

**АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

ISSN 2077- 6055

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ
ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЮЛЛЕТЕНЬ

ВЫПУСК 32

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2016

Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 32.

Отв. ред. М.С. Богданова. - СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2016 – 111 с.

Настоящий выпуск сборника содержит информацию об основных направлениях фундаментальных и прикладных исследований на клеточных культурах.

Сборник «Клеточные культуры» (информационный 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, 2016

© Составление. Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН, 2016

**СОПОСТАВЛЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
КЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ МОНОСЛОЙНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА С ПРИЗНАКАМИ
СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК**

***Н.П. Терюкова, Е.И.Сахенберг, В.А.Иванов, С.А.Снопов**

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

Продолжено исследование клональных линий гепатомы Зайдела, полученных нами после эксплантации в культуру клеток асцитной формы опухоли. Ранее мы показали, что клетки линий 5F и 1E происходят из голоклонов и мероклонов, соответственно, и проявляют признаки опухолевых стволовых и опухолевых прогениторных клеток (ОСК и ОПК). По данным морфометрического анализа клеточные линии значительно различаются по морфологии и площади клеток, по размерам ядер и по ядерно-цитоплазматическому отношению. С помощью теста на зарастание “раны” и видеомикроскопии мы впервые выявили принципиальные отличия в миграционных способностях ОСК и ОПК: клетки линии 5F отличаются автономным поведением и используют амебоидный тип движения для активной миграции в “рану”; клетки-предшественники линии 1E формируют плотные межклеточные контакты, и быстрое зарастание “раны” происходит за счет коллективной миграции клеток. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что мигрирующие клетки линии 5F представляют собой популяцию метастатических ОСК. Кроме того, нами впервые выявлена в клетках культивируемых линий ядерная локализация внутриклеточного домена молекулы адгезии эпителиальных клеток (EрCAM), что свидетельствует об активации EрCAM-сигнального пути в ОСК и ОПК метастатической опухоли.

Ключевые слова: гепатома, метастазирование, опухолевые стволовые клетки, молекула адгезии эпителиальных клеток, клеточная миграция, амебоидный тип движения.

Метастазирование является основной и пока неразрешимой проблемой в борьбе с онкологическими заболеваниями. По существующим представлениям диссеминация опухолевых клеток в организме осуществляется за счет наиболее агрессивной субпопуляции опухолеиницилирующих клеток с высокой миграционной активностью – метастатических опухолевых стволовых клеток (МОСК), и включает ряд дискретных шагов, которые могут быть объединены понятием “метастатического каскада” [1, 2, 3, 4]. Для опухолей эпителиального

происхождения процесс метастазирования начинается с эпителиально-мезенхимного перехода, который связан с приобретением клетками миграционного фенотипа – ослаблением межклеточных контактов, потерей клетками апикально-базолатеральной полярности, подавлением экспрессии эпителиальных маркеров и усилением мезенхимных. Проникновение мигрирующих ОСК в сосудистое русло приводит к появлению циркулирующих опухолевых клеток, которые с током крови или лимфы разносятся по организму и оседают в отдаленных органах с образованием метастазов.

Опухолеассоциированный антиген ЕрСAМ представляет собой трансмембранный гликопротеид с мол. массой 32—42 кДа, гиперэкспрессия которого, как правило, наблюдается в опухолевых клетках эпителиального происхождения и ОСК [5]. В норме ЕрСAМ используется в качестве маркера плюрипотентных эмбриональных и соматических стволовых клеток. В большинстве органов ЕрСAМ синтезируется клетками эпителия и локализуется на базолатеральной поверхности эпителиоцитов, где выполняет функцию молекулы межклеточной гомотипической адгезии [6]. Другая недавно установленная функция ЕрСAМ связана с поддержанием пролиферативной активности и низкодифференцированного статуса эмбриональных стволовых клеток [7,8] и ОСК [9]. Активация ЕрСAМ-сигнального пути [10] начинается с регулируемого внутримембранного протеолиза ЕрСAМ, в результате которого эктодомен ЕрСAМ (ЕрЕХ) отщепляется в межклеточную среду, а эндодомен ЕрIСD – в цитоплазму, где в комплексе с FHL2, бета-катенином и Lef-1 перемещается в ядро и связывается с ДНК для непосредственного участия в регуляции транскрипции генов репрограммирующих факторов – с-Мус, Oct4, Nanog и Sox2 [11,12,13].

Вопрос об экспрессии ЕрСAМ клетками в ходе метастатического процесса обсуждается. Получены данные, что гиперэкспрессия ЕрIСD значительно увеличивает миграционную активность и инвазивность опухолевых клеток [14]. В ряде исследований показано, что экспрессия эпителиальных маркеров, включая ЕрСAМ, на поверхности циркулирующих опухолевых клеток снижается, тогда как повышается уровень экспрессии мезенхимных маркеров [15,16, 17, 18].

В печени синтез ЕрСAМ осуществляется в низкодифференцированных клетках гепацитарного ряда – гепатобластах и овальных клетках, и прекращается в зрелых гепаоцитах [19]. Примерно 35% гепаоцеллюлярных карцином экспрессируют ЕрСAМ, что, по данным Ямашито с соавт. [20], указывает на их происхождение от низкодифференцированной ЕрСAМ-позитивной клетки-прародительницы. Отмечается

повышенная туморогенность ЕрСАМ-позитивных клеток, их способность к самообновлению и дифференцировке [21].

Ранее мы идентифицировали ЕрСАМ в клетках асцитной гепатомы Зайдела крыс, которая является метастатической опухолью и может служить адекватной моделью для изучения мОСК. Далее мы эксплантировали клетки в культуру и клонировали с использованием метода предельных разведений [22]. В результате экспансии образовавшихся голоклонов и мероклонов нами были получены клональные линии с характеристиками ОСК и ОПК, соответственно [23].

С целью углубленного изучения биологии метастатических ОСК и ОПК в настоящей работе мы продолжили исследование клональных линий гепатомы Зайдела – морфологии клеток, локализации в них ЕрСАМ и миграционной активности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на клетках двух клональных линий 5F и 1E гепатомы Зайдела крыс, полученных в нашей лаборатории в 2010—2011 гг. Для этого клетки перевиваемой асцитной гепатомы Зайдела были эксплантированы в культуру и путем длительного отбора разделены на две клеточные линии – монослойную и суспензионную. В результате клонирования монослойной линии с помощью метода предельных разведений были получены 3 голоклона и 2 мероклона, которые дали начало клональным линиям с характеристиками ОСК (линии 3Н, 5F и 6Н) и ОПК (линии 1Е и 9С). Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы Sus-Biol (Биолот, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия), в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Для проведения морфометрического анализа клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали смесью Никифорова (смесь этанола с диэтиловым эфиром в соотношении 1:1) в течение 15 мин и промывали проточной водой. Затем клетки окрашивали гематоксилином (20 мин) и 0,3% эозином (15 сек), хорошо промывая клетки после каждой процедуры. Препараты обезживали в 96% спирте в течение 15 сек и исследовали с помощью микроскопа LSM 5 Pascal (10x, 40x). Площадь окрашенных ядер и клеток определяли с помощью программы анализа изображений ImageJ (NIH, USA). Для каждой клональной линии измеряли не менее 100 клеток и проводили статистическую обработку данных. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) для клеток каждой линии рассчитывали по формуле:

$$\text{ЯЦО} = \text{Средняя площадь ядер} / (\text{Средняя площадь клеток} - \text{средняя площадь ядер}).$$

Достоверность различий средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента при уровне значимости $P < 0,05$.

Локализацию EpCAM в опухолевых клетках определяли с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с последующей лазерной сканирующей конфокальной микроскопией подготовленных препаратов. Клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали в течение 15 мин в 4% растворе параформальдегида (Santa-Cruz Biotechnology, USA), приготовленного на ФБС (10 mM фосфатный буфер, 150 mM NaCl, pH 7.4) и пермеабелизовали с помощью 0,5% раствора Тритона X-100. Для разведения антител и промывки препаратов использовали ФБС, содержащий 0,1% Твин-20. Клетки обрабатывали первичными козлиными антителами A-20 (Santa-Cruz Biotechnology, USA), полученными к внутриклеточному С-терминальному домену EpCAM, при титре 1:50 в течение ночи при 4°C (в контрольных образцах первичные антитела не применяли). Обработку клеток вторичными ослиными антителами, конъюгированными с FITC (Santa-Cruz Biotechnology, USA), проводили при титре 1:100 в течение 1 ч в темноте. Для визуализации ядер ДНК клеток окрашивали DAPI (Santa-Cruz Biotechnology, USA) в течение 1 мин при концентрации 1 мкг/мл. Препарат заключали в среду Fluoroshield (Sigma, USA), и иммунофлуоресцентные изображения клеток получали на электронном конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 с использованием лазеров с длинами волн 488 и 543 нм и масляно-иммерсионного объектива 40x.

Миграционную способность клеток оценивали с помощью теста на “заращение раны” и микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оснащенного оборудованием для долговременного прижизненного наблюдения за культивируемыми клетками. Клетки выращивали в чашке Петри с диаметром 35 мм (Nunk, Дания) примерно до 90%-й конфлюэнтности, наносили на монослое “рану” по диаметру чашки с помощью пластикового наконечника для автоматического дозатора, открепившиеся клетки удаляли промывкой чашек и добавляли свежую среду DMEM с 10% СПК. Чашку Петри помещали на столик микроскопа под объектив Plan-Neofluar X10/0,25 и регистрировали изображения клеток с помощью цифровой камеры AxioCam HRm с разрешением 1388x1040 пикселей в режиме цейтраферной съемки в течение 24 час через каждые 2 мин. Анализ изображений проводили в видеоформате Avi и JPEG.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрический анализ клеточных препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. Клетки клональных линий 5F и 1E происходят от клеток-прародительниц клонов с

разным уровнем цитодифференцировки – опухолеиницирующей (стволовой) клетки и прогениторной клетки, относящейся к популяции ранних транзитных амплифицированных клеток. После пересева 5F-клетки растут клонами, от которых отделяются единичные клетки (рис.1, А, В). В пролиферирующих клонах клетки плотно контактируют друг с другом, но с замедлением роста образуется монослой из клеток неправильной формы, контакты между которыми преимущественно осуществляются за счет тонких выростов. Клетки линии 1Е формируют монослой, в котором различаются зоны мелких и крупных клеток полигональной формы, плотно примыкающих друг к другу и образующих небольшие трабекулы; клетки и ядра различаются по размерам и форме, присутствуют многоядерные клетки-гиганты (рис.1, Б, Г).

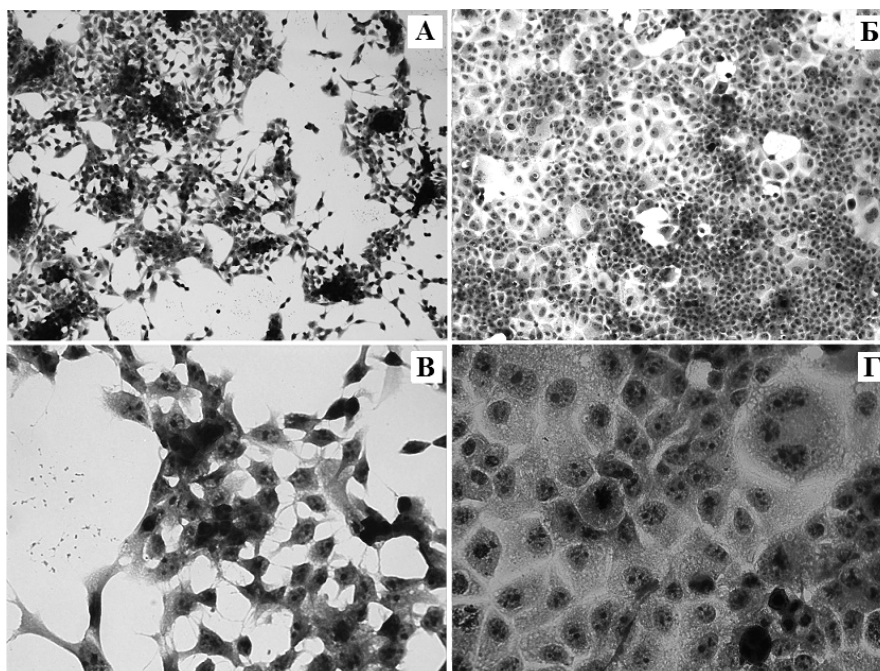


Рис.1. Препараты клеток клональных линий, окрашенные эозином и гематоксилином: А, В – 5F линия, полученная из голоклона, 10х и 40х, соответственно; Б, Г – 1Е линия, полученная из мероклона, 10х и 40х, соответственно.

По данным морфометического анализа клетки линии 1Е статистически достоверно ($P < 0,05$) превосходят по размерам клетки линии 5F: примерно в 3 раза по площади клеток, и в 1,8 раза – по площади ядер. Рассчитанные нами средние значения ЯЦО (табл.) обратно коррелируют с уровнем дифференцировки клеток: высокие значения ЯЦО характеризуют низкодифференцированные ОСК линии 5F, в которых ядра занимают большую часть клеток; в

коммитированных клетках-предшественниках преобладает цитоплазма и ЯЦО снижается. Дополнительные расчеты, проведенные для отдельных клеток линии 1E, показали, что ЯЦО варьирует в широких пределах от 1,4 для мелких клеток до 0,2 для крупных, причем клетки различаются между собой преимущественно по площади цитоплазмы.

Таблица.

Морфометрические показатели клеток клональных линий гепатомы Зайдела

Линия клеток	S клеток (в пикс.)	S ядер (в пикс.)	ЯЦО
1E	48715,4±2687,40	18890,7±788,82	0,63
5F	16076,4±655,06 *	10605,9±493,34 *	1,94

* - отмечены статистически достоверные отличия между линиями, $P < 0,05$.

Определение локализации ЕрСAM. Ранее с помощью поликлональных антител к ЕрICD мы выявили внутриклеточную локализацию ЕрСAM в культивируемых клетках гепатомы Зайдела. В клетках монослойных линий флуоресцентная метка диффузно распределялась в цитоплазме и отсутствовала в области наружных мембран [23]. Для решения вопроса об экспрессии и локализации ЕрСAM в клетках метастатической опухоли и ее роли в поддержании низкодифференцированного статуса клеток мы продолжили исследование с использованием возможностей конфокальной микроскопии. При послойном сканировании клеток линий 5F и 1E, обработанных антителами к ЕрICD, видно слабое, но специфическое окрашивание цитоплазмы (уровень флуоресценции выше, чем в контрольных препаратах). Вместе с тем в ядрах клеток обеих линий обнаружено интенсивное специфическое свечение типа флуоресцирующих “глыбок” или светящихся зерен, преимущественно концентрирующихся вокруг ядрышек (рис. 2). По нашим наблюдениям в делящихся клетках флуоресцирующие “глыбки” в ядрах не определяются, но при этом усиливается диффузное свечение цитоплазмы вокруг формирующихся ядер (рис. 2, Д, Е). Обнаружение ядерной локализации ЕрСAM позволяет сделать заключение об активации ЕрСAM-сигнального пути в низкодифференцированных клетках гепатомы Зайдела и непосредственного участия ЕрICD в регуляции транскрипционной активности клеток.

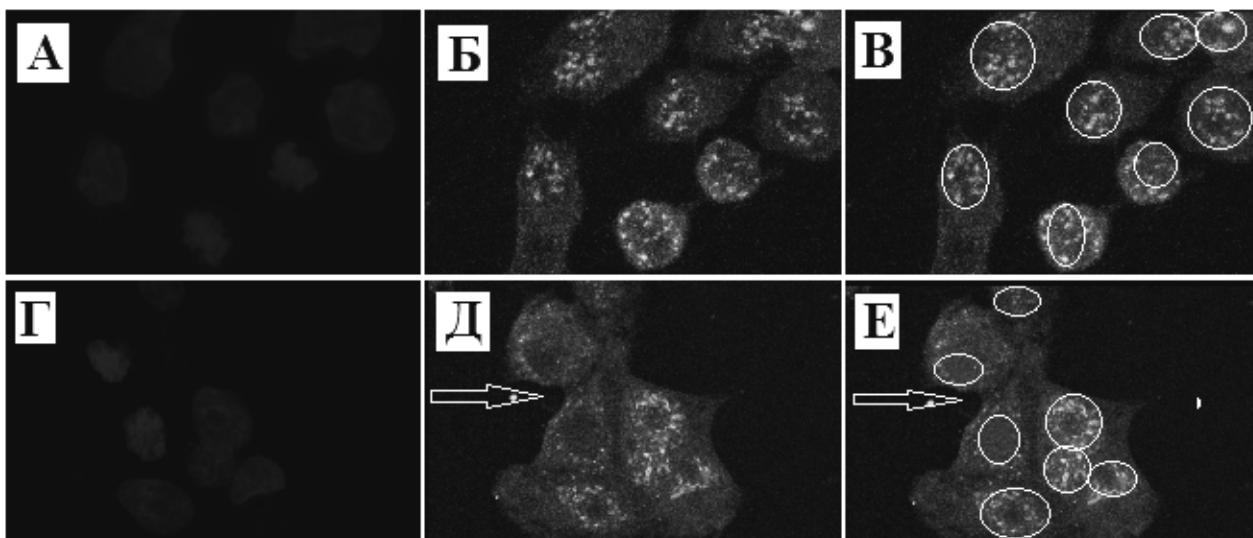


Рис.2. Выявление EpCAM в ядрах клеток линии 5F (А-В) и 1Е (Г-Е).

А и Г – ядра, окрашенные DAPI; Б и Д – клетки, обработанные антителами к EpICD; В и Е – совмещение окраски ядер DAPI с EpCAM-флуоресценцией. Стрелками указаны разделившиеся клетки. Кружками обведены ядра клеток.

Определение миграционной способности опухолевых стволовых клеток и клеток-предшественников метастатической гепатомы Зайдела.

Предполагается, что метастатические ОСК отличаются от субпопуляции опухолеиницирующих клеток способностью к миграции [24]. Изучение подвижности клеток линий 5F и 1Е мы проводили с помощью теста на “заращение раны”. Изменения в количестве клеток в ране, их местоположение и форму фиксировали с помощью цифровой фотокамеры с 2-х минутным интервалом в течение 24 ч. При анализе полученного материала в видео и фото форматах (рис. 3, представлены одни и те же участки раны с интервалом примерно в 4,5 ч) видно, что клеточные линии принципиально различаются между собой по миграционному поведению.

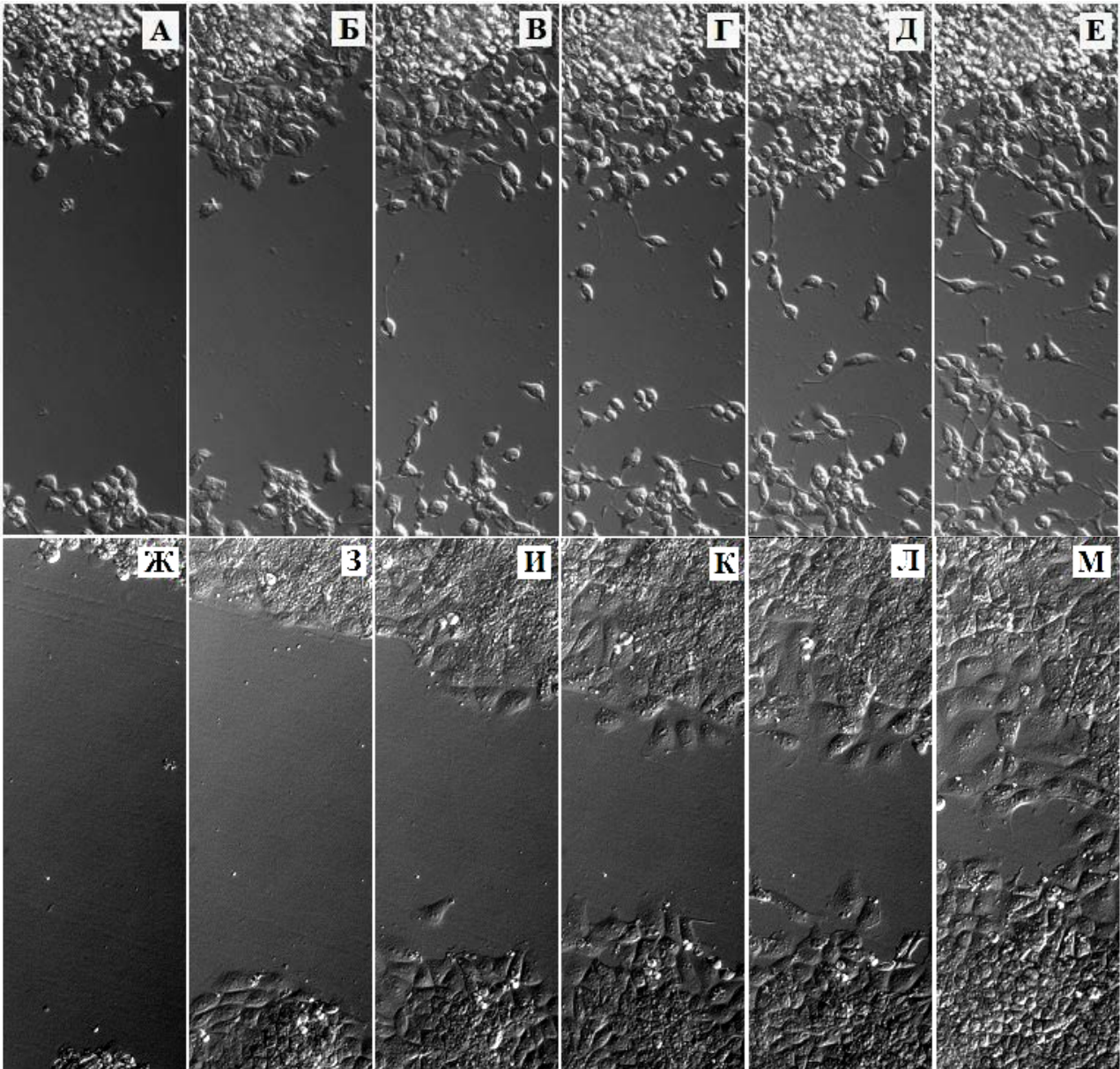


Рис.3. Тест на “заращение раны”: преимущественно амебоидный тип миграции клеток линии 5F (А-Е) и коллективная миграция клеток линии 1Е (Ж-М).

Края “раны” клеточной линии 5F (А-Е) начинают незначительно сближаться примерно через 4 ч с начала эксперимента. Это движение сопровождается дезинтеграцией клеточного монослоя по краям “раны” и миграцией клеток в свободное пространство. Требуется проведение дополнительного анализа механизмов миграции клеток, но уже сейчас можно говорить о сочетании мезенхимного типа миграции с амебоидным типом при преобладании последнего и о быстром переходе от одного механизма движения к другому. Наблюдается образование клетками псевдоподий (ламеллиподий и филоподий) и “хвостов” –

цитоплазматических образований, которые вытягиваются из клеток в начале их передвижения, по-видимому, из-за высокой адгезии клеток к субстрату. Обращает на себя внимание высокая миграционная активность клеток, характерная для амебоидного типа движения. Кроме того, подтверждаются данные морфологического анализа об отсутствии плотного контакта между клетками в монослой у линии 5F - клетки при появлении свободного пространства начинают в него мигрировать.

Иная картина складывается для клеток линии 1E. Уже в первые минуты наблюдения края «раны» начинают движение навстречу друг другу. При этом отмечается коллективная миграция клеток, когда клетки переднего края тянут за собой остальную монослой, клетки которого находятся в плотном контакте. При этом трудно сказать, в какой степени это процесс миграции, а в какой степени сближение краев происходит за счет клеточной пролиферации. По нашим наблюдениям, пролиферативный процесс захватывает зоны мелких клеток, из которых клетки выдвигаются в «рану» и увеличиваются в размерах. В случае клеток линии 1E одиночные клетки практически не покидают монослой и в «рану» не мигрируют, а те, которые появляются в «ране» – через мезенхимно-эпителиальный переход примыкают к монослою.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточные линии, полученные из опухолей эпителиального происхождения, при клонировании *in vitro* формируют колонии сходные по морфологии с колониями, которые продуцируют стволовые и транзитные амплифицированные клетки-предшественники нормального эпителия – голоклоны, меро- и параклоны [25]. Нам известны три исследования, в которых с целью углубленного изучения клеток с характеристиками ОСК были получены клеточные линии из голоклонов [26, 27, 28]. При этом не было создано ни одной линии клеток из мероклонов и, тем более, из параклонов. Нам удалось получить клеточные линии из голо- и мероклонов монослойной линии гепатомы Зайдела, которые пережили неоднократную криозаморозку и более 30 пассажей, сохранив присущие своему происхождению характеристики. Клеточные популяции 5F и 1E отличаются по существу. Клетки линии 5F (обладающие опухолеиницирующими свойствами и индуцирующие развитие асцитной формы опухоли при внутрибрюшинном введении беспородным крысам) не обладают морфологическими признаками эпителиальных клеток, они не формируют плотного монослоя и отличаются определенной автономностью. Наблюдение за поведением клеток в видеоформате показывает их высокую миграционную активность, причем передвижение клеток осуществляется преимущественно по амебоидному типу. Совсем иной тип клеточной

популяции продуцируют мероклоны. Клетки линии 1E не туморогенны, что было показано ранее, образуют монослой, в котором клетки плотно примыкают друг к другу и мигрируют в «рану» единым фронтом. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что клеточная линия 5F представлена метастатическими ОСК, миграция которых осуществляется по амебоидному типу.

Недавно в серии работ на биопсийном материале опухолей эпителиального происхождения с использованием антител к EpEX и EpICD было установлено, что плохой прогноз заболевания и развитие метастатического процесса коррелируют со сменой мембранной локализации EpCAM на ядерную [29, 30, 31, 32]. При этом, по мнению авторов, иммуноцитохимическое исследование ткани не позволяло однозначно говорить о ядерной локализации EpICD.

В нашей работе впервые выявлена ядерная локализация EpICD в культивируемых клетках. Тот факт, что эти клеточные линии были получены в результате эксплантации клеток метастатической опухоли, подтверждает формирующееся представление об активации EpCAM-сигнального пути в ходе метастатического процесса.

