника. Конференции 2015.....	79
Правила для авторов.....	80