Авторы статьи выражают искреннюю благодарность заведующему Лабораторией йонных механизмов клеточной сигнализации, д.б.н. Ю.А. Негуляеву за предоставленную возможность и неоценимую помощь в проведении исследований на микроскопе AxioObserver.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Mimeault M., Batra S.K.** New advances on critical implications of tumor- and metastasis-initiating cells in cancer progression, treatment resistance and disease recurrence. *Histol. Histopathol.* 2010, 25:1057-1073.
2. **Baccelli I., Trumpp A.** The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J. Cell Biol.* 2012, 198: 281-293.
3. **Shiozawa Y., Nie B., Pienta K.J., Morgan T.M., Taichman R.S.** Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacol Ther.* 2013, 138: 285-293.
4. **Geiger T.R., Peeper D.S.** Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2009, 1796: 293-308.
5. **Imrich S., Hachmeister M., Gires O.** EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh. Migr.* 2012, 6: 30-38.
6. **Litvinov S.V., Velders M.P., Bakker H.A., Fleuren G.J., Warnaar S.O.** Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 1994, 125: 437-446.
7. **González B., Denzel S, Mack B, Conrad M, Gires O.** EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells.* 2009, 27:1782-1791.

8. **Lu T.Y., Lu R.M., Liao M.Y., Yu J., Chung C.H., Kao C.F., Wu H.C.** Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 2010, 285: 8719-8732.
9. **Schnell U., Cirulli V., Giepmans B.N.** EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013, 1828:1989-2001.
10. **Oishi N., Yamashita T., Kaneko S.** Molecular biology of liver cancer stem cells. *Liver Cancer.* 2014, 3: 71-84.
11. **Hachmeister M., Bobowski K.D., Hognl S., Dislich B., Fukumori A., Eggert C., Mack B., Kremling H., Sarrach S., Coscia F., Zimmermann W., Steiner H., Lichtenthaler S.F., Gires O.** Regulated intramembrane proteolysis and degradation of murine epithelial cell adhesion molecule mEpCAM. *PLoS One.* 2013, 8 (8): e 71836.
12. **Munz M., Baeuerle P.A., Gires O.** The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 2009, 69: 5627-5629.
13. **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.
14. **Jachin S., Bae J.S., Sung J.J., Park H.S., Jang K.Y., Chung M.J., Kim D.G., Moon W.S.** The role of nuclear EpICD in extrahepatic cholangiocarcinoma: association with β -catenin. *Int. J. Oncol.* 2014, 45 (2): 691-698.
15. **Kallergi G., Papadaki M.A., Politaki E., Mavroudis D., Georgoulas V., Agelaki S.** Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2011, 13 (3): R59.
16. **Gorges T.M., Tinhofer I., Drosch M., Röse L., Zollner T.M., Krahn T., von Ahsen O.** Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2012, 12: 178.
17. **Gires O., Stoecklein N.H.** Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cell Mol. Life Sci.* 2014, 71:4393-4402.
18. **Raimondi C., Nicolazzo C., Gradilone A.** Circulating tumor cells isolation: the "post-EpCAM era". *Chin. J. Cancer Res.* 2015, 27: 461-470.
19. **Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM.** The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells.* 2006, 24: 1852-1858.
20. **Yamashita T., Forgues M., Wang W., Kim J.W., Ye Q., Jia H., Budhu A., Zanetti K.A., Chen Y., Qin L.X., Tang Z.Y., Wang X.W.** EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2008, 68: 1451-1461.
21. **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 (3): 1012-1024.
22. **Терюкова Н.П., Блинова Г.И., Иванов В.А.** Клетки гепатомы Зайдела при культивировании *in vitro*. *Цитология.* 2013, 55 (1): 36-44.
23. **Терюкова Н.П., Воронкина И.В., Смагина Л.В., Иванов В.А.** Клетки гепатомы Зайдела в культуре: клонирование и характеристика клональных линий. В сб.: *Клеточные культуры.* Информационный бюллетень. 2015, 31: 25-37.
24. **Brabletz T., Jung A., Spaderna S., Hlubek F., Kirchner T.** Migrating cancer stem cells — an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Reviews Cancer.* 2005, 5: 744-749.

25. **Locke M., Heywood M., Fawell S., Mackenzie I.C.** Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* 2005, 65: 8944-8950.
26. **Miloszewska J., Gos M., Przybyszewska M., Trembacz H., Koronkiewicz M., Janik P.** Mouse sarcoma L1 cell line holoclones have a stemness signature. *Cell Prolif.* 2010, 43: 229-234.
27. **Rao G.H., Liu H.M., Li B.W., Hao J.J., Yang Y.L., Wang M.R., Wang X.H., Wang J., Jin H.J., Du L., Chen Q.** Establishment of a human colorectal cancer cell line P6C with stem cell properties and resistance to chemotherapeutic drugs. *Acta Pharmacol. Sin.* 2013, 34: 793-804.
28. **Yao J., Xie J., Li J., Wei X., Yang Y., Chen H.** Establishment of subseries cell lines from tongue cancer single cell and detection of cancer stem cell markers. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2013, 31: 86-90.
29. **Ralhan R., He H.C., So A.K., Tripathi S.C., Kumar M., Hasan M.R., Kaur J., Kashat L., MacMillan C., Chauhan S.S., Freeman J.L., Walfish P.G.** Nuclear and cytoplasmic accumulation of Ep-ICD is frequently detected in human epithelial cancers. *PLoS One.* 2010, 5: e14130.
30. **Ralhan R., Cao J., Lim T., Macmillan C., Freeman J.L., Walfish P.G.** EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer.* 2010, 10: 331.
31. **Fong D., Moser P., Kasal A., Seeber A., Gastl G., Martowicz A., Wurm M., Mian C., Obrist P., Mazzoleni G., Spizzo G.** Loss of membranous expression of the intracellular domain of EpCAM is a frequent event and predicts poor survival in patients with pancreatic cancer. *Histopathology.* 2014, 64: 683-692.
32. **Fong D., Seeber A., Terracciano L., Kasal A., Mazzoleni G., Lehne F., Gastl G., Spizzo G.** Expression of EpCAM(MF) and EpCAM(MT) variants in human carcinomas. *J. Clin. Pathol.* 2014, 67: 408-414.

**КЛЕТочная линия человека ESCV-304 как модель для изучения влияния
антиоксидантных препаратов на пролиферацию и апоптоз клеток при
инфицировании вирусом гриппа А и в присутствии бактериального
липополисахарида**

Т.Д. Смирнова¹, С.С. Смирнова^{1,2}, К.В. Сивак¹, Е.М. Еропкина¹, М.Ю. Еропкин¹

¹ФГБУ НИИ гриппа МЗ России, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого, cellcultures@influenza.spb.ru

Заболевание, вызванное вирусом гриппа А, нередко носит тяжелый характер, особенно после наложения вторичной бактериальной инфекции, при которой в кровь попадают эндотоксины бактерий, в том числе липополисахарид грамотрицательных бактерий. В связи с этим ведутся поиски новых лекарственных препаратов для лечения больных гриппом. Целью

настоящей работы явилось изучение влияния ряда лечебных препаратов, обладающих антиоксидантной, противовоспалительной и ангиопротекторной активностью на пролиферацию и апоптоз культивируемых эндотелиоцитов линии ECV-304, зараженных разными дозами вируса гриппа А и при добавлении бактериального липополисахарида. Тестировались следующие препараты: глутатион, N-ацетилцистеин, тролокс, карведилол, ресвератрол, дикумарин, нитрендипин, рутин и алпизарин. Пролиферация клеток, сниженная после заражения высокими дозами вируса, повышалась до уровня контроля после добавления глутатиона, ресвератрола, алпизарина и рутина. В меньшей степени повышали пролиферацию дикумарин и N-ацетилцистеин. В то же время повышенный уровень пролиферации клеток, наблюдаемый при заражении очень низкими дозами вируса, снижался до уровня контроля под действием практически всех тестируемых препаратов, за исключением нитрендипина. В опытах на клетках, зараженных вирусом гриппа в присутствии бактериального липополисахарида, были получены сходные результаты. Индекс апоптоза в исследуемых клетках повышался почти во всех вариантах экспериментов. Лишь три лечебных препарата – рутин, алпизарин и глутатион снижали уровень апоптоза клеток, зараженных разными дозами вируса гриппа, а также при добавлении липополисахарида. Полученные результаты свидетельствуют о том, что почти все тестируемые лекарственные средства могут нормализовать физиологическое состояние клеток, зараженных вирусом гриппа, снижая уровень их избыточной пролиферации и элиминируя поврежденные клетки путем апоптоза.

Ключевые слова: клетки эндотелия ECV-304, вирус гриппа А, липополисахарид, антиоксиданты, пролиферация, апоптоз.

Вирус гриппа А, как правило, вызывает заболевание легкой или средней тяжести, однако бывают случаи тяжелых осложнений в виде вторичных бактериальных инфекций. В результате применяемой антибактериальной терапии в кровь поступает большое количество компонентов разрушенных бактерий. Грамотрицательные бактерии и компоненты их клеточной стенки эндотоксины – липополисахариды (LPS) являются основным, но не исключительным фактором, ответственным за возникновение сепсиса, что может быть причиной легочной, почечной и сердечной недостаточности (1). Эндотоксин в дополнение с другими бактериальными молекулами запускает генерализованный иммунный ответ, как клеточный, так и гуморальный с индукцией про- и противовоспалительных медиаторов. Этими

медиаторами являются цитокины, факторы коагуляции, молекулы адгезии, миокардиальные депрессанты и др. (2).

Клетки сосудистого эндотелия одни из первых входят в контакт с циркулирующими бактериальными молекулами, распознают их с помощью Toll-like рецепторов и экспрессируют провоспалительные медиаторы и тканевой фактор. В норме клеточный иммунитет на бактериальные токсины обеспечивает защиту от инфекции, при которой биологическая активность антибактериальных медиаторов контролируется специфическими ингибиторами. При сепсисе этот баланс нарушается и гиперактивация клеточной реакции может приводить к нарушению нормального функционирования клеток и их гибели (3). В процессе сепсиса дисбаланс между продукцией активных форм кислорода/азота (ROS/RNS) и их эффективным удалением антиоксидантами приводит к нарушению проницаемости клеточных мембран, поражению и гибели клеток эндотелия в результате некроза и апоптоза (4).

Вирус гриппа, как и LPS в условиях *in vitro* может непосредственно вызывать дисфункцию сосудистого эндотелия. Но в организме подобный эффект происходит также вследствие вторичной реализации воспалительных медиаторов, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкин-1 бета (IL-1 β), фактор роста опухоли бета (TGF β), интерфероны (IFN) и другие, продуцируемые макрофагами и иммунными клетками (5, 6). Вирус гриппа А способен индуцировать продукцию ROS/RNS, что приводит к оксидативному стрессу, продукции металлопротеиназ (MMP-9), к патологическим изменениям в клетках различных органов, в том числе и к дисфункции клеток эндотелия (7).

В процессе изучения *in vitro* взаимоотношения вируса гриппа А с клетками нами был обнаружен различный ответ клеток на вирус, который зависел от степени инфицированности клеток – множественности инфекции (МИ). В случае высокой степени инфицированности клеток вирусом гриппа клетки погибали в результате некроза или апоптоза, тогда как при очень низкой степени вирусной инфекции клетки отвечали стимуляцией пролиферации и увеличением апоптоза. Различный ответ клеток при разной степени инфицированности вирусом гриппа А позволяет моделировать состояние клеток при острой вирусной инфекции (высокая МИ) и хронической (низкая МИ). Подобная реакция на очень низкие дозы заражения вирусом гриппа А обнаружена практически у всех перевиваемых клеточных линий человека лимфоцитарного/моноцитарного происхождения и у перевиваемых клеток эпителиального (A-549) и эндотелиального (ECV-304) происхождения (8, 9). Применение при острых формах заболевания вирусом гриппа антивирусных препаратов с целью блокирования репликации

вирусных частиц нередко малоэффективно и часто приводит к возникновению вирусных частиц, устойчивых к данному препарату. Антибактериальные препараты вызывают разрушение бактерий, что приводит к появлению в плазме крови огромного количества бактериальных компонентов, в частности, LPS. В связи с этим ведутся поиски других лечебных препаратов для терапии гриппа, направленных на восстановление нормального физиологического состояния клеток и функционирования сигнальных клеточных путей.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ряда лечебных препаратов, обладающих антиоксидантной, противовоспалительной и ангиопротекторной активностью на пролиферацию и апоптоз культивируемых эндотелиоцитов линии ECV-304, зараженных разными дозами вируса гриппа А и при добавлении бактериального липополисахарида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Перезиваемые клеточные линии: спонтанно трансформированные клетки эндотелия человека (ECV-304) и клетки почки собаки (MDCK) получены из Коллекции клеточных культур ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ. Клетки культивировали в среде альфа-МЕМ с добавлением 2 % бычьей эмбриональной сыворотки (ЭС) без антибиотиков. Пересев клеток проводили на 6–7 сут с кратностью 1:3 – 1:5, используя для отторжения клеток раствор Версена с химопсином.

Вирус гриппа субтипа H3N2 A/Брисбен/10/07 поддерживали на куриных эмбрионах. Титры вирусов составляли 5–6 lg ТЦД₅₀ (титр цитопатического действия, вызывающего поражение 50 % монослоя клеток MDCK). За одну инфицирующую дозу (ИД) в 1 мл принимали последнее десятикратное разведение титруемого вируса. Высокая доза заражения вирусом составляла 1000 ИД, низкая доза заражения – 1 ИД.

Концентрированный раствор (1 мг/мл) LPS *Escherichiacoli* (Sigma-Aldrich, США) в среде альфа-МЕМ хранили при 4⁰ С и расходовали в работе в течение 1–2 недель. Конечная концентрация LPS составляла 100 нг/мл. Краткая характеристика исследуемых препаратов и используемые концентрации приведены в табл. 1.

Оценку цитотоксичности препаратов проводили с помощью МТТ-тестирования на клетках, выращенных в 96-луночных планшетах (Nunc, Дания) (10).

Для **проведения опыта** использовали 4–5-суточную культуру клеток ECV-304 с посевной концентрацией $7-8 \times 10^4$ кл./мл. Заражение 1–суточного монослоя клеток, выращенного в 24-луночных планшетах (Nunc, Дания), осуществляли с помощью внесения 0.1 мл заранее оттитрованной вирусосодержащей жидкости (для учета апоптоза в лунки вкладывали покровные стекла). Контакт вируса с клетками проходил при 37° С в течение 45 мин в бессывороточной среде альфа-MEM с добавлением трипсина (1 мкг/мл) и антибиотиков (пенициллин/стрептомицин). Затем клетки отмывали от вируса и вносили 0.5 мл исследуемого препарата, 0.5 мл среды с добавлением 2 % ЭС и 2 мкг/мл трипсина, после чего в лунки вносили 0.1 мл LPS (конечная концентрация 100 нг/мл). Контролем служили культуры, которые инкубировали с интактными, не содержащими вируса и LPS средами. Учет опыта проводили на 4–5 сут.

Для **оценки интенсивности пролиферации** клетки в лунках без покровных стекол снимали раствором Версена с химопсином и подсчитывали в камере Фукса-Розенталя количество клеток, неокрашенных трипановым синим. Пролиферативную активность клеток оценивали по отношению числа выросших зараженных клеток к числу контрольных (интактных) клеток на этом же сроке культивирования. Результаты выражали в процентах в виде доли от контроля, который принимали за 100 %.

Апоптоз клеток оценивали по степени фрагментации ядерного хроматина. Клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали смесью метанола с уксусной кислотой в соотношении 3:1 и окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst-33258. Определяли долю апоптотических клеток, просматривая не менее 300 – 500 клеток под люминесцентным микроскопом при увеличении объектива $\times 90$, используя масляную иммерсию. Результаты выражали в виде индекса апоптоза (ИА) по формуле $ИА = (b/c) \times 100 \%$, где b– число апоптотических клеток, с– общее число просмотренных клеток. Окрашивание клеток красителем Hoechst-33258 являлось одновременно контролем за контаминацией клеток Л-формами бактерий и микоплазмами. На каждую временную точку использовали по 2 лунки, все эксперименты проводили не менее 3-х раз.

Статистический анализ выполнен с использованием теста U–Манна-Уитни для сравнения двух групп непараметрических выборок. Значимыми считали различия при $P < 0.05$.

Таблица 1.

Краткая характеристика препаратов и их конечные концентрации

Препарат и фирма изготовитель	Краткая характеристика препарата	Используемая в опытах конечная концентрация
Глутатион восстановленный (Sigma-Aldrich, США)	Трипептид, образующийся в организме из цистеина, глутаминовой кислоты и глицина. Мощный антиоксидант и детоксикант	163 мкмоль/л
N-ацетилцистеин (Sigma-Aldrich, США)	Модифицированная форма цистеина, способствует синтезу глутатиона в организме. Обладает антиоксидантной и противовоспалительной активностью	306 мкмоль/л
Тролокс (Sigma-Aldrich, США)	Водорастворимый аналог антиоксиданта витамина Е	200 мкмоль/л
Карведилол (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария)	Альфа- и бета-адреноблокатор. Обладает мембраностабилизирующей и антиоксидантной активностью, тормозит пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток	123 мкмоль/л
Ресвератрол (Bath # 00301008, Чехия)	Природный стильбеновый фитоалексин. Обладает антиоксидантной, противовоспалительной, противоопухолевой, кардиопротекторной активностью	219 мкмоль/л
Умбеллиферон(дикумарин) (SERVA, Германия)	7-гидроксикумарин, скимметин. Обладает антигенотоксическим и антиаллергическим действием, спазмолитической и антимикробной активностью	310 мкмоль/л
Нитрендипин субстанция(Институт органического синтеза, OSI, Латвия)	Обладает гипотензивным, сосудорасширяющим, антиангинальным и нефропротективным действием. Антагонист кальция	139 мкмоль/л
Рутозид (рутин) (SERVA, Германия)	Гликозид флаваноида кверцетина, обладает Р-витаминной активностью. Ангиопротектор, уменьшает проницаемость и ломкость сосудов.	82 мкмоль/л
Алпизарин (мангиферин) (ФГБНУ ВИЛАР, Россия)	Противовирусный и антибактериальный препарат растительного происхождения. Обладает антиоксидантной и противовоспалительной активностью	50 мкг/мл

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка цитотоксичности препаратов, проведенная на клетках ECV-304, показала полное отсутствие токсичности глутатиона, N-ацетилцистеина, ресвератрола и алпизарина и небольшую токсичность дикумарина и тролокса при максимальных используемых концентрациях (6.2 и 4 ммоль/л, соответственно). Небольшая токсичность была выявлена у

препаратов рутин (205 мкмоль/л) и карведилол (615 мкмоль/л). Цитотоксичность для клеток рабочих растворов препаратов, хранящиеся при +4⁰ С на протяжении 1.5 мес, не изменилась.

Изучение влияния препаратов на пролиферацию контрольных, не зараженных вирусом гриппа клеток ECV-304 показало, что все исследуемые препараты практически не влияли на пролиферацию. В клетках, зараженных высокой дозой вируса гриппа (1000 ИД), пролиферация снижалась на 36.7%, при этом только под воздействием глутатиона пролиферация клеток восстанавливалась полностью до уровня контроля. Под воздействием ресвератрола, алпизарина и рутина пролиферация восстанавливалась до 91.6 – 93.5% относительно контрольных незараженных клеток, в меньшей степени пролиферацию повышали дикумарин (до 82.8 %) и N-ацетилцистеин (до 77.6 %) (рис. 1).

В то же время вирус-стимулированное повышение пролиферации клеток (до 135.2 %), наблюдаемое при заражении клеток очень низкими дозами вируса (1 ИД), снижали до уровня контроля практически все препараты, за исключением нитрендипина, который достоверно не подавлял вирус-стимулированную пролиферацию (рис. 1).

Добавление LPS *E.coli* к контрольным клеткам (без вируса) незначительно повышало пролиферацию клеток (на 7 %). В то же время сниженная в присутствии высоких ИД вируса пролиферация клеток восстанавливалась до 88.8% (от уровня контроля) после добавления LPS. Однако LPS не влиял на вирусстимулированную пролиферацию клеток, вызванную низкой ИД заражения вируса (рис. 1). Ингибирующее влияние препаратов на вирус-стимулированную пролиферацию клеток, зараженных низкими дозами вируса гриппа в присутствии LPS, было практически таким же, как и в случае заражения клеток одним вирусом гриппа, т. е. ингибирующую активность проявляли все препараты, кроме нитрендипина. В то же время, в клетках, зараженных высокой ИД вируса в присутствии LPS, достоверное восстановление пролиферации происходило после добавления всех препаратов, за исключением N-ацетилцистеина и алпизарина (рис. 1).

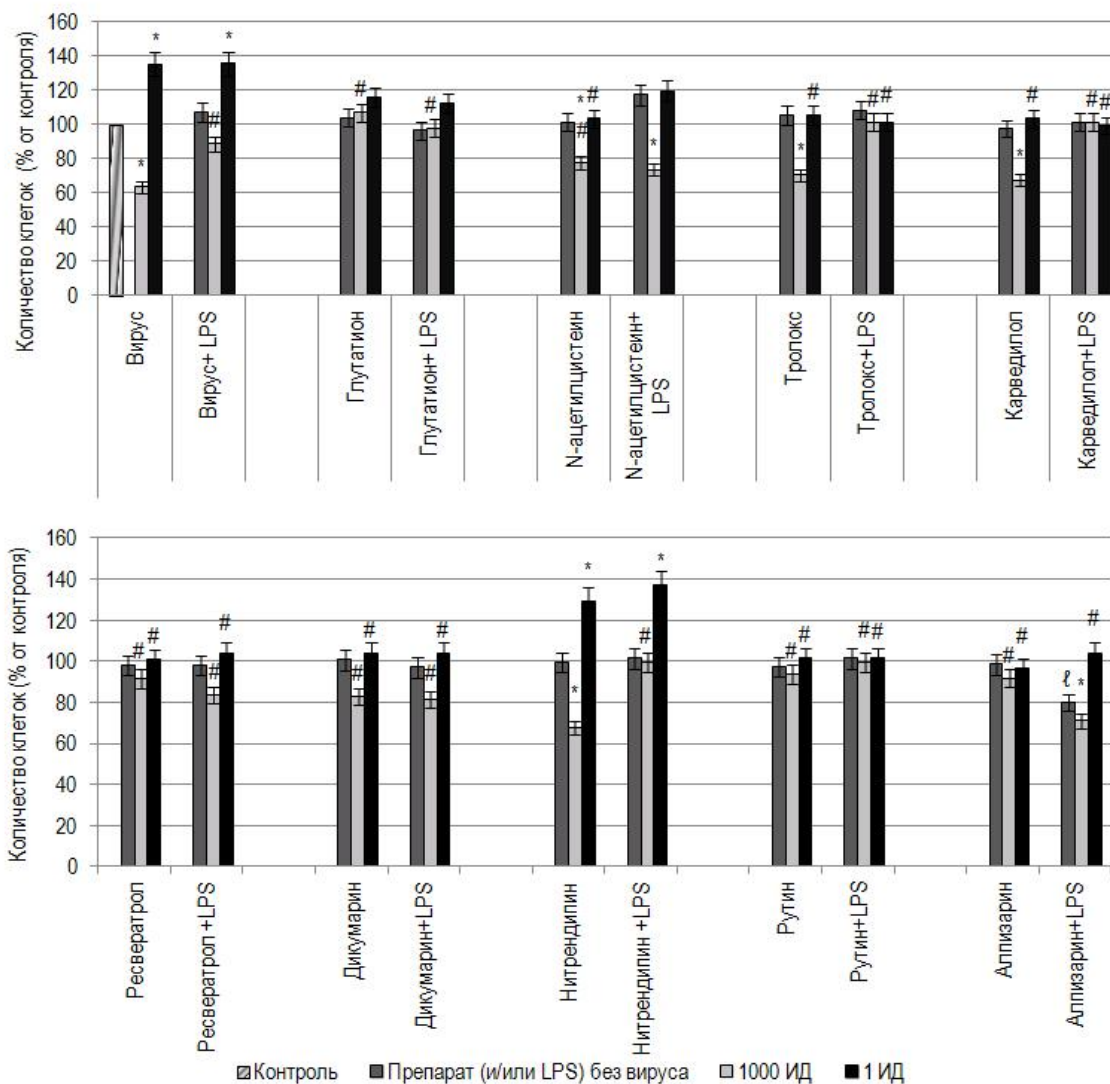


Рис. 1. Влияние исследуемых препаратов на пролиферацию клеток ECV-304, зараженных вирусом гриппа А и при добавлении LPS (* - отличие от контроля, $P < 0.05$; # - отличие от клеток, зараженных вирусом, $P < 0.05$; l - отличие от клеток с LPS, $P < 0.05$).

Изучение апоптоза в клетках ECV-304 показало, что при заражении клеток высокой (1000 ИД) и низкой (1 ИД) дозами вируса уровень апоптоза повышается с 1.05 % (в контрольных, незараженных клетках) до 3.7 % и 2.9 %, соответственно. Из исследованных препаратов способность к индукции апоптоза обнаружена у тролокса, ресвератрола, карведилола, дикумарина, нитрендипина (ИА от 2.5 до 3.2 %) и очень слабая - у глутатиона (ИА 2 %); N-ацетилцистеина и алпизарин достоверно не повышали уровень апоптоза (рис. 2). Влияние препаратов на индукцию апоптоза в клетках, зараженных высокой ИД вируса гриппа А, было

следующим: уровень апоптоза значительно повышался только в присутствии N-ацетилцистеина и дикумарина (ИА 7.3 и 7.1 %, соответственно), небольшое повышение апоптоза отмечено также в присутствии тролокса, ресвератрола и нитрендипина (ИА от 4.2 до 4.6 %), в то же время апоптоз был снижен при добавлении глутатиона, рутина и алпизарина (ИА от 1.6 до 2.4 %). В случае заражения клеток низкой ИД вируса уровень апоптоза повышали препараты N-ацетилцистеин, тролокс и нитрендипин (ИА 4.0– 5.0 %), в присутствии глутатиона, ресвератрола и дикумарина уровень апоптоза был незначительно повышен (ИА от 3.4 до 3.6 %), а добавление рутина и алпизарина также снижало уровень апоптоза, как и в случае заражения клеток высокой дозой вируса (ИА 1.7 и 1.0 %, соответственно) (рис. 2).

Добавление LPS к клеткам ECV-304 в отсутствие вируса гриппа индуцировало апоптоз (ИА 3.3 %), а в зараженных вирусом клетках – снижало (ИА 3.1 % при высокой ИД и 2.4 % при низкой ИД вируса). Присутствие одного LPS совместно с препаратами тролокс, карведилол и нитрендипин повышало апоптоз клеток ECV-304 (ИА 4.6–5.3 %), а с препаратами ресвератрол, глутатион и алпизарин – снижало (ИА 0.8–2.2 %). Влияние исследуемых препаратов на апоптоз в клетках, зараженных вирусом гриппа в присутствии LPS, сохранялось, в основном, в том же виде, что и без LPS: уровень апоптоза был повышен в присутствии N-ацетилцистеина, тролокса, дикумарина и нитрендипина (ИА 5.5 – 6.35 % при высокой ИД и 3.6 – 4.5 % при низкой ИД). Снижение апоптоза наблюдалось в присутствии глутатиона, рутина и алпизарина при высокой ИД (от 0.8 до 2.3 %). При низкой ИД снижение апоптоза отмечено при добавлении алпизарина (ИА 1.8 %) и глутатиона (ИА 1.1 %) (рис. 2).

Полученные результаты, приведенные в сводной табл. 2, позволяют провести сравнение степени влияния исследуемых препаратов на пролиферацию и апоптоз клеток эндотелия при разной степени инфицированности вирусом гриппа А и в условиях сепсиса (добавление LPS). Обращает на себя внимание, что практически все препараты ингибировали повышенную пролиферацию клеток, которая наблюдалась при низкой степени инфицированности клеток вирусом гриппа А и сохранялась при добавлении LPS. Повышение пролиферации клеток при самой низкой ИД заражения вирусом может моделировать состояние клеток при хронической инфекции, когда в процессе применяемой противовирусной терапии количество вирусных частиц снижается. В результате снижения синтеза ряда вирусных белков происходит стимуляция пролиферации клеток, которая сопровождается усилением апоптоза, что может привести к повышению клеточной проницаемости и дисфункции клеток. Это состояние усиливается при наложении вторичной вирусной инфекции или при добавлении LPS. Заражение клеток

высокой ИД вируса, при которой наблюдается подавление клеточной пролиферации, может моделировать острую вирусную инфекцию. В этих условиях только несколько препаратов восстанавливали клеточную пролиферацию почти до контрольного уровня: глутатион, ресвератрол, рутин и алпизарин.

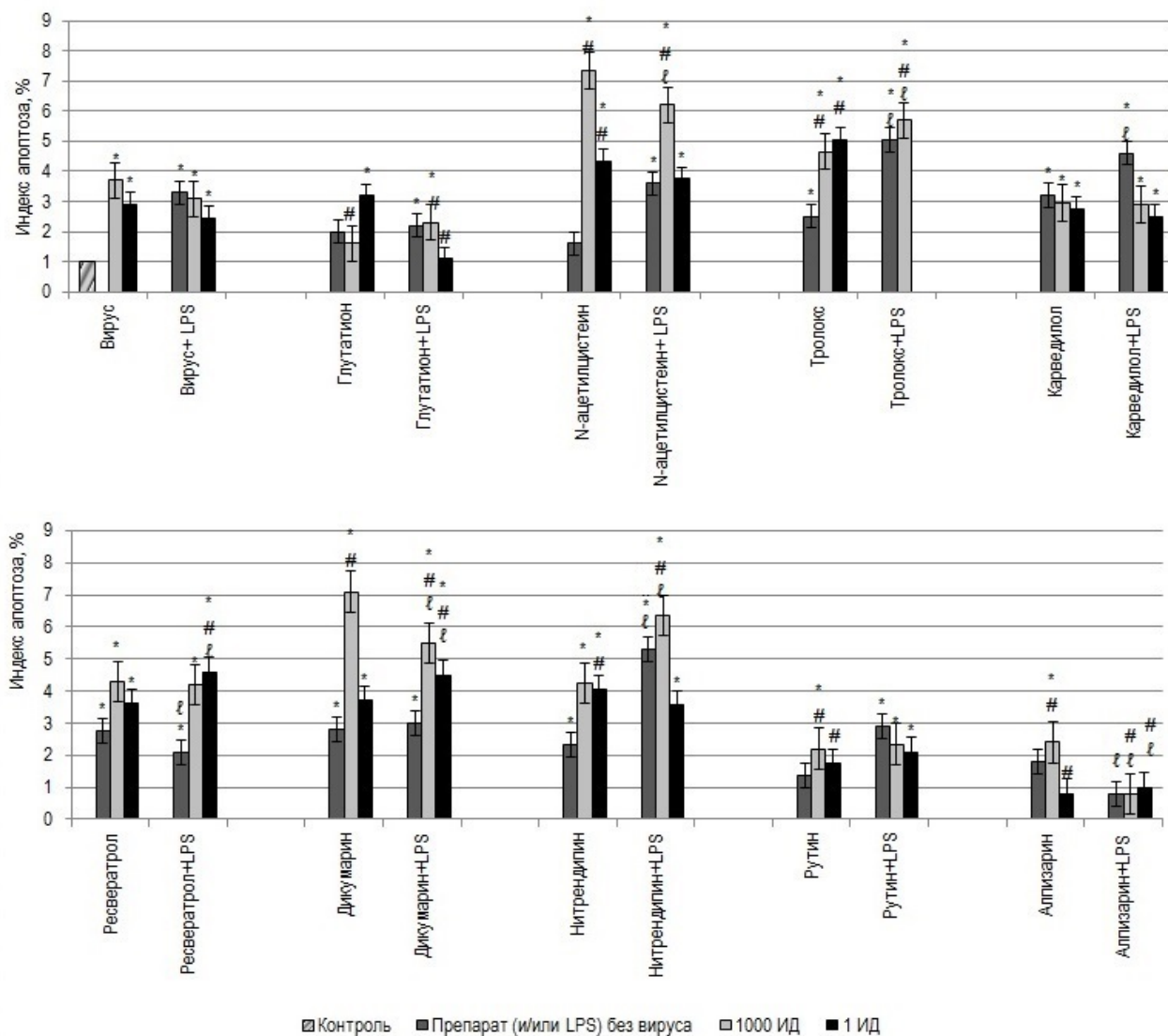


Рис. 2. Влияние исследуемых препаратов на апоптоз клеток ECV-304, зараженных вирусом гриппа и при добавлении LPS (* - отличие от контроля, $P < 0.05$; # - отличие от клеток, зараженных вирусом, $P < 0.05$; l - отличие от клеток с LPS, $P < 0.05$).

Таблица 2.

Действие исследуемых препаратов на пролиферацию и апоптоз клеток.

Препарат	Пролиферация				Апоптоз					
	Вирус		LPS		Препарат без вируса	Вирус		LPS		
	Высокая ИД	Низкая ИД	Высокая ИД	Низкая ИД		Высокая ИД	Низкая ИД	LPS без вируса	Высокая ИД	Низкая ИД
Вирус или LPS Без препарата	↓*	↑*	↑#	↑*		↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
Глутатион восстановленный	↑#	↓#	↑#	↓#	↑	↓#	↑* _#	↑*	↑↓* ↓#	↓#
N-ацетилцистеин	↑#	↓#	—	—	—	↑* #	↑* #	↑*	↑* # ℓ	↑*
Тролокс	↓* _#	↓#	↑#	↓#	↑*	↑* #	↑* #	↑* ℓ	↑* # ℓ	
Карведилол	↓* _#	↓#	↑#	↓#	↑*	↑* _#	↑* _#	↑* ℓ	↑*	↑*
Ресвератрол	↑#	↓#	↑#	↓#	↑*	↑* _#	↑* _#	↑↓* ℓ	↑*	↑* # ℓ
Дикумарин	↑#	↓#	↑#	↓#	↑*	↑* #	↑* _#	↑* _ℓ	↑* # ℓ	↑* # ℓ
Нитрендипин	↓* _#	↑* _#	↑#	↑* _#	↑*	↑* _#	↑* #	↑* ℓ	↑* # ℓ	↑* _#
Рутин	↑#	↓#	↑#	↓#	—	↑↓* #	↓#	↑* _ℓ	↑* _# ℓ	↑* _# ℓ
Алпизарин	↑#	↓#	↓* _#	↓#	—	↑↓* #	↓#	↓ℓ	↓# ℓ	↓# ℓ

Примечание: ↑ - усиление, ↓ - подавление, — нет эффекта;

* по сравнению с контролем (интактные клетки); # по сравнению с клетками, зараженными вирусом; ℓ - по сравнению с клетками с LPS.

В то же время практически все препараты (за исключением рутина, алпизарина и глутатиона) обладали способностью индуцировать апоптоз. Многие препараты (N-ацетилцистеин, тролокс, ресвератрол, дикумарин, нитрендипин) также повышали уровень апоптоза при заражении клеток вирусом и в присутствии LPS, за исключением рутина, алпизарина и глутатиона, которые снижали уровень апоптоза клеток, зараженных вирусом в высокой и низкой дозах и при добавлении LPS.

Из всех перечисленных выше препаратов противовирусная активность по отношению к вирусу гриппа А наиболее хорошо изучена у глутатиона. Вирус гриппа А снижает содержание эндогенного антиоксиданта – глутатиона в результате оксидативного стресса, при этом

чувствительность клеток к вирусу значительно повышается. Дополнительное добавление глутатиона блокирует продукцию вирусных частиц в клетках MDCK (*in vitro*) и в клетках легких и трахеи мышей (*in vivo*), снижая экспрессию вирусного матричного белка и ингибируя вирус-индуцированную активацию каспаз (11). Противовирусное действие глутатиона показано также на модели хорио-аллантоисных оболочек куриных эмбрионов и клетках MDCK, при этом тролокс и ресод подобного эффекта не обнаружили (12). Показана зависимость репродукции вируса гриппа в клетках и перmissивность клеток к вирусу от внутриклеточного редокс состояния клеток хозяина: клетки, экспрессирующие антиапоптозный белок Bcl-2, содержали высокий уровень глутатиона. В подобных клетках (MDCK) была снижена экспрессия поздних вирусных белков (гемагглютинина и M1) и ядерно-цитоплазматическая транслокация вирусного нуклеопротеина (vRNP) (13). Позже эта же группа исследователей показала, что гидрофобный дериват глутатиона (GSH-C4) подавлял репликацию вируса гриппа в клеточных культурах и в летально зараженных мышах, снижая их смертность и разрушение легких. На модели клеточных культур было показано, что GSH-C4 ингибирует процесс фолдинга и созревания вирусного гемагглютинина, снижая олигомеризацию вирусного белка, в результате чего его мономер задерживается в эндоплазматическом ретикулуме, вместо продвижения к цитоплазматической мембране (14). Способность к подавлению репликации сезонных вирусов гриппа А и птичьего вируса гриппа А обнаружена также у N-ацетилцистеина. В клетках эпителиоидного происхождения (A-549) ингибирующий эффект N-ацетилцистеина на вирусную репликацию сопровождался снижением синтеза провоспалительных цитокинов и апоптоза (15). Есть также сообщение о способности ресвератрола – полифенола растительного происхождения, обладающего антиоксидантной активностью, подавлять *in vitro* и *in vivo* репликацию вируса гриппа (16).

Сравнительно недавно появились сообщения о способности клеток эндотелия в присутствии LPS приобретать признаки фибробластов в результате процесса, известного как endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT). Превращение клеток эндотелия в фибробласты происходило в результате воспалительного процесса, образования ROS и последующей гибели большей части клеток, но даже при высокой концентрации LPS часть клеток оставалась живой и подвергалась трансформации (17). Изменения в клетках эндотелия, связанные с переходом в сторону фибробластов (повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , увеличение миграции клеток), ингибировались в присутствии антиоксидантов глутатиона и N-ацетилцистеина (18, 19). Подобные изменения, вызванные LPS, сходны с обнаруженными

нами изменениями в интенсивности пролиферации и индукции апоптоза клеток эпителиального и эндотелиального происхождения после заражения низкими дозами вируса гриппа (20). Ведущую роль ROS/RNS в этом процессе подтверждает снижение вирус-стимулированной пролиферации клеток исследованными нами препаратами с антиоксидантной активностью, однако пока трудно объяснить, какие изменения происходят в популяции клеток эндотелия в случае снижения апоптоза некоторыми препаратами.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что препараты, обладающие антиоксидантной и противовоспалительной активностью, и некоторые препараты, используемые при сердечнососудистой терапии, могут нормализовать физиологическое состояние клеток, снижая их избыточную пролиферацию или элиминируя поврежденные клетки путем апоптоза. Показано, что на фоне терапии указанными лекарственными средствами процессы взаимодействия вируса гриппа А с клетками могут отличаться от таковых при обычном течении гриппозной инфекции. То есть, для изученных лекарственных препаратов была установлена вторичная фармакодинамика, не связанная с их непосредственным прямым фармакологическим действием, что открывает определенные перспективы для комплексного этио-патогенетического лечения, как самого гриппа, так и его осложнений в виде соматической патологии. В связи с этим необходимо провести дополнительные исследования для понимания процессов, происходящих на клеточном и молекулярном уровне при заражении клеток эндотелиального происхождения вирусом гриппа А, и подбора наиболее эффективных сочетаний противовирусных препаратов и цитопротекторов с антиоксидантным, противовоспалительным и/или сосудопротекторным действием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Schwartz D., Mendonca M., Schwartz I., Xia Y., Satriano J., Willson C., Blantz R.**Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin. Invest.* 1997, 100: 439-448.
2. **Peters K., Unger R., Brunner J., Kirkpatrick C.** Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc. Res.* 2003, 60: 49-57.
3. **Dauphinee Sh., Karsan A.** Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab. Invest.* 2006, 86: 9-22.
4. **Huet O., Dupic L., Harrois A., Duranteau J.** Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front.Biosci. (Landmark Ed).* 2011,16: 1986-1995.
5. **Armstrong S., Mubareka S., Lee W.**The lung microvascular endothelium as a therapeutic in severe influenza. *Antiviral. Res.* 2013, 9: 113-118.

6. **Hiyoshi M., Indalao I., Yano M., Yamane K., Takahashi E., Kido H.** Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 β -mediated b-catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability. *Arch.Virol.* 2015,160: 225-234.
7. **Lee Y., Lai C., Hsieh S., Shieh C., Huang L., Wu-Hsieh B.** Influenza A virus induction of oxidative stress and MMP-9 is associated with severe lung pathology in a mouse model. *VirusRes.* 2013, 178 (2): 411-422.
8. **Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М., Кузнецова И.К., Рыжак Г.А.** Разработка модели взаимоотношения вируса гриппа А с перевиваемыми лимфобластоидными клетками человека для изучения биологических особенностей вируса и определения активности противовирусных препаратов. *Клеточные культуры. Информ. бюлл.* 2009, 24: 25-34.
9. **Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Гудкова Т.М., Писарева М.М., Кадырова Р.А., Слита А.В.** Влияние различных инфицирующих доз вирусов гриппа А на пролиферацию перевиваемых клеток человека. *Клеточные культуры. Информ. бюлл.* 2011, 27: 3-12.
10. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol. Methods.*1983, 65 (1-2): 55-63.
11. **Cai J., Chen Y., Seth S., Furukawa S., Compans R., Jones D.** Inhibition of influenza infection by glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 34 (7): 928-936.
12. **Еропкин М.Ю., Гудкова Т.М., Коновалова Н.И., Щеканова С.М., Ягловская И.Б., Еропкина Е.М., Киселев О.И.** Противовирусное действие некоторых антиоксидантов /антигипоксантов, а также их комбинаций с ремантадином в отношении вирусов гриппа человека А (H3N2) на моделях *in vitro*. *Экспер. и клин.фармакол.* 2007, 70 (5): 33-37.
13. **Nencioni L., Iuvara A., Aquilano K., Coriolo M., Cozzolino F., Rotilio G., Garaci E., Palamara A.** Influenza A virus replication is dependent on an antioxidant pathway that involves GSH and Bcl-2. *FASEB J.* 2003, 17 (6): 758-770.
14. **Sgarbanti R., Nencioni L., Amatore D., Coluccio P., Fraternali A., Sale P., Mammola C., Carpino G., Gaudio E., Magnani M., Ciriolo M., Garaci E., Palamara A.** Redox regulation of the influenza hemagglutinin maturation process: a new cell-mediated strategy for anti-influenza therapy. *Antioxid Redox Signal.* 2011, 15(3): 593-606.
15. **Geiler J., Michaelis M., Naczek P., Leutz A., Langer K., Doerr H., Cinatl J.** N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *Biochem. Pharmacol.* 2010, 79(3): 413-420.
16. **Palamara A., Nencioni L., Aquilano K., De Chiara G., Fernandez L., Cozzolino F., Ciriolo M., Garaci E.** Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *J.Infect. Dis.* 2005,191:1719-1729.
17. **Echeverria C., Montorfano I., Hermosilla T., Armisen R., Velasquez L., Cabello-Verrugio C., Varela D., Simon F.** Endotoxin induces fibrosis in vascular endothelial cells through a mechanism dependent on transient receptor protein melastatin 7 activity. *PLoS ONE.* 2014, 9(4). e94146: 1-11.
18. **Montorfano I., Becerra A., Cerro R., Echeverria C., Saez E., Morales M., Fernandez R., Cabello-Verrugio C., Simon F.** Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF- β 1 and TGF- β 2-dependent pathway. *Lab. Invest.* 2014: 1-15.
19. **Sarmiento D., Montorfano I., Caceres M., Echeverria C., Fernandes R., Cabello-Verrugio C., Cerda O., Tapia P., Simon F.** Endotoxin-induced vascular endothelial cell migration is dependent on TLR4/NF- κ B pathway, NAD(P)H oxidase activation, and transient receptor potential melastatin 7 calcium channel activity. *Intrn.J.Biochem. Cell Biol.* 2014, 55: 11-23.
20. **Даниленко Д.М., Смирнова С.С., Смирнова Т.Д., Писарева М.М., Плотникова М.А., Дурнова А.О., Еропкин М.Ю.** Ответ клеток перевиваемых линий карциномы легкого (A-549) и

эндотелия (ECV-304) человека на заражение вирусом гриппа А при различной степени инфицированности клеток. Цитология. 2016, 58(3): 192-200.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ КЛЕТОК ЛИНИЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

В.И. Турилова, Т.К. Яковлева

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

Количество копий и активность рибосомных генов определяют структурно-функциональную организацию ядрышка (и генома в целом) и обеспечивают жизнедеятельность и жизнеспособность клеток. Дерегуляция синтеза рРНК и биогенеза рибосом нарушают клеточный гомеостаз и играют ведущую роль в возникновении и прогрессии опухолей.

Клеточные линии опухолевого происхождения представляют удобную модель для изучения различных аспектов онкогенеза, включая функциональный статус ядрышкообразующих районов хромосом (ЯОР).

Анализ функциональной активности ЯОР хромосом клеток линий множественной миеломы (ММ) человека проведен на препаратах метафазных хромосом, окрашенных нитратом серебра. Клеточные линии ММ, отличающиеся по степени дифференцировки и уровню ploидности клеток различались по числу, составу, суммарному размеру и ассоциативной способности Ag-положительных ЯОР (AgЯОР) хромосом. Так, в околодиплоидных клеточных линиях число Ag-положительных ядрышкообразующих (AgЯО) хромосом варьировало от 4 (U266) до 8 (L363), в околотриплоидных составляло 12 (RPMI 8226) и 14 (U1996). Наименьший средний суммарный размер AgЯОР — 7.19 ± 0.03 усл. ед. обнаружен в клетках U266, наибольший — 24.82 ± 0.09 усл. ед. — в клетках U1996. Доля клеток с ассоциациями AgЯО хромосом варьировала от 0 (Karpas 707) до 41 % (U1996), а доля хромосом, участвующих в ассоциациях — от 1.5 % (U266) до 11.25 % (L363). Сопоставление значений среднего суммарного размера AgЯОР хромосом клеток ММ, длительно существующих в условиях *in vitro*, и ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови здоровых индивидов (данные литературы) показывает, что клеточные линии ММ характеризуются низкой копийностью активных рибосомных генов, что возможно соответствует уровню дифференцировки клеток, вовлекающихся в трансформацию при ММ *in vivo*.

Ключевые слова: клеточные линии множественной миеломы человека: L363, Karpas 707, RPMI 8226, U266, U1996, Ag-положительные ядрышкообразующие районы хромосом, полиморфизм AgЯОР хромосом, суммарный размер AgЯОР хромосом, ассоциации AgЯО хромосом.

Взаимосвязь биогенеза рибосом с пролиферацией, дифференцировкой, старением и гибелью клеток и, следовательно, нарушение координации этих процессов, определяют фундаментальную роль ядрышка в туморогенезе (1). Основным этапом биогенеза рибосом, определяющим выбор клеткой метаболического пути, является транскрипция рДНК (2, 3, 4). Сигнальные каскады, активирующиеся в клетке в ответ на внешние стимулы, при действии митогенов или факторов роста, а также продукты онкогенов и опухолевые супрессоры, контролирующие прохождение фаз клеточного цикла, «сходятся» на компонентах, участвующих в транскрипции рДНК (2, 3).

В митозе ряд белков, участвующих в транскрипции рибосомных генов — RPA 194 и RPA 135 субъединицы РНК-полимеразы I, кофактор UBF и транскрипционный фактор SL 1 — остаются связанными с рДНК (5). Способность UBF и субъединиц РНК-полимеразы I окрашиваться нитратом серебра (6) позволяет оценивать функциональную активность ЯОР хромосом в предшествующей митозу интерфазе на препаратах метафазных хромосом.

Известно, что размер AgЯОР метафазных хромосом является стабильным наследуемым признаком каждого ЯОР и отражает количество транскрипционно активных копий рибосомных генов в данной ядрышкообразующей хромосоме (7, 8). В нормальном кариотипе человека кластеры рибосомных генов локализованы в коротких плечах акроцентрических хромосом 13, 14, 15 пар (группа D) и 21, 22 пар (группа G).

Для определения размеров AgЯОР хромосом наибольшее распространение получил метод, основанный на полуколичественной визуальной оценке размеров AgЯОР в условных единицах (баллы 0–3 или 0–4) (9–12). Сумму размеров 10 AgЯОР в кариотипе человека (критерий суммарной функциональной активности ЯОР) предложено использовать как меру относительного количества (геномная доза) активных рибосомных генов в диплоидных клетках данного индивида, позволяющую сравнивать геномы по этому признаку (10, 12).

В результате многочисленных исследований, главным образом на ФГА-стимулированных лимфоцитах периферической крови, был охарактеризован межхромосомный,

межиндивидуальный и межпопуляционный полиморфизм ЯОР хромосом человека (10 - 13). Показано, что в ФГА-стимулированных лимфоцитах крови здоровых индивидов число AgЯОР хромосом составляет 8—10. Установлены пределы варьирования суммарного размера 10 AgЯОР хромосом человека в норме — от 14.9 до 23.7 усл. ед., при среднем значении этого показателя около 19 усл. ед. (13). Предполагается, что выход за границы указанных значений приводит к элиминации организма на стадии зиготы или раннего эмбрионального развития, а также к возникновению патологического состояния клеток (10).

Опухолевые клетки *in vivo* значительно менее изучены в отношении функциональной морфологии ЯОР метафазных хромосом. Число серебрищихся (AgЯО) хромосом в клетках различных опухолей человека может как соответствовать, так и заметно отклоняться от значений, характерных для ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови (14).

В клетках линий, полученных из разнообразных опухолей человека число AgЯОР хромосом как правило становится постоянным и представляет индивидуальную характеристику кариотипа (15, 16). Постоянство или минимальная изменчивость числа AgЯОР хромосом в клетках данной линии предполагает, что геномная доза активных рибосомных генов существенна и для выживания клеток в условиях *in vitro*. Можно предположить, что суммарный размер AgЯОР хромосом, также как и их число, является индивидуальной и значимой характеристикой кариотипа клеточной линии. Однако сведения о функциональной активности ЯОР хромосом, исследованных в метафазе митоза длительно культивируемых *in vitro* опухолевых клеток крайне малочисленны (17) и не систематизированы. Поэтому вполне закономерен вопрос о значениях и пределах варьирования суммарного размера AgЯОР хромосом в опухолевых клетках *in vitro*.

Множественная миелома — злокачественная опухоль, которая развивается в костном мозге. В процесс трансформации при ММ вовлекаются В-клетки на заключительных этапах их дифференцировки в плазматические клетки. По фенотипическим особенностям миеломные клетки подобны плазмобластам или долгоживущим плазматическим клеткам (18).

Целью настоящей работы был анализ функционального состояния ЯОР хромосом в метафазе митоза клеток линий ММ человека, различающихся по степени дифференцировки и уровню пloidности клеток.

Материал и методы

Работа выполнена на клетках линий ММ человека L363, Karpas 707, RPMI 8226 и U-266, кариотип и кариотипическая структура популяций которых исследованы нами ранее (19), и

клетках линии U1996, детальный анализ кариотипа которой не проводили. По степени дифференцировки клетки Каграс 707 и U266 подобны плазматическим клеткам (20, 21). Клетки линий L363, RPMI 8226 и U1996 (22, 23, 24) представляют плазмобласты различной степени зрелости: от менее зрелых (U1996) до более зрелых (RPMI 8226).

Клетки культивировали в среде RPMI 1640 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Анализ функциональной активности ЯОР хромосом в метафазных клетках проведен в период максимальной митотической активности — через 2 сут (L363, Каграс 707, RPMI 8226) и через 3 сут (U-266, U1996) после посева культур.

Приготовление препаратов метафазных хромосом проводили без предварительной инкубации клеток с колхицином. Известно, что митотические яды (колхицин, колцемид) блокируя клетки в метафазе митоза одновременно приводят к увеличению доли клеток с ассоциациями (Ac) AgЯО хромосом (25). Клетки обрабатывали гипотоническим раствором, содержащим 0.075 М KCl (Sigma, США) и 1%-ый цитрат натрия (Sigma, США) (1:1), в течение 20–25 мин при комнатной температуре. Фиксацию клеток проводили смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1), с трехкратной сменой фиксатора. Суспензию клеток раскапывали на охлажденные влажные предметные стекла, препараты высушивали на воздухе или с помощью выжигания фиксатора. Селективное окрашивание ЯОР хромосом нитратом серебра (Sigma, США) выполняли по модифицированному методу (26).

Активность ЯОР хромосом в клеточных линиях оценивали по числу, размеру и ассоциативной способности AgЯОР. Для каждой клеточной линии анализировали 100 метафазных пластинок с модальным числом хромосом и числом хромосом, ограниченным интервалом изменчивости по числу хромосом (табл. 1) (19). В клетках линии U1996 модальное число хромосом и интервал изменчивости по числу хромосом определяли в метафазных пластинках, окрашенных нитратом серебра.

Для определения функциональной активности рибосомных генов использовали метод визуальной оценки размеров AgЯОР в условных единицах (усл. ед.) (11,12). Размеры AgЯОР оценивали по интенсивности Ag-окрашивания: 0 – отсутствие окраски, 1 – слабая окраска (гранула серебра меньше ширины хроматиды, 2 – средняя окраска (гранула серебра примерно соответствует ширине хроматиды), 3 – сильная окраска (гранула серебра больше ширины хроматиды) (рис. 1).

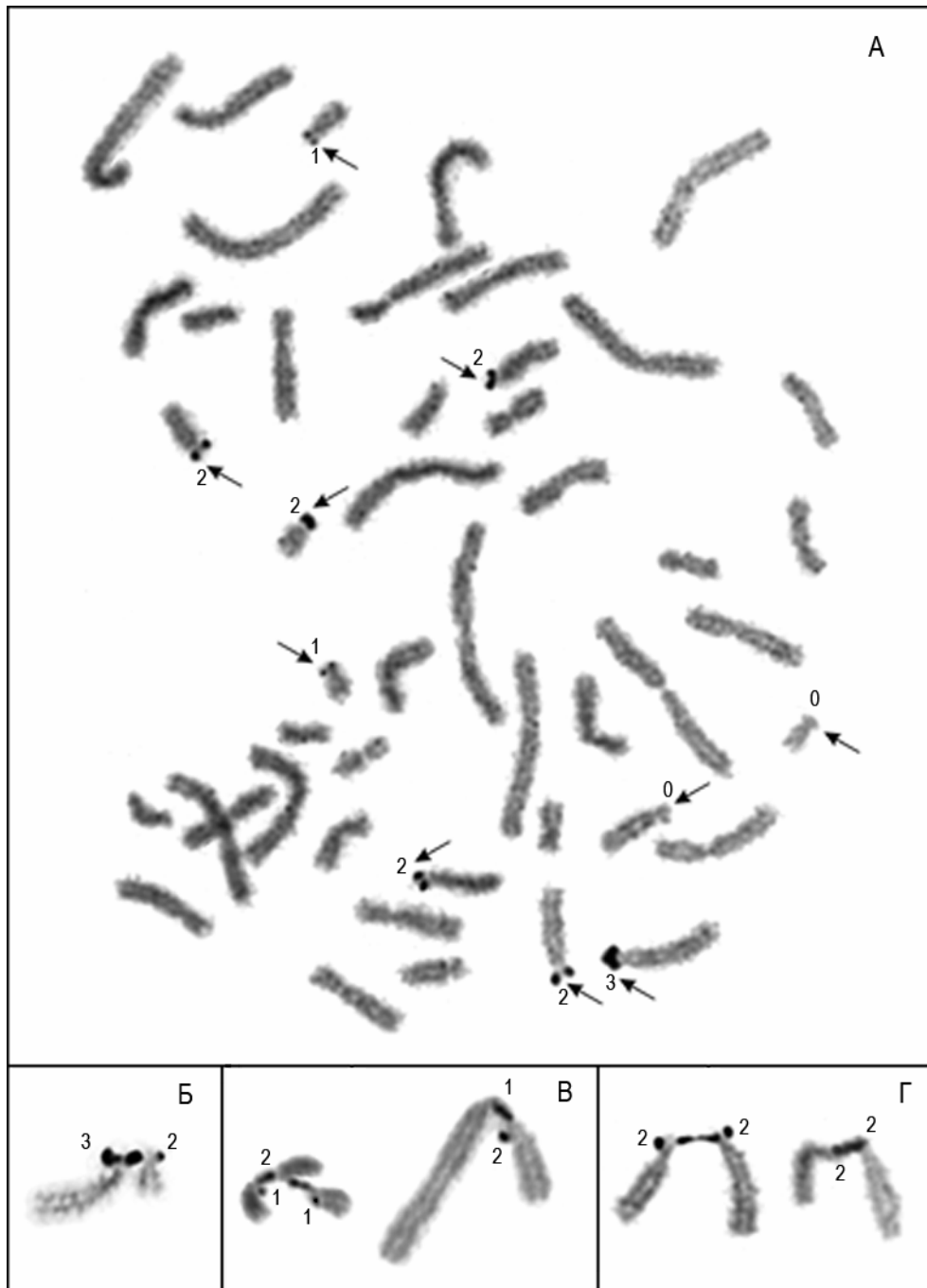
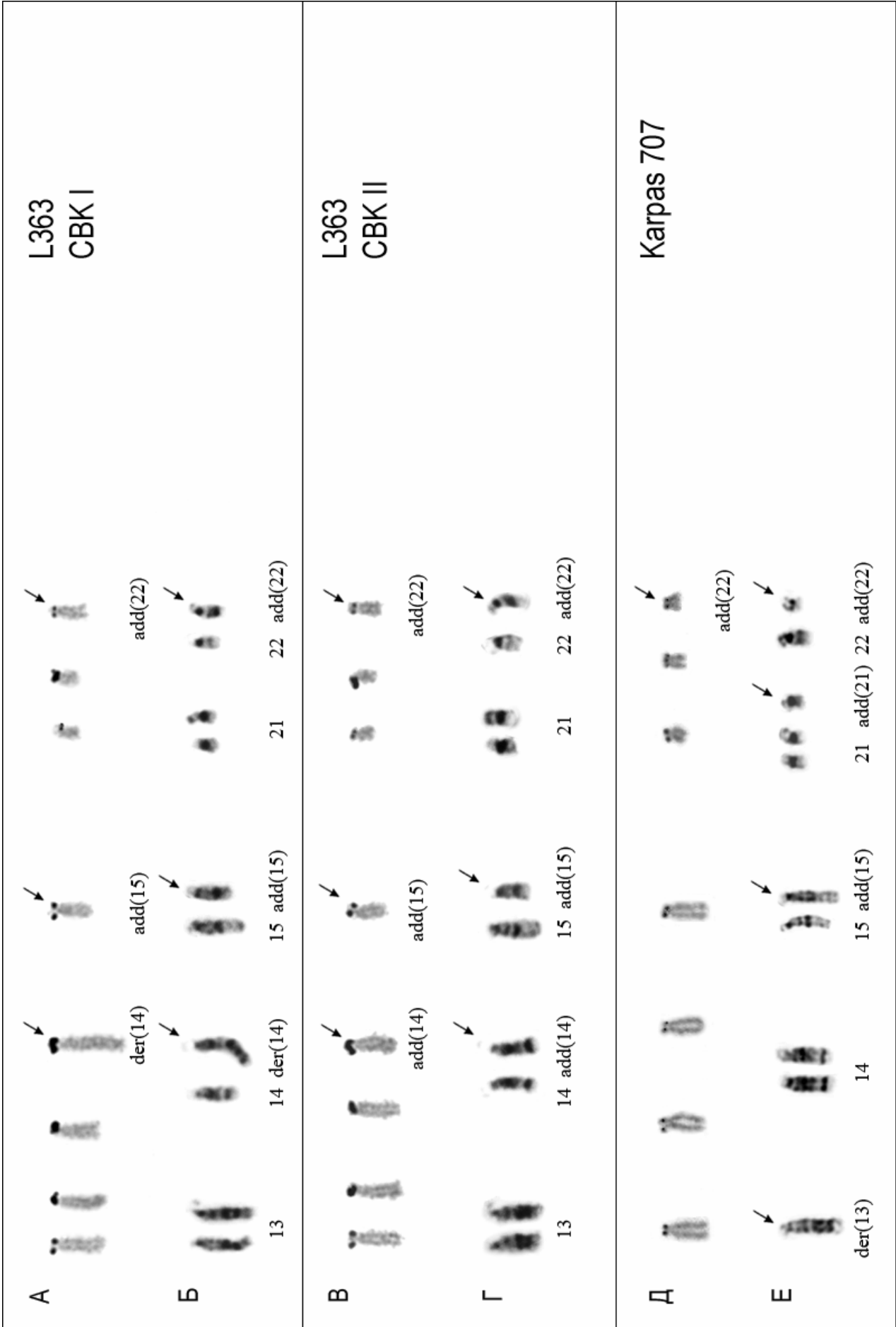


Рис. 1. Оценка размеров AgЯОР хромосом, А — метафазная пластинка клетки линии L363, в которой размеры AgЯОР хромосом варьируют от 0 до 3 усл. ед. (указаны цифрами). Ассоциации AgЯО хромосом из одной клетки линий L363 (Б), RPMI 8226 (В) и U1996 (Г).

В каждой метафазной пластинке подсчитывали суммарный размер AgЯОР (сумма в усл. ед. размеров индивидуальных AgЯОР) в соответствии с критерием суммарной функциональной активности ЯОР хромосом (10) и затем определяли его среднее значение для 100 метафазных пластинок отдельной клеточной линии. Кроме того, определяли долю метафаз с ассоциациями AgЯОР хромосом (ассоциативный индекс, АИ). Критерием ассоциации ЯО хромосом являлось наличие между AgЯОР аргентофильного материала (рис. 1)



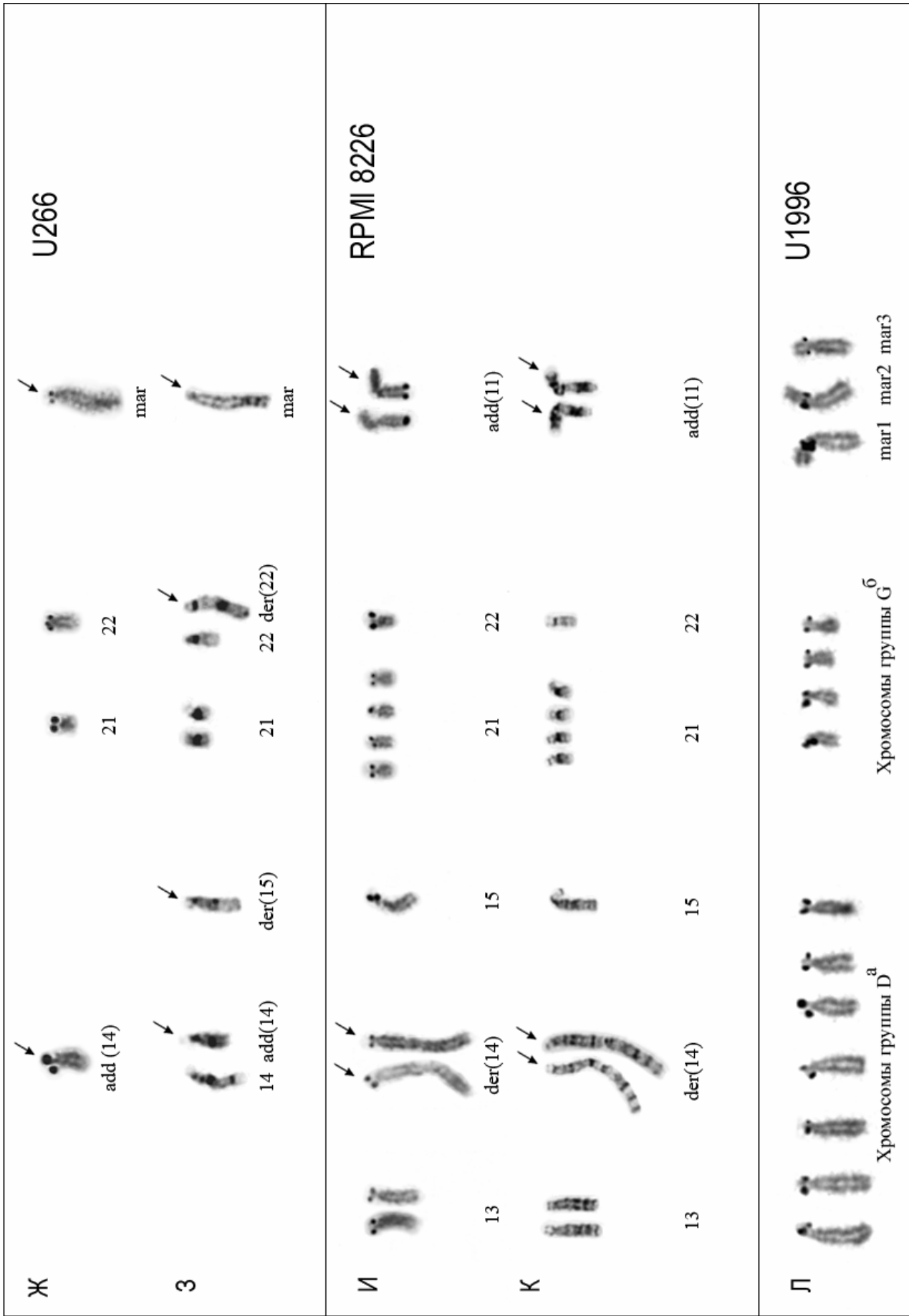


Рис. 2. Ядрышкообразующие хромосомы клеточных линий L363, Karpas 707, U-266, RPMI 8226 и U1996; А, В, Д, Ж, И, Л — окрашивание нитратом серебра (Ag-окрашивание); Б, Г, Е, З, К — представлены ЯО хромосомы, окрашенные на G-диски из работы (19). Стрелками указаны структурно перестроенные хромосомы. Обозначения аномальных хромосом приведены в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека (27).

^а — представлены нормальные и структурно перестроенные хромосомы группы D,

^б — представлены нормальные и структурно перестроенные хромосомы группы G.

Анализ функционального состояния ЯОР хромосом клеточных линий выполнен без идентификации ЯО хромосом. Установить принадлежность отдельных AgЯО хромосом к группе D или G в кариотипах клеток разных линий можно при сопоставлении с хромосомами, окрашенными на G-диски (рис. 2).

Препараты анализировали под световым микроскопом Jenaval (Carl Zeiss, Германия) при увеличении об. 100x1.25, ок. 12.5x. Изображения хромосом получали с помощью микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия), оснащенного цифровой видеокамерой DFC 360 и стандартным программным обеспечением. Объектив PlanNeofluar 100x/1,3. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «STATGRAPHICS» (Statgraphics Plus, Version 5.0). Достоверность различий сравниваемых средних значений оценивали, используя критерий Стьюдента при $P < 0.05$.

Результаты

Анализ метафазных пластинок, окрашенных нитратом серебра, выявил различия между клетками 5-ти исследованных линий по числу, составу, размеру и ассоциативной способности AgЯОР хромосом (рис. 2; табл.1, 2, 3).

В клетках L363 и Karpas 707 с околодиплоидным числом хромосом из 10 ЯО хромосом 8 и 7, соответственно, являлись Ag-положительными (рис. 2, А—Е). В гиподиплоидных клетках U-266 обнаружены только 4 AgЯО хромосомы (рис. 2, Ж). Однако в проведенных нами ранее исследованиях (флуоресцентная гибридизация ДНК хромосом *in situ* с рДНК зондом, FISH-гибридизация) гибридизационный сигнал был выявлен на всех 8-ми акроцентрических хромосомах кариотипа клеток U-266 (28). Таким образом, сравнительный анализ результатов Ag-окрашивания и FISH-гибридизации показал, что в клетках U-266 ЯОР хромосом 14, der(15), 21 и der(22) (рис. 2) содержат кластеры неактивных рибосомных генов.

В гипотриплоидном кариотипе клеток RPMI 8226 обнаружены 12 AgЯО хромосом (рис. 2, И). Десять из этих хромосом представлены 8-ю структурно неизменными ЯО хромосомами 13, 15, 21 и 22 пар и двумя копиями структурно перестроенной хромосомы der(14)t(1;14).

Кроме того, в составе хромосомы add(11), присутствующей в кариотипе в двух копиях, локализовано по одному AgЯОР неизвестного происхождения (рис. 2, К).

В гипертриплоидных клетках U1996 число хромосом варьировало от 70 до 74, модальный класс (78 %) клеток содержал 71 хромосому. При этом число (14) и состав AgЯО хромосом не изменялись (рис. 2, Л). Судя по морфологии и размерам большинство из AgЯО хромосом составляли структурно измененные хромосомы групп D и G. AgЯО хромосомы с перестройками коротких плеч акроцентрических хромосом были отнесены к маркерам (mar1, mar2, mar3).

Цитогенетический анализ клеточной линии L363 (19) выявил в популяции клетки с двумя основными структурными вариантами кариотипа — СВК I и СВК II, различающимися перестройками хромосом 5 и 14. Характер серебрения (а именно размер AgЯОР) аномальной хромосомы 14 в клетках с СВК I и СВК II подтверждает, что структурным перестройкам подвергается одна и та же хромосома 14 (рис. 2, А—Г). Поскольку различий в размерах AgЯОР индивидуальных хромосом между этими СВК не наблюдали, кариотипическая гетерогенность клеточной популяции L363 при анализе функционального состояния ЯОР хромосом во внимание не принималась.

Все исследованные клеточные линии характеризовались стабильным числом AgЯО хромосом, поэтому в каждой линии функциональный статус AgЯОР оценивали среди 100 метафазных пластинок с числом AgЯО хромосом соответственно 8 (L363), 7 (Karpas 707), 4 (U-266), 12 (RPMI 8226) и 14 (U1996).

Размеры AgЯОР индивидуальных хромосом варьировали от 0 до 3 усл. ед. Наибольший размер (3 усл. ед.) имели структурно перестроенная хромосома 14 в клетках L363 и U-266 и mar1 в клетках U1996. Наиболее низкую функциональную активность (около 1 усл. ед.) проявляли ЯОР хромосом клеток Karpas 707. В клеточных линиях RPMI 8226 и U1996 (за исключением mar1) размеры AgЯОР хромосом составляли 1 — 2 усл. ед. При подсчете суммарного размера AgЯОР хромосом (табл. 1) оказалось, что клеточные линии ММ существенно различаются как по его среднему значению ($P < 0.01$), так и отдельно по средним размерам AgЯОР хромосом групп D ($P < 0.01$) и G ($P < 0.01$), за исключением AgЯО хромосом группы G клеток RPMI 8226 и U1996, ($P > 0.05$). Наибольший средний суммарный размер AgЯОР хромосом (24.82 ± 0.09) обнаружен в клетках U1996, а наименьший (7.19 ± 0.03) — в клетках U-266 (табл. 1). В то же время, в расчете на одну AgЯО хромосому (табл. 2), различия

в среднем размере AgЯОР между клеточными линиями U-266 и U1996 были небольшими, но достоверными: 1.80 ± 0.01 (U-266) и 1.77 ± 0.01 (U1996), $P < 0.05$.

Функциональный полиморфизм ЯОР хромосом клеток миеломных линий проявлялся и в ассоциативной способности AgЯОР. Так, в клетках Karpas 707 не было выявлено ассоциаций (Ac) AgЯО хромосом. В клетках U-266 Ac AgЯО хромосом отмечены в 3 % проанализированных метафазных пластинок, причем в каждом случае в одной Ac участвовали хромосомы add(14) и 21, размер AgЯОР которых составлял 3 и 2 усл. ед., соответственно.

Таблица 1.

Активность ЯОР метафазных хромосом в клеточных линиях множественной миеломы

Клеточная линия ^a	Суммарный размер AgЯОР хромосом			
	группа D M±SE	группа G M±SE	маркеры mar M±SE	D+G+mar M±SE
L363 47(45–48) <2n>	10.94±0.05 n ^b =5	4.13±0.03 n=3	— ^b	15.07±0.06 n=8
Karpas 707 45(43–46) <2n>	4.51±0.02 n=4	3.42±0.02 n=3	—	7.93±0.02 n=7
U-266 44(43–45) <2n>	3.08±0.02 n=1	3.13±0.03 n=2	0.98±0.01 n=1	7.19±0.03 n=4
RPMI 8226 67(65–68) <3n>	6.22±0.04 n=5	6.11±0.03 n=5	3.90±0.04 n=2	16.23±0.07 n=12
U-1996 71(70–74) <3n>	12.14±0.06 n=7	6.12±0.15 n=4	6.56±0.05 n=3	24.82±0.09 n=14

В таблице приведены средние значения (M) и стандартные ошибки средних (SE).

^a— модальное число хромосом и пределы изменчивости по числу хромосом представлены в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека (27).

^b— число AgЯО хромосом в группе (D, G, маркеры).

^в— в кариотипе отсутствуют маркерные AgЯО хромосомы.

Таблица 2.

Сопоставление среднего размера AgЯОР (на одну AgЯО хромосому) и ассоциативного индекса в клеточных линиях множественной миеломы

Клеточная линия	Средний размер AgЯОР (на одну AgЯО хромосому), усл. ед	Ассоциативный индекс, %
L363	1.89±0.01	37.00±4.83
Karpas 707	1.133±0.003	0.00±0.90
U-266	1.80±0.01	3.00±1.71
RPMI 8226	1.35±0.01	31.00±4.63
U1996	1.77±0.01	41.00±4.92

Наиболее высокий ассоциативный индекс (АИ) обнаружен в клеточных линиях L363 (37 %), RPMI 8226 (31 %) и U1996 (41 %), поэтому анализ ассоциативной активности AgЯО хромосом проведен для клеток этих линий (табл. 3). Результаты анализа показали, что из 800 (L363), 1200 (RPMI 8226) и 1400 (U1996) AgЯО хромосом лишь 11.25 % (90 из 800), 6.33 % (76 из 1200) и 8.79 % (123 из 1400) соответственно, проявляли ассоциативную способность. Различия в среднем числе Ac AgЯО хромосом и среднем числе Ac на клетку, содержащую Ac, выявлены только между клеточными линиями RPMI 8226 и U1996 ($P < 0.05$). В одной Ac преимущественно участвовали две AgЯО хромосомы (табл. 3).

Таблица 3.
Ассоциативная активность AgЯО хромосом в клеточных линиях L363, RPMI8226 и U1996

Показатели ^a	Клеточные линии		
	L363	RPMI 8226	U1996
Ассоциативный индекс, %	37.00±4.83	31.00±4.63	41.00±4.92
Среднее число Ac AgЯО хромосом	0.44±0.06	0.35±0.06	0.59±0.08*
Среднее число Ac на клетку, содержащую Ac	1.19±0.07	1.13±0.06	1.44±0.11*
Среднее число AgЯО хромосом, участвующих в одной Ac	2.05±0.03	2.17±0.08	2.09±0.04

^a — значения получены при анализе 100 метафазных пластинок для каждой клеточной линии,

* — различия выявлены между клеточными линиями RPMI8226 и U1996, $P < 0.05$.

Несмотря на то, что клеточные линии L363, RPMI 8226 и U1996 мало отличались между собой по ассоциативной способности AgЯО хромосом, разное число и состав AgЯО хромосом в клетках этих линий позволяют проанализировать зависимость частоты вовлечения в Ac AgЯО хромосом от размера их AgЯОР.

Свидетельством того, что размер AgЯОР является не единственным фактором, обуславливающим его участие в Ac, является сопоставление среднего размера AgЯОР (на одну AgЯО хромосому) и АИ клеточных линий (табл. 2).

По меньшей мере два фактора могут обуславливать вовлечение AgЯО хромосом в Ac: размер AgЯОР и доля AgЯО хромосом с соответствующим размером AgЯОР от числа всех AgЯО хромосом в кариотипе клеток. Для того, чтобы исключить влияние доли AgЯО хромосом с определенным (1, 2, 3 усл. ед.) размером AgЯОР на частоту их участия в Ac, определяли

относительную частоту. Относительный показатель представлял собой отношение частоты вовлечения AgЯО хромосом в Ас к доле AgЯО хромосом с соответствующим размером AgЯОР от числа серебящихся хромосом в кариотипе.

В целом, сопоставление относительных частот вовлечения в Ас AgЯО хромосом с разным размером AgЯОР показало, что размер AgЯОР в значительной степени определяет участие AgЯО хромосом в Ас. При этом частота вовлечения в Ас AgЯО хромосом со структурными перестройками коротких плеч снижена по сравнению с AgЯО хромосомами с тем же размером AgЯОР, но без аномалий коротких плеч. Вместе с тем, особенности ассоциативного поведения AgЯО хромосом в каждой клеточной линии свидетельствуют, что ряд других факторов: число AgЯО хромосом в кариотипе, принадлежность их к группе D или G, структурные перестройки с участием AgЯОР и возможно комбинация AgЯО хромосом с разной транскрипционной активностью ЯОР могут влиять на их ассоциативную способность (табл. 4).

Таблица 4.

Вовлечение в ассоциации AgЯО хромосом с определенным размером AgЯОР в клеточных линиях L363, RPMI8226 и U1996

Размеры AgЯОР хромосом в Ас, усл. ед	Частота Ас ^а , %		
	L363	RPMI8226	U1996
1/1	0.00±2.00	31.71±7.27	7.81±3.35
1/2	6.52±3.64	63.41±7.52	42.19±6.17
1/3	2.17±2.15	— ^б	7.81±3.35
2/2	56.52±7.31	4.88±3.37	35.94±6.00
2/3	34.78±7.02	—	6.25±3.03

^а — значения определяли от общего числа контактов между AgЯОР двух AgЯО хромосом (независимо от числа AgЯО хромосом, вовлеченных в Ас) в 100 метафазных пластинках каждой линии. Общее число контактов составляло: 46 (L363), 41 (RPMI 8226), 64 (U1996).

^б — в кариотипе отсутствуют AgЯОР с размером 3 усл. ед.

Обсуждение

Сопоставление значений среднего суммарного размера AgЯОР хромосом в клеточных линиях ММ человека и ФГА-стимулированных лимфоцитах здоровых индивидов (13) показал, что, если средний суммарный размер AgЯОР хромосом клеток L363 и RPMI 8226 находится в пределах этого показателя для здоровых лиц, в клетках U1996 — превышает его верхнюю

границу, то в клетках Karpas 707 и U-266 — почти вдвое меньше нижней границы этого параметра в норме. При этом клетки RPMI 8226 и U1996 имеют околотриплоидный кариотип и, в расчете на диплоидный уровень, средний суммарный размер AgЯОР хромосом клеток U1996 ($24.82/1.5=16.55$ усл. ед.) попадает в пределы значений, характерных для нормы, а клеток RPMI 8226 ($16.23/1.5=10.82$ усл. ед.) выходит за нижнюю границу.

Таким образом, средний суммарный размер AgЯОР хромосом в клеточных линиях MM варьирует в больших пределах и может отличаться от значений этого показателя в норме. Несмотря на выявленные между клеточными линиями MM различия в суммарном размере AgЯОР хромосом, применение метода оценки геномной дозы активных рибосомных генов (29) позволяет рассматривать изученную группу линий MM как клеточные линии с низкой копийностью активных рибосомных генов.

Результаты настоящей работы, свидетельствующие о низкой функциональной активности ЯОР хромосом клеток линий MM, как по суммарному размеру AgЯОР, так и по их ассоциативной способности, хорошо согласуются с результатами исследований костного мозга больных хроническим миелолейкозом и различными вариантами острого лейкоза (30). В клетках костного мозга как здоровых доноров, так и больных лейкозами число AgЯО хромосом, интенсивность их серебрения и способность вступать в Ас варьируют и ниже по сравнению с ФГА-стимулированными лимфоцитами тех же индивидов. По мнению авторов цитируемой работы (30) гетерогенность клеток костного мозга по числу AgЯО хромосом и их ассоциативной способности обусловлена разной степенью дифференцировки вступающих в митоз кроветворных элементов (бласты, клетки эритроидного и миелоидного ряда на разных этапах созревания).

Очевидно, что различия в показателях функциональной активности ЯОР хромосом, обнаруженные между клетками линий MM в настоящей работе, также можно объяснить уровнем дифференцировки клеток: более дифференцированные плазматические клетки U266 имели наименьшее число и средний суммарный размер AgЯОР, в то время как менее дифференцированные плазмобласты U1996, соответственно, наибольшее. Также в соответствии со степенью зрелости клеток — от менее к более дифференцированным (при приведении к диплоидному уровню) распределялся средний суммарный размер AgЯОР хромосом клеток L363, RPMI 8226 и Karpas 707.

В настоящее время в литературе отсутствуют сведения о характере изменения активности рибосомных генов в ЯОР отдельных акроцентрических хромосом в процессе дифференцировки клеток разных тканей, как в норме, так и при опухолевой трансформации. По-видимому, сопряжение событий молекулярного патогенеза ММ и активации транскрипции рДНК приводит к формированию опухолеспецифичного функционального статуса ЯОР хромосом, который, как и другие особенности генома миеломных клеток, поддерживается в условиях их существования *in vitro*.

В заключение следует подчеркнуть, что культивируемые клетки человека, включая клеточные линии, полученные из разных типов опухолей, линии эмбриональных и мезенхимных стволовых клеток, являются незаменимой модельной системой для дальнейших исследований роли активности рибосомных генов в процессах дифференцировки, пролиферации, опухолевой трансформации и при длительном существовании клеток в условиях *in vitro*.

Авторы выражают глубокую благодарность к.б.н. Г.И. Штейну (Институт цитологии РАН) за ценные рекомендации при анализе полученных результатов и А.А. Яковлевой за помощь в подготовке рисунков статьи.

Список литературы

1. **Orsolich I., Jurada D., Pullen N., Oren M., Eliopoulos A. G., Volarevic S.** The relationship between the nucleolus and cancer: Current evidence and emerging paradigms. *Semin Cancer Biol.*, 2015, pii: S1044-579X(15)30004-3. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.12.004.
2. **Russell J., Zomerdijs J. C.** RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci.*, 2005, 30, 2: 87—96.
3. **Grummt I.** Wisely chosen paths—regulation of rRNA synthesis: delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden. *FEBS J.*, 2010, 277, 22: 4626—4639.
4. **Grummt I.** The nucleolus—guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma*, 2013, 122, 6: 487—497.
5. **Roussel P., André C., Comai L., Hernandez-Verdun D.** The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol.*, 1996, 133, 2: 235—246.
6. **Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D.** The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*, 2000, 31, 2: 121—126.
7. **de Capoa A., Alexandre C., Felli M. P., Ravenna L., Costantino M. A., Giancotti P., Vicenti O., Poggesi I., Grappelli C., Miller D. A.** Inheritance of ribosomal gene activity and level of DNA methylation of individual gene clusters in a three generation family. *Hum Genet.*, 1991, 88, 2: 146—152.
8. **Stults D. M., Killen M. W., Pierce H. H., Pierce A. J.** Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome Res.*, 2008, 18, 1: 13—18.

9. **de Capoa A., Felli M. P., Baldini A., Rocchi M., Archidiacono N., Aleixandre C., Miller O. J., Miller D. A.** Relationship between the number and function of human ribosomal genes. *Hum Genet.*, 1988, 79, 4: 301—304.
10. **Ляпунова Н.А., Еголина Н.А., Мхитарова Е.В., Викторов В.В.** Межиндивидуальные и межклеточные различия суммарной активности рибосомных генов, выявляемые Ag-окраской ядрышкообразующих районов акроцентрических хромосом человека. *Генетика*, 1988, 24, 7: 1282—1288.
11. **Ляпунова Н.А., Кравец-Мандрон И.А., Цветкова Т.Г.** Цитогенетика ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом человека: выделение четырех морфофункциональных вариантов ЯОР, их межиндивидуальное и межхромосомное распределение. *Генетика*, 1998, 34, 9: 1298—1306.
12. **Ляпунова Н.А., Еголина Н.А., Цветкова Т.Г., Вейко Н.Н., Кравец-Мандрон И.А., Громова Э.В., Мхитарова Е.В., Косякова Н.В., Викторов В.В.** Ядрышкообразующие районы (ЯОР) хромосом человека: опыт количественного цитологического и молекулярного анализа. *Биологические мембраны*, 2001, 18, 3: 189—199.
13. **Пороховник Л.Н., Викторов В.В., Еголина Н.А., Цветкова Т.Г., Ляпунова Н.А.** Полиморфизм размеров кластеров активных рибосомных генов у человека и моделирование условий его стабильности в ряду поколений. *Генетика*, 2011, 47, 12: 1666—1675.
14. **Мамаев N.N., Mamaeva S.E.** Nucleolar organizer region activity in human chromosomes and interphase nuclei of normal, leukemic, and tumor cells as evaluated by silver staining. *Int Rev Cytol.*, 1990, 121: 233—266.
15. **Мамаева С.Е.** Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. *Цитология*, 1996, 38, 8: 787-814.
16. **Мамаева С.Е.** Хромосомы постоянных клеточных линий человека. В кн: Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Научный мир. 2002, 36—137.
17. **Цветкова Т.Г., Раевская Г.Б., Малиновская Т.Н., Мандрон И.А.** Цитогенетический анализ ядрышкообразующих районов хромосом клетки перевиваемой лимфобластоподобной линии NAMALWA. *Цитология*, 2000, 42, 3: 316.
18. **Prideaux S.M., Conway O'Brien E., Chevassut T.J.** The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv Hematol.*, 2014:864058. doi: 10.1155/2014/864058.
19. **Турилова В.И., Смирнова Т.Д.** Кариотипическая изменчивость клеточных линий множественной миеломы человека. *Цитология*, 2012, 54, 8: 621—636.
20. **Karpas A., Fischer P., Swirsky D.** Human myeloma cell line carrying a Philadelphia chromosome. *Science*, 1982, 216: 997—999.
21. **Hellman L., Josephson S., Jernberg H., Nilsson K., Pettersson U.** Immunoglobulin synthesis in the human myeloma cell line U-266; expression of two immunoglobulin heavy chain isotypes (epsilon and alpha) after long-term cultivation in vitro. *Eur J Immunol.*, 1988, 18, 6: 905—910.
22. **Diehl V., Schaadt M., Kirchner H., Hellriegel K.P. Gudat F., Fonatsch C., Laskewitz E., Guggenheim R.** Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study. *Blut*, 1978, 36, 6: 331—338.
23. **Moore G. E., Kitamura H.** Cell line derived from patient with myeloma. *N Y State J Med.*, 1968, 68: 2054—2060.
24. **Jernberg H., Nilsson K., Zech L., Lutz D., Nowotny H., Scheirer W.** Establishment and phenotypic characterization of three new human myeloma cell lines (U-1957, U-1958, and U-1996). *Blood*, 1987, 69, 6: 1605—1612.

25. **Abramova E., Vyguinnyi S., Mamaeva S.** Increased frequency of acrocentric chromosome association during colcemid treatment. *Cancer Genet Cytogenet.*, 1993, 68, 1: 52—59.
26. **Howell W. M, Black D. A.** Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*, 1980, 36: 1014.
27. **ISCN (2009):** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, L.G. Shaffer, M.L. Slovak, L.J. Campbell (eds); S. Karger, Basel 2009.
28. **Турилова В.И., Пендина А.А, Смирнова Т.Д.** Метафазные хромосомы клеток линии множественной миеломы человека U-266: кариотип и морфофункциональная характеристика ядрышкообразующих районов. *Цитология*, 2003, 45, 6: 606—613.
29. **Ляпунова Н.А, Вейко Н.Н.** Рибосомные гены в геноме человека: идентификация четырех фракций, их организация в ядрышке и метафазных хромосомах. *Генетика*, 2010, 46, 9: 1205—1209.
30. **Грабовская И.Л., Мамаева С. Е., Мамаев Н.Н.** Изучение характера серебрения и ассоциативной способности акроцентрических хромосом нормальных и лейкозных клеток человека. *Цитология*, 1986, 28, 3: 350—359.

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
И ЖИВОТНЫХ**

***И.А. Суетина¹, М.В. Мезенцева¹, Е.А. Гущина¹, Ф.А. Лисицин¹, Л.И. Руссу¹,
О.А. Лопатина¹, Е.Л. Фирсова¹, Д.Ф. Тайсон², М.Е. Джонсон², В. Хинг²,
С.А. Остроумов³***

¹ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России / Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва, cells@rambler.ru; ²Университет Массачусетса, Амхерст, штат Массачусетс, США; ³МГУ им.М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва

С целью изучения влияния наночастиц на морфофункциональные характеристики клеток проведено тестирование водных суспензий наночастиц CuO и Fe_2O_3 на диплоидные клеточные культуры фибробластов эмбриона кур, клеток тестикулов ягнят, фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ-Т) и перевиваемые культуры клеток человека (A549) и животных (ВНК-21, Vero). Показано различное токсическое воздействие исследуемых препаратов на клетки. С помощью МТТ-теста выявлено снижение жизнеспособности клеток в процессе их инкубации с изучаемыми препаратами. Наибольшая цитотоксичность через 48 ч инкубации выявлена у наночастиц окисла меди, наименьшая – у наночастиц окисла железа. Наночастицы CuO в водной суспензии вызывали значительную гибель клеток в

концентрациях вплоть до 1 мкг/мл, тогда как образец Fe_2O_3 - в концентрациях 500-125 мкг/мл, что может свидетельствовать о зависимости степени воздействия тестируемых наночастиц на клетки от физико-химических свойств препаратов. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии обнаружены изменения морфологии культивируемых фибробластов эмбриона человека при их инкубации в течение 48 ч с наночастицами Fe_2O_3 в концентрации 100 мкг/л.

Изучено влияние тестируемых препаратов в субтоксических концентрациях на параметры иммунитета. Отмечено, что наночастицы CuO подавляли в клетках ФЭЧ-Т экспрессию гена ИФН- $\lambda 3$ и способствовали активации транскрипции ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-18, ФНО- α . Наночастицы Fe_2O_3 активировали экспрессию генов ИФН- γ , ИЛ-2, а также ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО- α . Т.о. показана потенциальная возможность использования препаратов на основе наночастиц окислов металлов для коррекции иммунопатологических состояний при ряде патологий.

Ключевые слова: наночастицы, окислы железа, меди, жизнеспособность клеток, электронная микроскопия, цитокины.

Внедрение нанотехнологии во многие сферы деятельности человека, в том числе в медицинскую и биологическую практику, ставит человечество перед новыми проблемами. Выяснение характера воздействия наноматериалов и наночастиц на здоровье и среду обитания человека является непростой задачей. Токсичность наночастиц для живых систем зависит от многих факторов (1, 2). Среди различных способов оценки безопасности наночастиц существенную роль играют методы, основанные на использовании культур клеток. Накоплен материал по изучению влияния наночастиц металлов на культивируемые клетки и их ДНК (3, 4, 5). Однако, вопрос о влиянии наночастиц металлов на культивируемые клетки изучен недостаточно, полученные данные неоднозначны. Есть сведения об отсутствии цитотоксичности наночастиц *in vitro*, а также об их взаимодействии с компонентами культуральной среды (6, 7, 8). Вопрос требует дальнейшего изучения. Представляет интерес накопление методического опыта тестирования наночастиц на различных видах клеток, что позволит установить порог допустимых доз вводимых наночастиц в условиях организма. Цель данной работы – получить информацию о влиянии водных суспензий наночастиц окислов металлов CuO и Fe_2O_3 на морфофункциональные характеристики культивируемых клеток человека и животных.

Материал и методы

Препараты наночастиц.

- CuO; (Los Alamos, NM, USA), < 50 нм;
- Fe₂O₃ (alpha); (Los Alamos, NM, USA), 20-50 нм, 50 м² г⁻¹ .

Наночастицы были автоклавированы при 1 атм., 120° С в течение 30 мин и из них были приготовлены водные суспензии на 3-х дистиллированной воде в исходной концентрации 1 мг/мл. Для экспериментов с клетками препараты наночастиц оксидов меди и железа использовали в концентрациях от 500 до 0.25 мкг/мл.

Культуры клеток и питательные среды.

Для экспериментов из Коллекции культур клеток Института вирусологии им. Д.И. Ивановского были выбраны диплоидные клеточные культуры фибробластов эмбриона кур (ФЭК), клетки тестикулов ягнят (ТЯ), фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ-Т), перевиваемые клеточные культуры карциномы легкого человека (A549) и перевиваемые клеточные культуры животных: клетки почки сирийского хомячка (ВНК-21) и клетки почки зеленой мартышки (Vero).

Для культивирования клеток использовали стандартные питательные среды производства Московского института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) фирмы «ПанЭко». Клетки рассеивали на 96-луночную панель фирмы «Costar» (США) в концентрации 200 тыс. кл./мл в каждую лунку в объеме 100 мкл культуральной среды с 10% ЭТС и инкубировали в CO₂-термостате при 37°С. Через 24 ч после посадки клеток перед внесением препаратов инкубационную среду меняли, добавляя в нее по 100 мкл среды с 1 % ЭТС в лунку.

Изучаемый препарат в исходной концентрации 1мг/мл раститровывали в разведениях от 1/2 до 1/4096, что соответствовало концентрациям от 500 до 0,25 мкг/мл, и инкубировали с клетками в течение 24 и 48 ч в CO₂-термостате при 37° С. Эксперименты выполняли с тремя повторами. Контролем служили интактные клетки, культивируемые параллельно с опытными.

Оценка жизнеспособности клеток с помощью МТТ-метода.

Для оценки цитотоксического действия наночастиц применяли МТТ– тестирование (9, 10). Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности окраски раствора синего формазана, измеряя его оптическую плотность при длине волны 545 нм на спектрофотометре Immunochem 2100 (США). Долю жизнеспособных клеток рассчитывали как отношение

оптической плотности раствора формазана в опытных и контрольных образцах в процентах (5). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, «Statistica 6,0». Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента при $P < 0,05$.

Трансмиссионная электронная микроскопия.

Изучение влияния препаратов наночастиц на морфологию культивируемых клеток ФЭЧ-Т после их инкубации с препаратами в течение 48 ч проводили с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Использовали общепринятую методику фиксирования материала в 2,5%-ном глутаральдегиде и 1%-ном водном растворе OsO_4 , 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.

Изучение уровня транскрипции цитокинов.

Для исследования возможных механизмов воздействия препаратов наночастиц окислов железа и меди на показатели иммунитета было проведено исследование синтеза цитокинов на уровне их транскрипции *in vitro* в клеточной культуре ФЭЧ-Т через 48 ч после введения препаратов. Клетки помещали в 24-х луночные панели в посевной дозе 100 тыс.кл/мл, инкубировали 24 ч до образования монослоя, и затем после смены среды в лунки вносились препараты наночастиц CuO в концентрации 0.25 мкг/мл и 0.1 мкг/мл и Fe_2O_3 в концентрации 32.25 мкг/мл и 1 мкг/мл. Экспрессия генов интерлейкинов (ИЛ)-1 β , 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- λ 1, ИФН- λ 2, ИФН- λ 3 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 с помощью электрофореза в 2,5%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы Promega (G 1758) (11-14).

Результаты и обсуждение

Проведенное нами ранее тестирование изучаемых наночастиц окислов металлов в виде суспензий на культуральной среде 199 на двух линиях клеток выявило, что оба препарата

вызывали цитотоксическое воздействие на пролиферацию клеток, приводили к уменьшению количества клеток, увеличению их объема и диаметра, причем наиболее токсичными были наночастицы оксида меди (15, 16).

В данной работе мы сравнили действие водных суспензий изучаемых наночастиц на различных клеточных культурах, как диплоидных, так и перевиваемых. В таблице 1 приведены экспериментальные данные цитотоксического действия препаратов наночастиц оксидов меди и железа на различные виды клеток. Приведенные данные позволяют сделать вывод, что в концентрации 1 мкг/мл наночастицы оксида меди более токсичны, чем наночастицы оксида железа в той же концентрации. Образец CuO в водной суспензии вызывал значительную гибель клеток в концентрациях вплоть до 1 мкг/мл, тогда как образец Fe₂O₃ – лишь до концентрации 125-500 мкг/мл. При этом наибольшее токсическое воздействие наночастицы оксида меди в концентрациях 1-8 мкг/мл оказывали на эмбриональные клетки и клетки тестикулов, что может свидетельствовать о потенциальной токсичности данных наночастиц для зародышей и половых клеток организма.

Эти результаты совпадают с аналогичными данными по тестированию нами препаратов данных наночастиц, приготовленных на культуральной среде 199 (14, 15), и согласуются с данными, полученными другими исследователями (3, 4, 5). Вместе с тем отметим, что в упомянутых работах тестирование проводили на других линиях клеток. В работе Брэйди-Столле с соавт. (3) изучали действие наночастиц на культивируемые сперматогонии мыши. В работе Бруннера с соавт. (4) исследовали действие наночастиц на культивируемые клетки мезотелиомы человека и фибробласты грызунов. В работе Вэй с соавт. (5) использовали клетки гепатомы человека (human hepatoma BEL-7402 cells).

Первым этапом работы с использованием метода электронной микроскопии негативного контрастирования были исследованы суспензии наночастиц Fe₂O₃ в концентрации 100 мкг/мл.

На рис. 1 А наночастицы Fe₂O₃ представлены несколькими видами частиц: в виде крупных треугольников, прямоугольников размером от 400-500 нм до 600 нм и в виде скоплений мелких частиц и зерен.

Таблица 1.

**Определение влияния препаратов наночастиц окислов металлов на
жизнеспособность клеток с помощью МТТ-метода**

Оптическая плотность при длине волны 545 нм												
Нано части цы мкг/мл	Диплоидные культуры						Перевиваемые культуры					
	ФЭК		Т.Я.		ФЭЧ-Т		Vero		ВНК-21		A549	
	CuO	Fe ₂ O ₃	CuO	Fe ₂ O ₃	CuO	Fe ₂ O ₃	CuO	Fe ₂ O ₃	CuO	Fe ₂ O ₃	CuO	Fe ₂ O ₃
500	0	0	0	0.227 ±0.09	0	0.127 ±0.02	0	0.162 ±0.02	0	0.618 ±0.1	0	0
250	0	0.155 ±0.04	0	0.231 ±0.02	0	0.186 ±0.02	0	0.221 ±0.03	0	1.019 ±0.2	0	0.23 ±0.01
125	0	0.187 ±0.01	0	0.278 ±0.01	0	0.215 ±0.03	0	0.266 ±0.06	0	1.087 ±0.2	0	0.242 ±0.09
62.5	0	0.211 ±0.05	0	0.302 ±0.06	0	0.242 ±0.01	0	0.331 ±0.06	0.243 ±0.09	1.15 ±0.09	0	0.314 ±0.04
31.25	0	0.213 ±0.06	0.108 ±0.02	0.313 ±0.03	0	0.210 ±0.05	0	0.366 ±0.05	0.481 ±0.02	1.19 ±0.07	0	0.329 ±0.04
15.625	0	0.252 ±0.06	0.144 ±0.04	0.320 ±0.03	0.1 ±0.0 1	0.273 ±0.05	0	0.332 ±0.06	0.783 ±0.01	1.263 ±0.15	0.184 ±0.01	0.348 ±0.03
7.8125	0	0.250 ±0.02	0.184 ±0.09	0.310 ±0.01	0.145 ±0.0 3	0.247 ±0.02	0.143 ±0.02	0.358 ±0.07	0.896 ±0.08	1.276 ±0.07	0.314 ±0.01	0.345 ±0.01
3.9063	0	0.258 ±0.03	0.213 ±0.06	0.314 ±0.01	0.169 ±0.0 1	0.235 ±0.03	0.174 ±0.02	0.350 ±0.03	0.992 ±0.2	1.226 ±0.07	0.344 ±0.02	0.351 ±0.04
1.9531	0.136 ±0.05	0.260 ±0.03	0.264 ±0.04	0.311 ±0.01	0.169 ±0.0 1	0.258 ±0.01	0.21 ±0.05	0.414 ±0.03	1.135 ±0.09	1.245 ±0.06	0.340 ±0.02	0.345 ±0.01
0.9766	0.194 ±0.06	0.264 ±0.02	0.269 ±0.03	0.295 ±0.03	0.17 ±0.0 1	0.245 ±0.03	0.276 ±0.02	0.350 ±0.06	1.177 ±0.2	1.262 ±0.03	0.342 ±0.02	0.340 ±0.07
0.4883	0.222 ±0.2	0.260 ±0.02	0.304 ±0.1	0.300 ±0.02	0.171 ±0.0 1	0.274 ±0.02	0.313 ±0.2	0.386 ±0.07	1.229 ±0.09	1.262 ±0.02	0.350 ±0.02	0.342 ±0.02
0.2441	0.242 ±0.2	0.260 ±0.02	0.300 ±0.02	0.303 ±0.05	0.228 ±0.0 6	0.3 ±0.05	0.320 ±0.02	0.351 ±0.05	1.243 ±0.2	1.3 ±0.07	0.346 ±0.02	0.343 ±0.01
Контр. клетки	0.248±0.07		0.258±0.09		0.249±0.05		0.375±0.06		1.089±0.13		0.333±0.06	

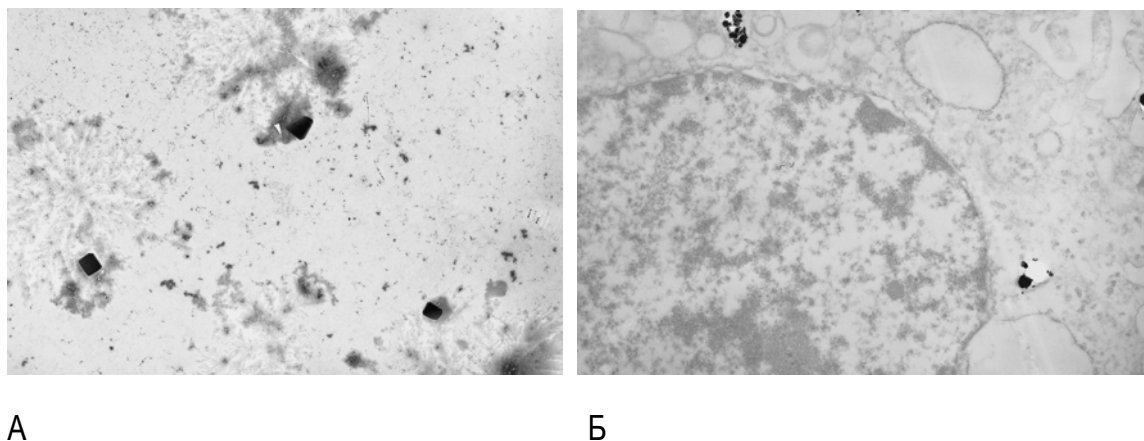


Рис. 1 – Электронные микрофотографии. Увеличение 50000х.

А – электронная микрофотография наночастиц Fe_2O_3 . Метод негативного контрастирования. Видны крупные частицы размером 400 нм, мелкие - 50-70 нм;

Б – ультратонкий срез клетки ФЭЧ-Т, сокультивированной с суспензией наночастиц Fe_2O_3 . Скопление наночастиц Fe_2O_3 в вакуолях клетки.

При исследовании клеток ФЭЧ-Т после культивирования с наночастицами Fe_2O_3 в концентрации 100 мкг/мл отдельные гранулы и скопление наночастиц размером 50-70 нм были обнаружены в различных частях цитоплазмы, в основном у поверхности плазматической мембраны клетки и во внутриклеточных вакуолях. Патологическое состояние плазматической мембраны характеризовалось процессом клазматоза. Ядра клеток были увеличены, но не содержали наночастиц. Наблюдалось расширение перинуклеарного пространства и многочисленные вакуоли в цитоплазме клеток (рис.1 Б). Аналогичные данные были получены Вэй с соавт. (5).

В исследованиях *in vitro* воздействия наночастиц металлов на особенности экспрессии генов цитокинов нами было показано, что в клетках ФЭЧ-Т под действием наночастиц CuO и Fe_2O_3 не происходило активации экспрессии генов ИФН- β , ИФН- $\lambda 1$, ИФН- $\lambda 2$, ИЛ-4, ИЛ-12, ИЛ-17 а также не изменялась активность присутствующей мРНК ИЛ-8 (табл. 2, рис. 2). Отмечено, что наночастицы CuO в концентрации 0,25 мкг/мл подавляли экспрессию гена ИФН- $\lambda 3$ (ИФН III-типа, сходный по антивирусным свойствам с ИФН- α) (17). При этом в данной концентрации этот препарат способствовал активации транскрипции ИЛ-18, продуцируемого в условиях организма моноцитами/макрофагами и участвующего в синтезе ИФН- α . При разведении препарата до 0,1 мкг/мл в клетках была отмечена активация экспрессии генов ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО- α , в условиях организма являющихся показателями функциональной активности Th1 и Th17 (18).

Таблица 2.

Изменение экспрессии генов цитокинов в клетках ФЭЧ-Т под действием наночастиц окислов металлов

Препараты	Наличие (+) или (-) отсутствие мРНК цитокинов						
	ИФН- γ	ИЛ-1 β	ИЛ-2	ИЛ-6	ИЛ-10	ИЛ-18	ФНО- α
CuO 0.25 мкг/мл	-	-	-	-	-	+	-
CuO 0.1 мкг/мл	-	-	+	+	-	-	+
Fe ₂ O ₃ 30 мкг/мл	-	-	-	+	-	-	-
Fe ₂ O ₃ 1 мкг/мл	+	+	+	+	+	-	+
К.кл.	-	-	-	-	-	-	-

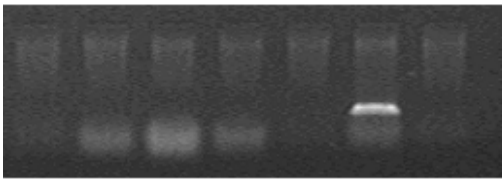
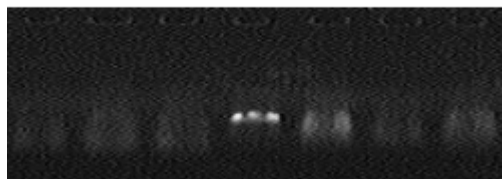
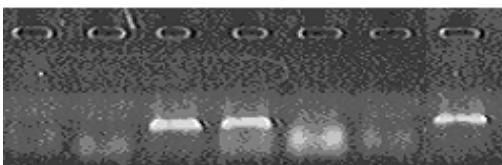
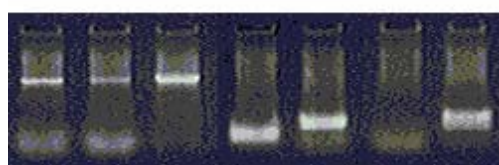
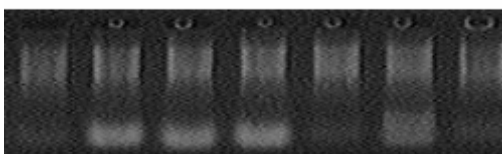
CuO 0.25 мкг/мл γ 1 β 2 6 10 18 TNF α **Fe₂O₃ 30 мкг/мл** γ 1 β 2 6 10 18 TNF α **CuO 0.1 мкг/мл** γ 1 β 2 6 10 18 TNF α **Fe₂O₃ 1 мкг/мл** γ 1 β 2 6 10 18 TNF α **Контроль** γ 1 β 2 6 10 18 TNF α 

Рис. 2. Экспрессия генов цитокинов в клетках ФЭЧ-Т под действием наночастиц окислов металлов. Фотография-гель документирования.

Показано, что наночастицы Fe_2O_3 в концентрации 1 мкг/мл активировали в клетках ИФН- α и ИЛ-2, обуславливающих у человека и животных клеточный иммунитет, а также ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО- α . Следует отметить, что ИЛ-10 является противовоспалительным цитокином, участвующим в выработке антител и продуцируемых Трег лимфоцитами. Эти клетки в организме экспрессируют FOXP3 - транскрипционный фактор, регулирующий транскрипцию генов, ответственных за дифференцировку Т-клеток и экспрессию цитокинов и других факторов, участвующих в супрессии иммунного ответа. Для регуляции иммунного ответа Трег клетки выделяют цитокины ИФН- α , ИЛ-10, TGF- β , ИЛ-35.

Известно, что Т-хелперы (Th0) могут дифференцироваться в направлении Th17 под воздействием ИЛ-1 β , ИЛ-6, TGF β , ИЛ-23. Эти цитокины активируют экспрессию транскрипционного фактора ROR- α , выполняющего ключевую роль в реализации программы дифференцировки Th17. Эти клетки характеризуются экспрессией генов ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-17, ИЛ-22 и принимают участие в защите от внеклеточных патогенов и в регуляции противоопухолевого иммунитета. Доказано, что Th17 ассоциированы с различными аутоиммунными процессами и с аллергическими реакциями (19, 20, 21, 22).

В наших экспериментах показано, что наночастицы Fe_2O_3 активировали транскрипцию генов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α , участвующих в синтезе ИЛ-17. При этом мРНК ИЛ-17 не экспрессировалась в клетках. Возможно, этот процесс происходил позднее срока наблюдения. Исходя из данных, полученных *in vitro*, можно предположить, что в субтоксических концентрациях наночастицы Fe_2O_3 в условиях организма будут способны активировать Th1, Th17 и Трег лимфоциты, тогда как наночастицы CuO в субтоксических концентрациях, вероятно, можно будет использовать для регуляции функции макрофагального звена иммунитета. Наши исследования являются первыми шагами, показывающими перспективность использования препаратов на основе наночастиц окислов железа и меди для коррекции различных иммунопатологических состояний.

Список литературы

1. De Stefano D., Carnuccio R., Maiuri M.C. Nanomaterials toxicity and cell death modalities. Journal of drug delivery, 2012:167896. doi:10.1155/2012/167896.
2. Ostroumov S.A., Kotelevtsev S.V., Glaser V.M., Gorshkova O.M., Johnson M.E., Ermakov V.V., Jovanovic L., Kamnev A.N., Krupina M.V., Lopatina O.A., Matorin D.N., Orlov S.N., Podchernyaeva R. Ya., Poklonov V.A., Sadchikov A.P., E.A. Solomonova E.A., Suetina I. A., Tyson J. F., Sadchikov A.P., Sheleykovsky V.L., Shestakova T.V., Smurov A.V., Xing B. New experimental data on chemical-biotic interactions with participation of nanoparticles and metals.

Биогеохимия и биохимия микроэлементов в условиях техногенеза биосферы. М.: ГЕОХИ. 2013: 450-453.

3. **Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J. J. and Hofmann M. C.** *In Vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 2005, 88, (2): 412-419.

4. **Brunner T. J., Wick P., Manser P., Spohn P., Grass R. N., Limbach L. K., Bruinink A., and Stark W. J.** *In Vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, (14): 4374–4381.

5. **Wei K., Xu X., Pu X., Hou Z., Zhang Q.** Cytotoxic effects and the mechanism of three types of magnetic nanoparticles on human hepatoma BEL-7402 cells. *Nanoscale Res. Lett.* 2011, doi:10.1186/1556-276X-6-480.

6. **Connor E. E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C. J., Wyatt M. D.** Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 2005, 1, (3): 325–327.

7. **Monopoli M.P., Aberg C., Salvati A., Dawson K.A.** Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* 2012, 7: 779–786.

8. **Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G.J., Puentes V.** Hardening of the nanoparticle-protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe₃O₄, CoO, and CeO₂) nanoparticles. *Small*, 2011, 7, (24): 3479–3486.

9. **Харбиев Р.У.** Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина. 2005, 832 с.

10. **Подчерняева Р.Я., Суетина И.А., Лопатина О.А., Остроумов С. А.** Оценка токсичности наночастиц окислов меди и железа на культуре клеток: анализ гистограмм, получаемых автоматическим счетчиком клеток SCEPTER. «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина» М.: РОСНАНО. 2011: 91-92.

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

12. **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.

13. **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.

14. **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.

15. **Подчерняева Р.Я., Суетина И.А., Лопатина О.А., Остроумов С.А.** Микроэлементы в форме наночастиц и патология клеток человека: воздействие препаратов наночастиц окислов меди и железа на пролиферацию клеток. *Фундаментальные и инновационные аспекты биогеохимии. Материалы VII Международной биогеохимической школы.* М.: ГЕОХИ. 2011: 260-263.

16. **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.* 2012:134-135.

17. **Vilcek J.** Novel interferons. *Nat. Immunol.*, 2003, 4, (1): 8–9.

18. **Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK.** Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* 2007, 19 (6): 652–657.

19. **Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT.** Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 2005, 6(11): 1123–1132.
20. **Reiner SL.** Development in motion: helper T cells at work. *Cell*, 2007, 129(1): 33–36.
21. **Stockinger B., Veldhoen M.** Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, 19 (3): 281-286.
22. **Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM.** Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 2006, 24 (6): 677–688.

Представленная ниже статья В.П. Пащенко является историческим экскурсом к исследованиям 80-х – начала 90-х годов 20-го века, посвященным использованию тканевых и клеточных культур человека с целью уточнения диагнозов и прогнозирования исходов некоторых заболеваний. Полагаем, что статья будет интересна для исследователей в области клеточной биологии и медицины, а также студентов и аспирантов биологических факультетов и медицинских вузов.

Члены ред. коллегии сб. «Клеточные культуры».

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТКАНЕВЫХ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

В.П. Пащенко

Северный государственный медицинский университет, Архангельск

paschenkow@mail.ru

В статье представлены результаты исследования морфофункциональных характеристик тканевых культур фрагментов слизистых бронхов, полученных при бронхоскопии больных хроническими заболеваниями бронхов и легких, а также культур тканей фрагментов почек урологических больных. Оценивалась площадь зоны роста тканей, число выросших клеток, митотическая активность, патологические митозы и число аномальных клеток. Полученные данные позволили уточнить диагнозы и прогнозы исхода хронических заболеваний бронхов и легких и оценить репаративный потенциал клеток тканей почек, что имело значение при выборе тактики лечения больных.

Использование клеточных культур позволило установить активирующее влияние сыворотки крови больных алкоголизмом в 1-й месяц абстиненции на рост культивируемых фибробластов эмбриона человека. Полученные результаты согласуются с концептуальными представлениями о патогенезе алкоголизма и алкогольной эмбриопатии.

Ключевые слова: тканевые и клеточные культуры, заболевания легких, бронхов, почек, диагностика, алкоголизм, алкогольные эмбриопатии.

А. Использование тканевых культур для диагностики и прогнозирования хронических заболеваний бронхов и легких.

Работы выполнялись в Межкафедральной лаборатории тканевых и клеточных культур Архангельского медицинского института и Архангельского филиала Института морфологии человека АМН СССР. Основное направление работ было связано с изучением особенностей течения легочной патологии на Европейском Севере и разработкой новых методов диагностики и профилактики заболеваний (1). Внедрение методов культивирования клеток и тканей во врачебную практику не представляется возможным без активного участия врачей и сотрудников клиник. В этом направлении исследований было плодотворным наше сотрудничество с доцентом кафедры торакальной хирургии АГМИ В.П. Быковым, сотрудником Областной клиники Архангельска В.А. Брагиным, а также заведующим кафедрой патологической анатомии АГМИ доцентом В.Я. Леонтьевым (2, 3, 4).

Проведенные ранее исследования показали, что рост культур тканей *in vitro* зависит от физиологического состояния донора ткани и от активности сыворотки крови донора, добавляемой в питательную среду. В настоящей работе были изучены особенности роста микрофрагментов тканей, полученных при бронхоскопии больных с заболеваниями бронхов и легких. Для культивирования использовали среду 199 с 10% сыворотки крови больных - доноров ткани. После измельчения фрагменты ткани с помощью микропипетки размещали на поверхности двух миллиметровых фильтров диаметром 12 мм (СЫНПОР /7/), которые помещали в пробирки на границе жидкой и газовой фаз среды. Культивирование осуществляли в течение десяти дней при температуре 38⁰ С. Для оценки интенсивности роста тканей и клеточной патологии в зоне роста использовали 1/5 часть наиболее интенсивно растущих колоний клеток. В них оценивали площадь зоны роста, число выросших клеток, митотическую активность, патологические формы митозов и число аномальных клеток.

Аномальными считали клетки, имеющие полиплоидные ядра, площадь которых превышала 700 мкм², многоядерные клетки (имеющие 3 и более ядер), клетки с множественной вакуолизацией цитоплазмы и клетки с выраженной фрагментацией ядер.

Зона роста тканей фрагментов слизистой бронхов состояла преимущественно из эпителиоподобных клеток. Средние размеры зон роста наиболее интенсивно растущих культур, характеристики митотической активности, морфологические особенности клеток мы сопоставляли с характером воспалительного процесса в бронхах и легких, оцениваемого по клиническим признаками и результатам патологогистологического исследования. При хроническом бронхите наблюдалось значительное усиление роста тканей слизистой бронхов по сравнению с небольшой группой больных, у которых изменения в бронхах были выражены слабо. По мере нарастания тяжести заболевания отмечалась некоторая тенденция к усилению роста ткани *in vitro*, увеличение числа аномальных клеток и снижение митотической активности. Наблюдалась определенная зависимость показателей роста тканей от степени воспаления. Наиболее интенсивный рост ткани наблюдался при второй степени воспаления у больных хроническим гипертрофическим бронхитом.

При сопоставлении интенсивности роста культур слизистой бронхов с патологией паренхимы легких было выявлено усиление роста культур у больных с острым абсцессом и гангреной. Наиболее низкие показатели роста культур отмечались при опухолевых заболеваниях паренхимы легких. Больше всего аномальных клеток в зоне роста культур было у больных с бронхоэктатической болезнью и больных с опухолями легких, а наиболее высокая митотическая активность - у больных с острой пневмонией. При этом была выявлена обратная корреляционная зависимость площади зоны роста культур от числа аномальных клеток и патологических митозов.

Большое значение для оценки степени поражения культивируемой ткани имела оценка структурных особенностей зоны роста. Исследования показали, что по мере развития хронического бронхита (от простого катарального к хроническому атрофическому) происходит нарастание деструктивных явлений в зоне роста. В ней появляются полости, своеобразная тягистость, участки уплотнения и разрежения, потоки фибробластов, очаги пораженных эпителиоподобных клеток и др. Причем, эти структурные особенности клеточной колонии также в значительной мере зависели от характера патологического процесса в бронхах.

На основании результатов морфологических исследований, а также статистического анализа показателей роста культур тканей слизистой бронхов при различных патологиях, нами были выделены следующие 3 группы заболеваний:

1. У больных катаральным бронхитом в тканях слизистой бронхов *in vitro* наблюдается усиление роста клеточной колонии, ее размеры достигают 3,3-5,5 мм². Число аномальных клеток не превышает 4,1 промилле. Зона роста состоит из мелких однородных клеток, имеющих высокую митотическую активность. Наблюдаются определенные структурные нарушения организации клеточной колонии, в частности, образуется валик уплотнения по периферии колонии.

2. При гипертрофической форме бронхита отмечается значительный размер клеточной колонии - до 5,5-8,0 мм², число аномальных клеток достигает 9 промилле и более. Наблюдаются значительные нарушения структурной организации клеточной колонии. При общем преобладании мелких, интенсивно делящихся эпителиоподобных клеток в зоне роста появляется значительное число измененных клеток, образуются тяжистые структуры, участки многослойного роста клеток, по периферии колонии образуется окантовка крупными аномальными клетками.

3. Для атрофического бронхита характерна выраженная декомпенсация репаративных возможностей тканей слизистой бронхов, которая сопровождается снижением роста культур. Площадь клеточной колонии составляет, как правило, менее 3,3 мм². На фоне значительного числа аномальных клеток наблюдаются нарушения упорядоченности структуры зоны роста. В ней появляются свободные полости, большое число полиплоидных и многоядерных клеток, а также фибробластов. Происходит снижение митотической активности клеток (5).

На основании полученных результатов мы пришли к общему заключению, что рост клеток ткани *in vitro* можно рассматривать как неспецифический показатель репродуктивной активности клеток и степени их повреждения при патологии. Таким образом, проведенные исследования показали, что использование тканевых культур для оценки характера патологического процесса, наряду с клиническими и патологогистологическими методами, позволяет уточнить диагностику заболеваний, дать оценку состояния клеток ткани и прогнозировать возможный исход заболеваний (6, 7).

Б. Некоторые особенности роста тканевых культур почек при урологических заболеваниях.

Комплексный подход к количественной оценке показателей роста культур тканей слизистой бронхов и морфологического анализа клеток был использован нами и для оценки репаративной активности культивируемых клеток ткани почек урологических больных. Биопсии у больных брали в момент проведения операций (доцент А.А. Ошурков). Забор фрагментов ткани для изучения осуществляли из условно непораженных отделов почек. Сравнение интенсивности роста микрофрагментов ткани почек и цитологических показателей в зависимости от возраста и пола больных не выявило каких-либо существенных различий. Статистически достоверное увеличение показателей роста культур ткани почек было обнаружено в возрастной группе больных - 35-44 года, по сравнению с группами больных 45-54 лет и 55-65 лет.

При сопоставлении особенностей роста культур ткани почек с клиническим диагнозом больного было установлено достоверное ускорение роста культур ткани от больных с воспалительными процессами в почках при пиелонефрите по сравнению с группой больных с опухолевыми заболеваниями. У больных с диагнозом гидронефроз по сравнению с больными мочекаменной болезнью отмечалось лишь увеличение разброса показателей роста культур. Однако анализ полученного материала затруднялся тем, что у больных с заболеваниями почек, как правило, имело место одновременное сочетание ряда патологических процессов: опухоли с пиелонефритом, мочекаменной болезни с пиелонефритом и гидронефрозом. Интенсивность роста культур возрастала в группе больных, имеющих осложнение – гидронефроз. Наиболее интенсивный рост культур отмечался в группе больных с диагнозом пиелит.

Более четкие результаты были получены при сопоставлении показателей роста культивированных тканей с патологистологическим диагнозом больных. Было установлено, что относительно слабый рост культур тканей наблюдался при опухолевых заболеваниях, в то время как при хроническом воспалении с признаками атрофии и, особенно, с признаками склероза имело место статистически достоверное увеличение показателей роста культур на 38,0% и 51,1% соответственно.

Культура ткани почки плода человека, состоящая в основном из эпителиоподобных клеток, по сравнению с тканью почки взрослого человека, отличалась интенсивным ростом и

однородной структурой зоны роста, в ней редко встречались клетки с полиплоидными ядрами и уплотнениями в виде многослойного роста. В культурах ткани почек урологических больных появлялись большие клетки с полиплоидными ядрами, размеры которых могли в 5-7 раз превышать размеры ядер обычных клеток. В зоне роста культур часто встречались клетки с вакуолизированной цитоплазмой, могли образовываться свободные полости и длинные цитоплазматические "мостики" между отдельными клетками. На основании статистического анализа полученных данных мы, по аналогии с предыдущими исследованиями (пункт А), выделили значения параметров роста культур и цитологических показателей клеток зоны роста, характерных для различных заболеваний почек. При этом учитывались размеры зоны роста культур и доля аномальных клеток. Интенсивность роста культур и степень клеточной патологии, выявляемая в зоне роста, зависела как от выраженности воспалительной реакции, так и степени клеточной декомпенсации. С возрастом и при патологии происходило нарушение упорядоченности и однородности структуры клеточной колонии, изменение митотической активности, увеличение количества патологических клеток. Полученные результаты позволяют более точно оценить репаративный потенциал клеток ткани почек при патологии, что может учитываться врачом при диагностике и лечении больных (8, 9).

В. Оценка влияния сыворотки крови больных алкоголизмом на рост первичных культур фибробластов эмбриона человека.

Сыворотка крови человека содержит целый ряд веществ, как активирующих, так и угнетающих рост клеток. Кроме кейлонов и антикейлонов, влияние на рост тканей могут оказывать некоторые гормоны, биологически активные вещества, продукты метаболизма (9, 10). Однако в настоящее время не представляется возможным четко идентифицировать биохимическими методами суммарную активность всех этих веществ (11, 12).

В связи с этим, мы предприняли попытку оценить возможности использования метода клеточных культур для оценки биологических свойств сыворотки крови больных алкоголизмом. В работе принимали участие сотрудники кафедры наркологии АГМИ П.И. Сидоров, Н.С. Ишеков и Н.Л. Чуркин. Кровь была взята у 56 больных алкоголизмом (II стадия). Средний возраст больных - $39,4 \pm 1,2$ года. Все больные находились на лечении в наркологическом стационаре. В качестве контроля использовали сыворотку 33 здоровых, не злоупотребляющих алкоголем лиц (средний возраст - $20 \pm 0,4$ года). Испытуемую сыворотку вносили в питательную среду диплоидных культур фибробластов эмбриона человека.

Фибробласты выделяли общепринятым методом (13). Для этой цели использовали поверхностные ткани 7—8-недельных эмбрионов человека. Ткань обрабатывали трипсином. Культивирование проводили в 250 мл флаконах, используя 50 мл среды № 199 с добавлением 10% бычьей сыворотки и антибиотиков. Для изучения брались клетки на 3-м пассаже. После обработки монослоя клеток раствором версена и пипетирования в среде № 199 без сыворотки взвесь клеток разводили этой же средой, доводя их содержание до 100 000 клеток в 1 мл среды. В пенициллиновые флаконы разливали по 1,7 мл этой взвеси, после чего туда же вносили 0,3 мл испытуемой сыворотки больных алкоголизмом, что соответствовало ее 15% содержанию в среде. Для оценки свойств сыворотки больного использовалась одна проба. Флаконы с сывороткой больных алкоголизмом и контрольных лиц были зашифрованы, а очередность их обработки определялась таблицей случайных чисел, что обеспечивало не преднамеренный отбор проб. Культивирование клеток осуществляли на дне пенициллиновых флаконов в течение 4-х дней при температуре 37°C.

Определение количества клеток, как до культивирования, так и после него, проводили с помощью автоматического счетчика микрочастиц типа Пикоскель/PSфирмы «Медикор» (ВНР). За период культивирования с сывороткой больных общее число клеток во флаконах увеличилось. Среднее число клеток в экспериментальных пробах с сывороткой крови больных алкоголизмом составило $494,1 \pm 14,0$ тыс., в контрольных пробах— $433 \pm 14,3$ тыс. ($P < 0,01$).

Была изучена корреляционная зависимость между некоторыми показателями крови больных (числом эритроцитов, лейкоцитов, СОЭ, содержанием билирубина) и влиянием сыворотки крови на репродуктивную активность фибробластов человека (РАФ). Обнаружена положительная корреляция между РАФ и количеством эритроцитов ($r=0,2$; $P < 0,01$), обратная корреляционная зависимость между РАФ и показателями СОЭ ($r = -0,38$; $P < 0,01$), а также между РАФ и днем абстиненции ($r=-0,42$; $P < 0,005$). Достоверной корреляционной зависимости между РАФ и количеством лейкоцитов ($r = -0,15$; $P > 0,05$), и между РАФ и содержанием в крови билирубина ($r = -0,16$; $P > 0,05$) выявлено не было.

Результаты наблюдений показали, что у больных алкоголизмом по мере лечения наблюдалось снижение биологической активности сыворотки. При сопоставлении полученных данных с контрольной группой было обнаружено, что статистически достоверное повышение активности сохраняется до 29 дня абстиненции ($P < 0,01$).

При дальнейшем исследовании патогенеза алкоголизма с помощью метода клеточных культур (77 больных) была обнаружена достаточно высокая обратная корреляционная зависимость между свойствами сыворотки больных и продолжительностью регулярного пьянства ($r = -0,5$). При этом терапия больных алкоголизмом тетурамом не влияла на биологические свойства сыворотки этих больных, в то время как использование нейролептиков приводило к достоверному снижению биологической активности сыворотки крови этих больных.

Полученные результаты позволили предположить, что высокая биологическая активность сыворотки крови больных алкоголизмом в первые дни абстиненции могла быть обусловлена множеством деструктивных катаболических процессов, происходящих в организме этих больных, вследствие чего сыворотка крови насыщалась продуктами диссимиляции. Не исключается и усиленная выработка веществ, активирующих рост клеток и тканей. Эти данные согласуются с концептуальными представлениями о патогенезе алкоголизма, в которых было показано, что при развернутой стадии алкоголизма у больных развивается выраженная компенсаторная гипертрофия в гепатолиенальной и гепаторенальной системах (14, 15, 16, 17).

Обнаруженная нами повышенная биологическая активность сыворотки крови больных алкоголизмом, видимо, обуславливается гуморальным компонентом общего защитно-компенсаторного синдрома при этом заболевании. Высокую чувствительность фибробластов эмбрионов человека к изменению биологической активности сыворотки крови больных алкоголизмом в период абстиненции, возможно, следует учитывать в патогенезе алкогольной эмбриопатии.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что методика клеточных культур в комплексе с другими маркерами заболевания имеет определенную диагностическую ценность. Наш опыт показывает возможности использования методов тканевых и клеточных культур в клинической практике в качестве интегративного диагностического теста, позволяющего оценить репродуктивные свойства клеток ткани и биологическую активность сыворотки крови при некоторых заболеваниях.

Список литературы

1. **Марачев А.Г., Носов А.Г., Решетников С.С., Пашенко В.П. и др.** Клиника-морфологические изменения органов дыхания при заболеваниях легких в условиях Архангельской области. Депон. ВНИТИ, центр. 17. Инв. N 0233.0055275 . Москва. 1983, 98 с.

2. Пащенко В.П., Брагин В.А. Особенности роста легочной ткани человека в бесплазменной тканевой культуре. Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1979: 25-27.

3. Пащенко В.П. Некоторые количественные особенности роста фрагментов ткани легких и почек в первичной культуре. Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии, М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1980: 92-93.

4. Пащенко В.П., Быков В.П., Леонтьев В.Я. Использование первичных культур для диагностики хронических неспецифических воспалительных заболеваний бронхов. Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1986: 58-59.

5. Пащенко В.П., Быков В.П., Леонтьев В.Я. Способ прогнозирования течения хронических неспецифических воспалительных заболеваний бронхов. Авторское свидетельство SU.1409944 А1, 15.07. 1988. Бюлл. № 26. 16 с.

6. Пащенко В.П. Влияние физиологических, экстремальных и патологических состояний организма на рост тканей при культивировании. Автореф. дисс. докт. мед. наук. Архангельская гос. мед. академия. Архангельск, 1994, 47 с.

7. Пащенко В.П. Некоторые ультраструктурные особенности клеток в первичных культурах легких и бронхов. Сб.: Актуальные проблемы адаптации и здоровья населения Севера. Архангельск, АГМА. 1992: 17-19.

8. Пащенко В.П., Ошурков А.А., Данилко Э.И. Некоторые особенности роста микрофрагментов ткани почек в культуре при патологии. Сб.: Актуальные проблемы адаптации и здоровья населения Севера. Архангельск, АГМА. 1992: 151-153.

9. Пащенко В.П. Опыт культивирования тканей при физиологических и патологических состояниях организма. Депонирована ВИНТИ, № 1904- ВЭЗ, 07. 07.1993, Москва, 1993, 76 с.

10. Пащенко В.П. Количественная оценка свойств сыворотки крови и некоторых биологически активных веществ с помощью тканевых культур. Сб: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1978: 26-27.

11. Пащенко В.П. Биологическая активность сыворотки крови у доноров и беременных женщин Европейского Севера. Сб.: Эколого-гигиенические и клинические вопросы жизнедеятельности человека в условиях Севера. Материалы Всесоюзной конференции. Новосибирск. 1980: 24-25 .

12. Пащенко В.П. Влияние сыворотки крови жителей Заполярья на репродуктивную активность фибробластов эмбрионов человека в культуре Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1982: 54 .

13. Пащенко В.П., Сидоров П.И., Ишеков Н.С. Влияние сыворотки больных алкоголизмом на репродуктивную активность эмбриональных клеток человека. Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК. АМН СССР. 1981: 97-80.

14. Пащенко В.П., Муратова И.Д., Сидоров П.И., Ишеков Н.С. и др. Ранние формы алкоголизма. Возможности методики клеточных культур в диагностике алкоголизма. Депон. ВИНТИ центр. 17. Инв. N 0283. 0049652 . Москва. 1982 , 34 с.

15. Пащенко В.П., Сидоров П. И., Чуркин Н.Л., Борисов И.Н. Влияние сыворотки больных алкоголизмом на рост первичных культур плодов человека Сб.: Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., тип. ВБПК АМН СССР. 1983: 65-66.

16. Пащенко В.П., Сидоров П.И., Ишеков Н.С. Влияние сыворотки крови больных алкоголизмом на репродуктивную активность фибробластов эмбрионов человека. Невропатология и психиатрия. 1984, 84(2): 240-243.

17. Пащенко В.П., Сидоров П.И., Борисов И.Н., Чуркин Н.Л. Влияние сыворотки крови больных алкоголизмом на рост первичных культур почечных клеток плодов человека. Невропатология и психиатрия, 1987, 87(2): 237-239 .

ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ В ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В.М. Семенова, Д.М. Егорова, Л.П. Стайно

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

seveme22@rambler.ru

В настоящем обзоре освещены современные представления о биологических свойствах стволовых опухолевых клеток в злокачественных глиомах головного мозга, их роли в гистогенезе этих опухолей и взаимоотношениях с нейральными стволовыми клетками нейрогенераторных зон головного мозга. Показаны возможности использования метода культивирования в изучении нейросферообразования – фундаментального свойства стволовых опухолевых клеток. Приведены методические подходы к получению нейросфер в условиях культивирования, а также способы идентификации стволовых опухолевых клеток в составе нейросфер. Представлены результаты количественной оценки активности нейросферообразования в культуре клеток злокачественных глиом, отражающие степень анаплазии исходных опухолей, позволяющие прогнозировать исходы заболеваний у нейроонкологических больных. Описаны перспективы практического использования культивируемых нейросфер с целью поиска антибластических препаратов с избирательным воздействием на стволовые опухолевые клетки глиом.

Ключевые слова: стволовые опухолевые клетки, нейральные стволовые клетки, нейросферы, глиомы головного мозга, метод культивирования тканей.

К настоящему времени накоплено большое количество данных, предполагающих, что злокачественные глиальные опухоли головного мозга формируются из популяции недифференцированных нейроклеток-прогениторов (1). В литературе эта популяция

самообновляющихся клеток с опухоленными свойствами определяется как стволовые опухолевые клетки (СОК), обладающие большим сходством с нейральными стволовыми клетками (НСК) нейрогенераторных зон нормального мозга (2, 3). Подобно НСК, СОК глиом способны к самовоспроизведению и экспрессии маркеров первичных нейронов и глиоцитов – астроцитов и олигодендроцитов (4, 5, 6). Однако, в отличие от нормальных НСК, СОК функционируют нерегулируемым образом и являются важным звеном в инициации, поддержании и прогрессировании первичного и продолженного роста глиом головного мозга. Установлено также, что содержание СОК в ткани глиом нарастает пропорционально повышению степени их злокачественности и сопровождается повышением уровней экспрессии иммуноцитохимических маркеров их стволовых свойств (4, 7, 8, 9). Общеизвестно, что наличие СОК в различных типах опухолей, включая глиомы головного мозга, связано с неблагоприятным прогнозом заболевания (10, 11, 12, 13, 14).

При использовании методических подходов, принятых в исследованиях НСК нормального мозга для изучения СОК глиом, была установлена тесная взаимосвязь между нормальным нейрогенезом и опухоленезом. При этом идентификация СОК в ткани головного мозга обеспечивает получение важной информации, необходимой для дальнейшего исследования разносторонних аспектов опухоленности в ЦНС, а также для разработки оптимизированных методов лечения глиом, направленных на уничтожение СОК. Показано, что наличие популяции СОК в ткани злокачественных глиом обуславливает их клеточную гетерогенность, так как изменчивость морфофункциональных характеристик СОК со временем способствует накоплению в них генетических мутаций, что приводит к развитию резистентности глиом к химиолучевой терапии (2, 15, 16, 17, 18).

Идентификация СОК в клетках злокачественных глиом производится, в первую очередь, с помощью иммуноцитохимического выявления экспрессии нестина – маркера НСК (19, 20). В то же время, по наблюдениям Singh S.K. с соавт. (21), наличие экспрессии CD133+ в СОК злокачественных глиом является достаточным и необходимым условием для инициации опухолевого роста после трансплантации СОК в мозг иммунодефицитных мышей.

Показано также, что экспрессия генов эмбриональных стволовых клеток в СОК глиобластом (ГБМ) – наиболее злокачественных глиом головного мозга – определяет их агрессивную опухоленность (22). По данным K. Mishima с соавт. (23), D. R. Larks с соавт. (24), R.H. Dahlrot с соавт. (25) экспрессия стволовых маркеров – подопланина (PDPN), CD133+ и

нестина в СОК злокачественных глиом может служить прогностическими факторами клинических исходов. В то же время рядом авторов признаки экспрессии стволовых маркеров в СОК не признаются прогностически значимыми (26, 27, 28). Таким образом, уточненная идентификация и клеточный генез СОК в глиомах головного мозга до сих пор остаются полностью невыясненными. Углубленное изучение биологии СОК в этих новообразованиях с помощью иммуноцитохимических и молекулярно-генетических методов исследования представляет важное направление на современном этапе.

Важная роль в этих исследованиях принадлежит методу культивирования клеток, который позволяет выделять из ткани опухолей популяцию СОК, формирующих нейросферы, и отслеживать прижизненную динамику их роста. Как отмечают D.R. Larks с соавт. (24), возобновляемое формирование нейросфер (туморосфер) в культуре является фундаментальным свойством СОК, определяющим инициацию и рост опухолей в ткани головного мозга.

Интересно отметить, что способность СОК в глиальных опухолях к нейросферообразованию была впервые открыта благодаря применению методики выделения НСК в условиях культивирования нервной ткани в бессывороточной среде с добавлением митогенов, основного фактора роста фибробластов и эпидермального фактора роста (29). Использование этой методики при культивировании опухолей мозга показало, что клетки ГБМ также могут формировать нейросферы (30). В последующем была установлена способность клеток нейросфер дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты, что позволило отнести их к СОК (31). Однако в отличие от клеток нейросфер, полученных из нормальной нервной ткани, клетки опухолевых нейросфер (туморосфер) имеют генетические нарушения, подвержены нерегулируемой пролиферации, а также индуцируют развитие инвазивной злокачественной глиомы при введении в мозг иммунодефицитных мышей. При этом активность роста опухоли коррелирует с активностью нейросферообразования в культуре (32).

По современным представлениям принадлежность культивируемых клеток к СОК доказывается на основании следующих критериев: а) генерация кластеров клональных производных, формирующих нейросферы в культуре; б) самообновление и пролиферация опухолевых клеток; в) дифференцировка с воспроизведением фенотипа клеток исходной

опухоли; г) экспрессия иммуноцитохимических маркеров СОК в нейросфероподобных клеточных кластерах.

Учитывая высокую информативность феномена нейросферообразования НСК и СОК в условиях культивирования, в исследованиях последних лет большое внимание уделяется разработке и усовершенствованию способов получения нейросфер из опухолевой ткани глиом с иммуногистохимической идентификацией их клеточного состава.

Так, существенное влияние на эффективность и динамику нейросферообразования культивируемых СОК оказывает первоначальная плотность посева опухолевых клеток. Установлено, что при низкой клеточной плотности посева из образующихся микроагрегатов НСК в бессывороточной среде с наличием ростовых факторов формируются неадгезивные колониальные клеточные скопления – нейросферы (29). Показано, что клетки, изолированные из глиом детей и глиобластом взрослых пациентов, при низкой плотности посева в бессывороточных средах также способны формировать нейросферы с высокой способностью к пролиферации и самообновлению. Эти клетки могут проявлять потенции к мультилинейной дифференцировке в нейрональные и глиальные линии с образованием некоторого количества аномальных клеток со смешанным фенотипом (16).

В отличие от этого при высокой плотности посева нейросферы могут агрегировать и слипаться между собой (33). Поэтому количественную оценку нейросферобразования в культуре следует считать достоверной лишь при первоначально низкой плотности посева опухолевых клеток. ($<1 \times 10^5$ кл/мл) (34). Несмотря на эти ограничения, метод культивирования нейросфер считается высокоинформативным способом изучения биологии СОК злокачественных глиом.

Нейросферы представляют гетерогенные агрегаты, происходящие от ранней прогениторной клетки или одной СОК. При диссоциации нейросфер клетки таких культур пригодны к серийному плейтингу, при котором часть клеток формирует вторичные или третичные нейросферы на протяжении многих пассажей. На моделях интрацеребральной трансплантации ксенографтов таких нейросфер доказано формирование инвазивных глиальных опухолей в мозге мышей (21).

В опытах Qiang L. с соавт. (35) установлено, что обработка сывороткой нейросфер, полученных в культуре ГБМ, ведет к астроглиальной дифференцировке части клеток. С

другой стороны, в ряде адгезивных линий ГБМ, культивированных на средах с содержанием сыворотки, также могут образовываться нейросферы.

Gilbert С.А. с соавт. (36) традиционно выращивали в адгезивной культуре клетки ГБМ в присутствии сыворотки, при этом большинство формирующихся нейросфер проявляли опухолевые свойства. Однако часть этих культур, в отличие от исходных опухолей пациентов с ГБМ, не обладали инвазивными свойствами опухолевого роста при трансплантации в мозг иммунодефицитных мышей. При этом культивированные клетки нейросфер экспрессировали высокие уровни иммуноцитохимических маркеров дифференцировки, поэтому такие культуры, по мнению авторов, оказались непригодными для изучения биологии СОК.

Показано, что клетки нейросфер, полученных при культивировании глиальных опухолей мозга в сывороточных средах, экспрессируют такие гены НСК, как *Musashi-1* (*Msi-1*), *Sox2*, и *Vmi-1* (37). Однако в бессывороточных питательных средах клетки нейросфер воспроизводят профиль генной экспрессии исходной опухоли более точно, чем в культурах с содержанием сыворотки (8). Таким образом, ключевым фактором при культивировании нейросфер является использование бессывороточных сред определенного состава, что обеспечивает пролиферацию СОК в составе нейросфер, поскольку лишь в этих условиях СОК воспроизводят популяцию клеток с генами, характерными для НСК, и имеют меньше генетических альтераций (36).

Важно отметить, что при культивировании ряда экспериментальных глиальных клеточных линий индивидуальная вариабельность выхода СОК в разных линиях колеблется в пределах 1-30%, что обусловлено их различной способностью формировать нейросферы. В этих экспериментах установлено также, что большинство клеток в составе нейросфер относятся к более дифференцированным транзиторно-амплифицированным клеткам (38).

По наблюдениям Lee J.C. с соавт. (8) активность нейросферообразования и морфология нейросфер в бессывороточных питательных средах меняются со временем на протяжении 4 месяцев культивирования. Gilbert С.А. с соавт. (36) наблюдали видоизменение структуры нейросфер на протяжении более 20 пассажей от плотных кластеров с почти индивидуально неразличимыми клетками до более рыхлых клеточных скоплений.

По общему мнению, на воспроизводимость нейросферообразования СОК глиом в условиях культивирования оказывает влияние также время проведения диссоциации нейросфер. Так,

при более ранней их диссоциации доля нейросферо-иницирующих клеток увеличивается, а при более поздней диссоциации нейросфер повышается вероятность клеточной гибели.

Среди методических приемов, оказывающих влияние на эффективность нейросферообразования СОК, большое значение придается также способам диссоциации нейросфер. Наиболее часто для получения суспензии отдельных клеток используется механическая диссоциация нейросфер при помощи пипетирования. Наряду с этим применяется также диссоциация нейросфер с помощью ряда ферментов. Однако использование, к примеру, протеаз, может вызывать повреждение поверхностных клеточных мембран и маркеров, в частности, CD133+, что приводит к недооценке количества СОК в клеточной суспензии и неэффективной их сортировке. Тем не менее, многие лаборатории успешно получают культуры нейросфер из ГБМ, используя ферментативную диссоциацию ткани опухоли при культивировании клеток в бессывороточной среде с добавлением ростовых факторов (8, 39, 24, 40, 41).

Метод pH-диссоциации нейросфер является менее жестким по отношению к клеткам, чем традиционная механическая диссоциация, и не влияет на свойства СОК в культуре. Так, Gilbert С.А. с соавт. (36) применили короткую диссоциацию нейросфер в сильно щелочной среде при мягком пипетировании и благодаря этому обеспечили эффективное поддержание опухолевых нейросфер в культурах на протяжении многих пассажей.

Изучение структуры нейросфер представляет определенные трудности. Так, наличие дифференцированных клеточных потомков и возникновение очажков некроза в нейросферах, образующихся в результате плотной клеточной упаковки, угнетает диффузию ростовых факторов к большинству клеток (42).

Facchino S. с соавт. (43) показали, что очищенные CD133+ клетки ГБМ головного мозга образуют нейросферы в культуре, а в присутствии индукторов дифференцировки могут дифференцироваться в глиальные клетки и нейроны. По мнению авторов, CD133+-клетки, выделенные из ГБМ, могут индуцировать очень агрессивные глиальные опухоли при трансплантации в мозг мышей в экспериментах *in vivo*. Такие опухоли резистентны к химио- и радиотерапии, и именно они ответственны за развитие опухоли и ее продолженный рост после традиционного хирургического лечения пациентов с ГБМ.

Yi L. с соавт. (44) обнаружили, что нейросферы, полученные в культурах клеток из первичной ГБМ человека, а также из мышинной клеточной линии ГБМ (GL261-NS), при

введении в мозг сингенных мышей продемонстрировали повышенную туморогенность, образуя злокачественные глиомы в мозге этих животных.

Показано также, что опухолевые клетки, полученные из образцов человеческих глиом, могут расти и как адгезивные культуры на обработанных ламином субстратах в бессывороточной среде для культивирования нейросфер. Преимуществом адгезивных культур является равномерно эффективный доступ ко всем клеткам монослоя ростовых факторов, препятствующих дифференцировке и апоптозу. В адгезивных культурах глиом СОК менее гетерогенны в сравнении с культурой нейросфер и почти все клетки экспрессируют гены СОК - Sox2, Nestin, CD133+ и CD44+. Лишь некоторые из этих клеток экспрессируют маркеры дифференцировки. При внутримозговой инъекции иммунокомпетентным мышам лишь 100 клеток из адгезивных культур формировали инвазивные глиальные опухоли. В связи с этим считается, что адгезивные культуры СОК представляют превосходную систему для скрининга эффективности лекарств, т.к. они способны продуцировать адгезивные клеточные линии из всех оцениваемых глиом с хорошей клеточной жизнеспособностью (6).

Ravon L.F. с соавт. (45) разработали оптимальный метод получения нейросфер из первичной культуры ГБМ человека с последующим отбором субпопуляции CD133+-клеток, формирующих субсферы, в клетках которых были идентифицированы маркеры GFAP, CD133+, nestin, Nanog, CD34+, Sox2, CD44+ та CD90+. Авторы установили, что нейросферы, полученные из первичной культуры ГБМ, содержат на 29% больше клеток, экспрессирующих CD133+ в сравнении с клетками из нативной опухоли. Это означает более высокую концентрацию CD133+-клеток в нейросферах, образующихся именно в первичной культуре ГБМ, в которых около 89% клеток экспрессируют CD133+ против 60% CD133+-клеток, полученных из нативной опухоли.

В работе Li S.C. с соавт. (46) рассмотрен вопрос о признаках идентичности и отличий СОК и НСК из нейрорегенераторных регионов субвентрикулярных и гиппокампальных зон головного мозга. При этом особое внимание уделено маркеру НСК CD133+, который с большим постоянством выявляется в клетках глиом головного мозга, особенно в ГБМ. Авторы выявили высокий уровень его экспрессии в ткани исследованных глиом, а также в клеточных линиях глиомы U251 и U87MG. Однако остается неясным, происходят ли CD133+ СОК от CD133+ нормальных НСК (35). В связи с этим в литературе активно обсуждается вопрос о

разработке противоопухолевой терапии, направленной на повреждение именно опухолевых CD133+ стволовых клеток без повреждения нормальных НСК.

Li S.C. с соавт. (46) удалось также изолировать СОК из ткани редкого типа ГБМ человека, поражавшей нейрогенераторную зону стенки бокового желудочка головного мозга. Микроскопически эта опухоль имела характерную гистоструктуру ГБМ с выраженным клеточным полиморфизмом, высокой митотической активностью и наличием некротических очагов различной протяженности. Выделенные из ткани этой ГБМ CD133+-клетки экспрессировали также маркеры СОК: нестин, CD133+, Ki67, Sox2, EFNB1, EFNB2, EFNB3, Cav-1, Musashi, Nucleostemin, Notch2, Notch4, Pax6. В бессывороточной среде культур с наличием факторов роста EGF и bFGF CD133+-клетки формировали нейросферы. Их стволовые свойства подтверждены развитием злокачественной глиомы в мозге иммунодефицитных мышей NOD/SCID после стереотаксической внутримозговой трансплантации.

По наблюдениям авторов СОК рецидивировавшей ГБМ того же пациента показали более высокую, чем в первичной опухоли, экспрессию CD133+ как в нативной ткани, так и в культуре. Выделенные из ткани этой ГБМ CD133+ опухолевые клетки пролиферировали в условиях мягкого агара с образованием колоний разных размеров. Отмечено также, что CD133+-клетки прикреплялись к фибронектиновому субстрату в питательной среде с наличием сыворотки и распластывались с образованием нейритоподобных отростков, что отражает проявление фенотипических признаков нейрогенной дифференцировки, подтвержденной выявлением экспрессии маркеров дифференцировки GFAP и β -тубулина.

При отсутствии общепринятого набора маркеров СОК Hasselbach L.A. с соавт. (34) предложили использовать клетки, полученные в результате сортировки обычных СОК-обогащенных культур. Клетки ГБМ, отобранные по способности образовывать нейросферы в бессывороточной среде культур с ростовыми факторами, экспрессировали маркеры НСК. При этом экспрессия Sox2 и нестина постоянно выявлялась в НСК нейросфер, в то время как белок CD133+ присутствовал лишь в нейросферах, образованных клетками ГБМ (40).

Hasselbach L.A. с соавт. (34) оптимизировали также протокол ферментативной диссоциации опухолевой ткани ГБМ на материале более 100 образцов. В долгосрочных культурах ГБМ эффективность получения нейросфер составила более 40%. В отличие от культур с наличием 10% FBS такие нейросферы демонстрировали туморогенность,

мультилинейный дифференцировочный потенциал, сохраняли генотип исходной опухоли, а также воспроизводили гистоструктуру оригинальной опухоли после ортотопической имплантации СОК в мозг иммунодефицитных мышей.

Кроме того, в работе приведены альтернативные протоколы постоянного или периодического культивирования опухолей в бессывороточной среде в присутствии EGF и bFGF. Для селекции клеток с фенотипом СОК авторами разработан пошаговый протокол получения нейросфер из диссоциированных хирургических образцов ГБМ в монослойных культурах, растущих на поверхностях, покрытых ВКМ протеинами.

В другой серии исследований Hasselbach L.A. с соавт. (34) провели сравнительный анализ первичных клеток ГБМ, культивированных либо в среде для нейросфер с добавлением факторов роста (NMGF), либо в традиционной питательной среде с добавлением 10% FBS. Изоляция СОК из диссоциированных тканей ГБМ проводилась при помощи клеточного сортирования, основанного на экспрессии маркера СОК CD133+ (21, 47). При этом оказалось, что фенотип СОК не постоянно связан с экспрессией этого маркера, на что указывают также Veier D. с соавт. (48), Joo K.M. с соавт. (49) и Son M.J. с соавт. (50).

Clement V. с соавт. (51) также считают, что предлагаемый в качестве маркера СОК CD133+ не является достаточно специфичным для идентификации опухолевых клеток со стволовыми свойствами. В связи с этим, авторами предложен альтернативный метод, основанный на фенотипических признаках глиома-иницирующих клеток без использования молекулярных маркеров, а именно, на способности исследуемых клеток к аутофлуоресценции в зеленой области спектра (515 нм) после лазерного облучения при длине волны 488 нм. Показано, что клетки этой субпопуляции, названные FL-плюс, способны к самообновлению *in vitro*, туморогенезу *in vivo* и избирательно экспрессируют гены стволовых клеток. Приведенные результаты авторы расценивают как предварительные, предполагая, что аутофлуоресценция FL-плюс-клеток может отражать их более высокую метаболическую и пролиферативную активность. По мнению авторов, данный метод в исследовании туморогенного потенциала СОК может оптимизировать разработку новых терапевтических и диагностических подходов в лечении глиом человека.

Таким образом, в многочисленных исследованиях, посвященных методам изоляции и идентификации СОК в злокачественных глиомах головного мозга, метод культивирования нейросфер получил широкое распространение и стал определяющим подходом в изучении

биологии СОК благодаря сохранению молекулярных особенностей СОК исходных тканей ГБМ и их туморогенного потенциала (8, 16, 24, 30, 39, 41, 52, 53).

Несмотря на значительный объем накопленных исследований по биологии СОК опухолей головного мозга, проведенных в условиях культивирования, образуемые ими туморосферы практически не изучались в морфологическом и ультраструктурном аспекте. G.Bozzuto с соавт. (54) при помощи методов прижизненной визуализации и сканирующей электронной микроскопии изучали подвижность СОК в нейросферах с целью наблюдения за межклеточными взаимодействиями и взаимоотношениями клеток с окружающей средой. Установлено, что СОК туморосфер, изолированных из образцов мультиформной ГБМ, оказались разнородными по составу и морфологии, а также по степени подвижности и способности к образованию динамичных структур. Установлено, что такие динамичные структуры регулируются неслучайными межклеточными взаимодействиями, синхронно пульсируют соответственно циклическому курсу «быстрых» и «медленных» фаз. Полученные авторами данные указывают на то, что СОК из ГБМ могут вести себя как отдельные «независимые» клетки, так и как «социальные» клетки, взаимодействующие с другими клетками этой популяции по образцу «многоклеточного организма». По данным авторов, уровень экспрессии протеина Wnt 5a коррелирует с уровнем ассоциации клеток в нейросферах (54).

Yamaturo S. с соавт. (55) провели исследование с помощью метода трансмиссивной электронной микроскопии антигенных и ультраструктурных характеристик СОК, изолированных из глиобластомы человека. Установлено, что туморосферы, сформированные разным количеством клеток, варьировали по размерам и форме, и очень часто проявляли экспрессию поверхностных маркеров стволовых клеток CD133 и CD15. В СОК отмечались повышенная ядерная атипия, активные митохондрии, грубый эндоплазматический ретикулум, покрытый везикулами, и микроворсинки. Кроме того, иногда наблюдались клетки в фазе деления и апоптоза. Эти результаты обосновывают предположение об определенной взаимосвязи СОК с НСК человека, однако СОК отличаются более примитивной ультраструктурой в отличие от недифференцированных НСК. Эти данные позволяют углубить представления об онкогенезе глиобластом/глиом, и также способствовать разработке терапии, направленной на СОК в качестве мишени.

Важный практический интерес представляют исследования, в которых анализируется прогностическое значение активности нейросферообразования в культуре и экспрессии маркеров СОК для клинической нейроонкологии (22, 32, 56, 57, 58, 59). В этих работах прослежена тесная взаимосвязь между клиническими исходами и содержанием СОК в ткани глиом головного мозга, что подтверждается также формированием туморосфер в культуре, клетки которых выявляют экспрессию стволовых маркеров и генетических признаков СОК (9, 10, 11, 12, 13, 22, 24, 32, 56, 57, 58, 59, 60).

Так, Laks D.R. с соавт. (24) в ретроспективном исследовании на образцах 32 глиом в культуре изучали соотношение между способностью клеток этих опухолей к нейросферообразованию, туморогенностью и исходами болезни пациентов. На основании мультивариантного анализа взаимосвязи между этими показателями установлено, что активность формирования нейросфер является стойким прогностическим признаком прогрессии глиомы, исхода заболевания, а также повышенного риска смерти пациента независимо от индекса пролиферации Ki67 в исходной ткани опухоли. Это позволило утверждать, что культура нейросфер является информативной моделью для исследования биологии злокачественных глиом как в теоретическом, так и практическом аспектах.

Kong B.H. с соавт. (61) при культивировании образцов ГБМ 39 пациентов, получавших после операции химиотерапию и радиотерапию, наблюдали формирование туморосфер, в которых СОК экспрессировали иммуноцитохимические маркеры PDPN, CD133+ и нестин, а также проявляли способность к нейрогенной дифференцировке и индукции туморогенеза *in vivo*. Анализ зависимости уровней нейросферообразования СОК в культуре и критериев выживаемости пациентов показал статистически достоверные различия критериев выживаемости у позитивных и негативных по выявлению СОК в опухолях пациентов с первичной ГБМ. Kong B.H. с соавт. (61) также считают, что оценка активности туморосферообразования ГБМ в культуре является независимым прогностическим фактором клинического исхода у этих пациентов. В то же время, авторы предполагают, что в связи с временной длительностью культивирования опухолей для получения нейросфер этот метод может оказаться неприемлемым для прогнозирования исхода болезни при первичных ГБМ с коротким периодом выживаемости пациентов. В таких случаях более предпочтительной является оценка экспрессии поверхностных антигенов СОК в нативной ткани этих опухолей.

Углубленное изучение биологии СОК приобрело особо важное теоретическое и практическое значение для совершенствования методов повышения эффективности адъювантной терапии злокачественных глиом головного мозга. Этой цели посвящены исследовательские разработки ряда мировых лабораторий. Предполагается, что именно субпопуляция СОК должна стать критической терапевтической мишенью для достижения полного или долгосрочного ответа злокачественных глиом на их терапевтическое лечение (57, 62, 63). При этом следует учитывать, что СОК принадлежит ключевая роль в образовании новых кровеносных сосудов, обеспечивающих прогрессивный и продолженный рост злокачественных глиом в послеоперационном периоде (64).

К настоящему времени установлено, что клетки глиомы, обогащенные субпопуляцией СОК, выявляют повышенную резистентность к облучению – основному стандартному средству в лечении злокачественных глиом после частичной хирургической резекции. Это объясняется тем, что именно СОК активируют пути внутриклеточного ответа на радиационные повреждения ДНК, быстро их репарируя (47). McCord с соавт. (66) на первичных культурах нейросфер, полученных из глиобластомы, показали более высокую чувствительность к ионизирующему излучению CD133+клеток этой опухоли. В первичных культурах глиом человека была установлена большая радиочувствительность СОК в сравнении с клетками перевиваемых линий глиом.

Ke C. с соавт. (66) использовали сфероидальные и адгезивные культуры глиомы (U251, A172) для сравнительного изучения воздействия радиационного облучения на метаболический статус опухолевых клеток. Установлено, что через неделю после облучения сфероидальные культуры, по сравнению с адгезивными, показали большую радиочувствительность с повышенным уровнем оксидантного стресса при более низких уровнях окислительного фосфорилирования и гликолитического метаболизма. В отличие от этого радиорезистентные несфероидальные адгезивные культуры демонстрировали повышенную гликолитическую активность в ответ на облучение, тогда как окислительное фосфорилирование оказалось затронутым в меньшей степени. Таким образом, эти данные показали, что разные клеточные субпопуляции адаптируются к определенным условиям культивирования, изменяя свои биоэнергетические профили, что в свою очередь влияет на чувствительность глиальных опухолевых клеток к радиационному облучению (66).

Ранее K. Mishima с соавт. (23) и A. Ernst с соавт. (67) сообщали, что экспрессия PDPN оказалась прогностически значимой у пациентов с глиомами астроцитарного генеза. Экспрессию нестина в СОК T. Strojnik с соавт. (56) и CD133+ R. Pallini с соавт. (58) связывали с плохими исходами опухолей мозга и многих раков. Однако при анализе взаимосвязи между экспрессией отдельных иммуноцитохимических маркеров PDPN+, CD133+ и нестина в СОК культур и выживаемостью пациентов с ГБМ Kong B.H. с соавт. (61) не удалось выявить отчетливых закономерностей. Так, оказалось, что среднее время выживаемости в группах больных с позитивной и негативной экспрессией PDPN в СОК оказалось сходным, составляя 400 и 408 дней соответственно. При этом экспрессия CD133+ и нестина выявлена в культивированных СОК у большинства пациентов. Лишь в одном случае наблюдалась негативная экспрессия этих маркеров в культурах клеток ГБМ, поэтому авторы не смогли провести статистическое сравнение этих 2-х групп. Аналогичные результаты получены Chinnaiyan P. с соавт. (68).

В последние годы СОК злокачественных глиом стали использоваться для тестирования противоопухолевых препаратов. С этой целью все чаще привлекаются культуры СОК нейросфер, полученных из экспериментальных линий злокачественных глиом, которые считаются общепринятой доклинической моделью для разработки новых терапевтических стратегий.

Наиболее перспективными моделями являются клетки из высокоинвазивных интракраниальных опухолей мышей линии СТ-2А, полученной из злокачественной астроцитомы, индуцированной с помощью интрацеребрального введения 20-methylcholanthrene мышам C57/BL6 (18). На культурах нейросфер этой линии Binello E. с соавт. (18) подтвердили стволовые свойства СОК, а также оптимизировали воспроизводимость инъекционных параметров.

Binello E. с соавт. (18) также считают очевидным участие СОК в развитии глиом человека высокой степени злокачественности, резистентных к стандартной терапии, и обнаружили, что показатели экспрессии маркера СОК - CD133+ в культурах СТ-2А увеличиваются с 2% в клетках монослоя до 31% в клетках нейросфер. Исследование других маркеров СОК (Oct4, Nanog и Nestin) показало различия характеристик клеток монослоя, экспрессирующих Oct4 и Nestin, но не Nanog, и клеток нейросфер, экспрессирующих все три маркера. Кроме того, клетки СТ-2А проявили более высокую активность пролиферации и туморогенность по

сравнению с клетками U87. При этом клетки нейросфер линии СТ-2А имели более высокий пролиферативный потенциал, чем клеточный монослой *in vitro*. В связи с этим авторы предлагают использовать эту модель в доклиническом тестировании новых терапевтических средств против СОК глиом человека высокой степени злокачественности (18).

Burkhardt J.K. с соавт. (69) провели сравнительное исследование воздействия ряда химиотерапевтических агентов на нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСК) и на СОК глиомы на культурах клеточных линий НСК и СОК. Показано, что НСК в сравнении с СОК оказались более уязвимыми к токсическому воздействию, в частности, темозоламида и карбоплатина, которые наиболее часто используются для химиотерапии злокачественных глиом. Классическая экспрессия гена MGMT была сходной в обеих клеточных линиях и не объясняет наблюдаемых различий в резистентности клеток к темозоламиду. В то же время не отмечено различий между СОК и НСК в экспрессии репарирующих ферментов MLH1 и MLH2, ответственных за развитие резистентности к цисплатину. Однако СОК глиомы показали в 10 раз более высокий уровень транспортного белка ABCG2, который способствует удалению из клетки токсичных препаратов. Этим объясняется множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток глиом к химиопрепаратам.

Авторы обнаружили также, что бортезомиб (BTZ) - протеасомный ингибитор, и эрлотиниб (ERL) - ингибитор тирозинкиназы, снижали жизнеспособность СОК, минимально воздействуя на НСК. После лечения больных BTZ установлено значительное повышение активности caspase-3 - ключевого фермента апоптоза в СОК при отсутствии этого признака в НСК. Однако в отличие от СОК глиом активность протеасом в НСК оказалась повышенной в 5-7 раз. Эффект воздействия ERL на СОК глиом Burkhardt J.K. с соавт. (69) объясняют более высоким уровнем экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), в отличие от НСК.

Gong X. с соавт. (70) показали, что протеасомный ингибитор bortezomid (BTZ) и рецептор EGF роста - ингибитор тирозинкиназы erlotimib (ERL)- снижают пролиферацию именно СОК глиом, не влияя на жизнеспособность НСК. В то же время установлено, что широко применяемые для лечения глиом темозолимиб (TMZ) и цисплатин оказались более токсичными для нормальных НСК в сравнении с СОК. Таким образом, обнаружено, что классические химиотерапевтические препараты, используемые для лечения ГБМ, в условиях *in vitro* выявляют различные эффекты воздействия на НСК и СОК.

Заключение

Представленный обзор литературы свидетельствует о том, что, несмотря на большой объем накопленной информации в отношении биологии СОК, их уточненная идентификация и клеточный генез в глиомах головного мозга до сих пор остаются окончательно невыясненными, нередко противоречивыми и требуют проведения дальнейших исследований. Тем не менее, обнаружение СОК в глиомах головного мозга существенно изменило взгляды ученых на биологию этих опухолей и заставило переосмыслить современные стратегии в лечении этих новообразований. Несмотря на существующие в литературе разногласия в отношении терминологических определений, молекулярно-генетических характеристик СОК и их участия в туморогенезе *in vivo*, неоспоримым является то, что глиомы содержат клеточные субпопуляции СОК, обладающие высоким пролиферативным потенциалом, определяющим прогрессирование опухоли, их терапевтическую резистентность к химио- и радиотерапии и обуславливают продолженный рост после хирургической резекции. Это подтверждается клиническими наблюдениями короткой клинической ремиссии при комбинированном лечении больных злокачественными глиомами с высоким содержанием СОК. Поэтому на современном этапе углубленное изучение биологии СОК в глиомах головного мозга представляет практически важное научное направление и подтверждает актуальность дальнейших исследований биологии СОК злокачественных глиом.

Привлечение с этой целью экспериментального метода культивирования тканей вносит существенный вклад в решение этой проблемы. Общеизвестно, что метод культивирования обеспечивает широкие возможности для выделения из ткани исходных опухолей популяции СОК в составе нейросфер, позволяет прижизненно наблюдать динамику их роста на протяжении многих пассажей и является высокоинформативным способом изучения биологии СОК злокачественных глиом. Многочисленными исследованиями показано, что возобновляемое формирование нейросфер (туморосфер) в культуре, является фундаментальным свойством опухолевых стволовых клеток, которые инициируют рост опухолей в ткани головного мозга. При этом количественная оценка активности нейросферообразования СОК в динамике культивирования отражает степень пролиферативного потенциала и злокачественности исходных опухолей.

Важным аспектом в изучении биологии СОК являются также их метаболические характеристики. Метод культивирования, позволяющий выделять из ткани опухоли популяции этих клеток, создает возможность иммуногистохимической и молекулярно-генетической идентификации клеточного состава нейросфер и потому широко используется с целью сравнительного исследования СОК, полученных из ткани глиом головного мозга различной гистоструктуры и степени анаплазии.

С помощью метода культивирования экспериментальных клеточных линий глиом удалось выявить также индивидуальные колебания количества опухолевых стволовых клеток в различных глиальных линиях, что свидетельствует о разной способности формировать нейросферы в связи с отличающимся соотношением между содержанием активно пролиферирующих СОК и более дифференцированных транзиторно-амплифицированных клеток в ткани исходных опухолей.

В последние годы культуры нейросфер, полученные из опухолей мозга человека и экспериментальных животных, стали использовать для тестирования активности противоопухолевых препаратов на доклиническом этапе. Благодаря этим исследованиям получены важнейшие данные для современной практической нейроонкологии. Оказалось, что классические химиотерапевтические препараты, используемые для лечения ГБМ – наиболее злокачественных глиом головного мозга - в условиях культивирования выявляют различные эффекты воздействия на нормальные НСК и СОК.

Основным выводом проанализированных работ является необходимость поиска лекарственных средств, избирательно воздействующих на СОК глиом, не затрагивая при этом здоровую ткань мозга и нормальные НСК. Эти наблюдения инициируют новые направления исследований в поисках повреждающих агентов, специфичных для СОК и не влияющих на нормальные НСК. Анализ результатов приведенной литературы подтверждает актуальность разработки новых терапевтических подходов, направленных против СОК глиальных опухолей головного мозга с привлечением экспериментального метода культивирования.

Список литературы

1. **Gursel D.B., Shin B.J., Burkhardt J-K., Kesavabhotla K., Schlaff C.D., Bookvar J.A.** Glioblastoma Stem-Like Cells. Biology and Therapeutic Implications. *Cancers*. 2011, 3 (2): 2655-2666.
2. **Park D.M., Rich J.N.** Biology of Glioma Cancer Stem Cells. *Mol.Cells*. 2009, 28: 7-12.
3. **Лисяный Н.И.** Иммунология и иммунотерапия злокачественных глиом головного мозга. Серия «Нейроиммунология». К.: Интерсервис. 2011, 5: 240 с.

4. **Wang J.C.** Evaluating Therapeutic efficacy against cancer stem cells: New challenges posed by a new paradigm. *Cell Stem Cell*. 2007, 1: 497-501.
5. **Bleau A.M., Howard B.M., Taylor L.A., Gursel D., Greenfield J.P., Lim Tung H.Y., Holland E.C., Boockvar J.A.** New strategy for the analysis of phenotypic marker antigens in brain tumor-derived neurospheres in mice and humans. *Neurosurg. Focus*. 2008, 24 (3-4): E28.
6. **Pollard S.M., Yoshikawa K., Clarke I.D., Danovi D., Stricker S., Russell R., Bayani J., Head R., Lee M., Bernstein M.** Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell*. 2009, 4: 568-580.
7. **Sanai N., Alvarez-Buylla A., Berger M.S.** Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med*. 2005, (353): 811-822.
8. **Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin N.M., Pastorino S., Purow B.W., Christopher N., Zhang W.** Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*. 2006, 9: 391-403.
9. **Kong B. H., Park N.-R., Shim J.K. Kim B.K., Shin H.J., Lee J.H. et al.** Isolation of glioma cancer stem cells in relation to histological grades in glioma specimens. *Child's Nervous System*. 2013, 29 (2): 217–229.
10. **Kok M., Koornstra R.H., Margarido T.C., Fles R., Armstrong N.J., Linn S. C., Van't Veer L.J., Weigelt B.** Mammosphere-derived gene set predicts outcome in patients with ER-positive breast cancer. *The Journal of Pathology*. 2009, 218 (3): 316–326.
11. **Kim H.S., Yoo S.Y., Kim K.T., Park J.T., Kim H.J., Kim J.C.** Expression of the stem cell markers CD133 and nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2012, 5 (8): 754–761.
12. **Pirozzi G., Tirino V., Camerlingo R. La Rocca A., Martucci N., Scognamiglio G., Franco R., Cantile M., Normanno N., Rocco G.** Prognostic value of cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition and circulating tumor cells in lung cancer. *Oncology Reports*. 2013, 29 (5): 1763–1768.
13. **Bao B., Ali S., Ahmad A., Li Y., Banerjee S., et al.** Differentially expressed miRNAs in cancer-stem-like cells: markers for tumor cell aggressiveness of pancreatic cancer. *Stem Cells and Development*. 2014, 23 (16): 1947–1958.
14. **Wang X., Ren H., Zhao T., Chen J., Sun W. et al.** Stem cell factor is a novel independent prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection. *Carcinogenesis*. 2014, 35 (10): 2283–2290.
15. **Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.** Stem cells cancer and cancer stem cells. *Nature*. 2001, 414: 105-111.
16. **Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawjins C., Squire J., Dirks P.B.** Identification of Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res*. 2003, 63 (18): 5821-5828.
17. **Sulman E., Aldape K., Colman H.** Brain tumor stem cells. *Current Problems in Cancer*. 2008, 32 (3): 124–142.
18. **Binello E., Qadeer Z.A., Kothari H.P., Emdad L., Germano I.M.** Stemness of the CT-2A Immunocompetent Mouse Brain Tumor Model: Characterization In Vitro. *J.Cancer*. 2012, 3: 166-174
19. **Dahlstrand J., Collins V.P., Lendahl U.** Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer res*. 1992, 52: 5334 – 5341.
20. **Tohyama T., Lee V.M., Rorke L.B., Marvin M., McKay R.D., Trojanovski J.Q.** Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab.Invest*. 1992, 66: 303-313.

21. **Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B.** Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature*. 2004, 432: 396-401
22. **Ben-Porath I., Thomson N.W., Carev V.J., Ge R., Bell G.W., Ragev A., Weinberg R.A.** An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat.Genet.* 2008, 40: 499 – 507.
23. **Mishima K., Kato Y., Kaneko M. K., Nishikawa R., Hirose T., Matsutani M.** Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathologica*. 2006, 111 (5): 483–488.
24. **Laks D.R., Masterman-Smith M., Visnyei K., Angenieux B., Orozco N.M. et al.** Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *StemCells*. 2009, 27 (4): 980-987.
25. **Dahlrot R.H., Hermansen S.K., Hansen S., Kristensen B.W.** What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2013, 6 (3): 334–348.
26. **Christensen K., Schrøder H. D., Kristensen B.W.** CD133 identifies perivascular niches in grade II-IV astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology*. 2008, 90 (2): 157–170.
27. **Kim K.J., Lee K.H., Kim H.S., Moon K.S., Jung T.Y. et al.** The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathology*. 2011, 31 (5): 494–502.
28. **Schoppmann S.F., Berghoff A. S., Jesch B., Zacherl J., Nirtl N. et al.** Expression of podoplanin is a rare event in sporadic gastrointestinal stromal tumors and does not influence prognosis. *Future Oncology*. 2012, 8 (7): 859–866.
29. **Reynolds B.A., Tetzlaff W., Weiss S.** A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J.Neurosci.* 1992, 12: 4565- 4574.
30. **Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., Steindler D.A.** Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002, 39 (3): 193-206.
31. **Galli R., Binda E., Orfanelli U., Cipelletti B., Gritti A. et al.** Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004, 64 (19): 7011-7021.
32. **Zeppernick F., Ahmadi R., Campos B., Dictus C., Helmke B.M. et al.** Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res*. 2008, 14 (1): 123-129.
33. **Singec I., Knoth R., Meyer R.P., Maciaczyk J., Volk B., Nikkhah G., Frotscher M., Snyder E.Y.** Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat. Methods*. 2006, 3: 801-806.
34. **Hasselbach L.A., Irtenkauf S.M., Lemke N.W., Nelson K.K., Berezovsky A.D., Carlton E.T., et al.** Optimization of High Grade Glioma Cell Culture from Surgical Specimens for Use in Clinically Relevant Animal Models and 3D Immunocytochemistry. *J. Vis. Exp.* 2014, 83, e51088: 1-9.
35. **Qiang L., Yang Y., Ma Y.J., Chen F.H., Zhang L.B., Liu et al. W.** Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 2009, 279 (1): 13-21.
36. **Gilbert C.A., Ross A.H.** Cancer Stem cells: Cell Culture, Markers and Targets for New Therapies. *J.Cell.Biochem.* 2009, 108 (5): 1031-1038.
37. **Hemmati H.D., Nakano I., Lazareff J.A., Masterman-Smith M., Geschwind D.H., Bronner-Fraser M., Kornblum H.I.** Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*. 2003, 100: 15178-15183.

38. **Ahmed S.** The culture of neural stem cells. *J. Cell Biochem.* 2009, 106: 1-6.
39. **Vescovi A.L., Galli R., Reynolds B. A.** Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer.* 2006, 6: 425-436.
40. **deCarvalho A. C., Nelson K., Lemke N., Lehman N. L., Arbab A. S., Kalkanis S., Mikkelsen T.** Gliosarcoma Stem Cells Undergo Glial and Mesenchymal Differentiation In Vivo. *Stem Cells.* 2010, 28 (2): 181–190.
41. **Azari H., Millette S., Ansari S., Rahman M., Deleyrolle L.P., Reynolds B.A.** Isolation and expansion of human glioblastoma multiforme tumor cells using the neurosphere assay. *J. Vis. Exp.* 2011, 56, e3633: 1-5.
42. **Woolard K., Fine H.A.** Glioma stem cells: better flat than round. *Cell Stem Cell.* 2009, 4: 466-467.
43. **Facchino S., Abdouh M., Chatoo W., Bernier G.** BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J. Neurosci.* 2010, 28 (30): 1096–1111.
44. **Yi L., Zhou C., Wang B., Chen T. Xu M., Xu L., Feng H.** Implantation of GL261 neurospheres into C57/BL6 mice: a more reliable syngenic graft model for research on glioma-initiating cells. *Int.J.Oncol.* 2013, 43 (2): 477-484.
45. **Pavon L.F., Marti L.C., Sibov T.T., Malheiros S.M.F., Brandt R.A., Gamarra S.C.** In vitro analysis of neurospheres derived from glioblastoma primary culture: a novel methodology paradigm. *Front.Neurol.* 2014, 4: 214 – 220.
46. **Li S.C., Long T.V., Ho H.W., Yin H.Z., Keschrumrus V., Lu Q., Wang J. et al.** Cancer stem cells from a rare form of glioblastoma multiforme involving the neurogenic ventricular wall. *Cancer Cell International.* 2012, 12: 41-60.
47. **Bao S., Wu Q., McLendon D.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Binger D.D., Rich J.N.** Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006a, 444: 756-760.
48. **Beier D., Hau P., Proescholdt M., Lohmeier A., Wischhusen J., Oefner P.J., Aigner L., Brawanski A., Bogdahn U., Beier C.P.** CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cell show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* 2007, 67: 4010-4015.
49. **Joo K. M., Kim S.Y., Jin X., Song S.Y., Kong D.S., Lee J.I.** Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab. Invest.* 2008, 88: 808-815.
50. **Son M.J., Woolard K., Nam D.H., Lee J., Fine H.A.** SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem cell.* 2009, 4: 440-452.
51. **Clement V., Marino D., Cudalbu C., Hamou M-F., Mlynarik V., Tribolet N. et al.** Marker-independent identification of glioma-initiating cells. *Nature Methods.* 2010, 7: 224-228.
52. **Yuan X., Curtin J., Xiong Y. Liu G., Waschmann-Hogiu S., Farkas D. et al.** Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2004, 23: 9392-9400.
53. **Germano I.M., Swiss V., Casaccia P.** Primary brain tumors, neural stem cells, and brain tumor cancer cells: Where is the link? *Neuropharmacol.* 2010, 58 (6): 903-910.
54. **Bozzuto G., Toccaceli L., Mazzoleni S., Frustagli G. et al.** Brain tumor stem cell dancing. *Ann Ist Super Sanita.* 2014, 50 (3): 286-290. DOI: 10.4415/ANN_14_03_11.
55. **Yamamuro S., Okamoto Y., Sano E., Ochiai Y., Ogino A., Ohta T., Hara H., Ueda T., Nakayama T., Yoshino A., Katayama Y.** Characterization of glioma stem-like cells from human glioblastomas. *International Journal of Oncology.* 2015, 47 (1): 91-96. DOI: 10.3892/ijo.2015.2992.

56. **Strojnik T., Røsland G. V., Sakariassen P. O., Kavalari R., Lah T.** Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surgical Neurology*. 2007, 68 (2): 133–143.
57. **Beier D., Rohrl S., Pillai D.R., Schwartz S., Kunz-Schughart L.A. et al.** Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res*. 2008, 68: 5706-5715.
58. **Pallini R., Ricci-Vitiani L., Banna G. L., Signore, M., Lombardi, D., Todaro, M. et al.** Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clinical Cancer Research*. 2008, 14 (24): 8205–8212.
59. **Zhang M., Song T., Yang L., Chen R., Wu L., Yang Z., Fang J.** Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008, 27: 85-92.
60. **Wang X., Ren H., Zhao T., Chen J., Sun W., Sun Y. et al.** Stem cell factor is a novel independent prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection. *Carcinogenesis*. 2014, 35 (10): 2283–2290.
61. **Kong B.H., Moon J.H., Huh U.M., Shim J.K., Lee J.H. et al.** Prognostic Value of Glioma Cancer Stem Cell Isolation in Survival of Primary Glioblastoma Patients. *Stem Cells International*. 2014, 2014, Article ID 838950. - 6 p.
62. **Bao S., Wu Q., Li Z., Sathornsumetee S., Wang H., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N.** Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res*. 2008. 68: 7043-6048.
63. **Dietrich J. Imitola J., Kesari S.** Mechanisms of Disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. *Nat.Clin.Pract*. 2008, 5: 393-404.
64. **Bao S., Wu Q., Sathornsumetee S., Hao Y., Li Z., Hjelmeland A.B., Shi Q., McLendon R.E., Bigner D.D., Rich J.N.** Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer.Res*. 2006b, 66: 7843-7848.
65. **McCord A.M., Jamal M., Williams E.S., Camphausen K., Tofilon P.J.** CD133+ glioblastoma stem-like cells are radioresistant with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clin. Cancer Res*. 2009, 15 (16): 5145-5153.
66. **Ke C., Tran K., Chen Y., Di Donato A.T. et al.** Linking differential radiation responses to glioma heterogeneity. *Oncotarget*. 2014, 5 (6): 1657-1665. DOI: 10.18632/oncotarget.1823.
67. **Ernst A., Hofmann S., Ahmadi R., Becker N., Korshunov A., Engel F. et al.** Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival. *Clinical Cancer Research*. 2009, 15 (21): 6541–6550.
68. **Chinnaiyan P., Wang M., Rojiani A.M. Tofilon P.J., Chakravarti A., Ang K.K. et al.** The prognostic value of nestin expression in newly diagnosed glioblastoma: report from the radiation therapy oncology group. *Radiation Oncology*. 2008, 3 (1): 32- 40.
69. **Burkhardt J.K. Shin B.J., Boockvar J.A.** Neural Stem Cells and Glioma Stem-Like Cells Respond Differently to Chemotherapeutic Drugs: Selectivity at the Cellular Level. *Neurosurgery*. 2011, 68 (6): 21-22.
70. **Gong X., Schwartz P.H., Linskey M.E., Bota D.A.** Neural stem/progenitors and glioma stem-like cells have differential sensitivity to chemotherapy. *Neurology*. 2011, 76 (13): 1126-1134.

ПРОБЛЕМА ПОЛУЧЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Н.Б. Бильдюг

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; relapse@yandex.ru

На сегодняшний день известно большое количество методов дифференцировки различных клеток в кардиомиоциты. Однако существующие подходы и способы оценки их эффективности имеют целый ряд ограничений. В обзоре описаны основные направления исследований и проблемы, связанные с получением дифференцированных кардиомиоцитов *in vitro* и *in vivo* из различных клеток, включая эмбриональные стволовые клетки, стволовые клетки сердца, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и фибробласты.

Ключевые слова: кардиомиоциты, методы дифференцировки, стволовые клетки, фибробласты.

Неспособность миокарда к самообновлению, обусловленная отсутствием пролиферации дифференцированных, функционально активных кардиомиоцитов (КМЦ), вызывает целый ряд проблем, которые в первую очередь связаны с вопросами регенерации. Кроме того, неспособность КМЦ к делению ограничивает возможность получения стабильной линии этих клеток для ее использования в качестве модели для проведения фундаментальных и прикладных исследований. В связи с этим большое количество исследований направлено на дифференцировку различных клеток в КМЦ для возможности получения неиссякаемого источника функционально активных клеток миокарда.

Методы дифференцировки КМЦ из стволовых клеток.

Дифференцированные КМЦ получают *in vivo* и *in vitro* из различных стволовых клеток, включая эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), мезенхимные стволовые клетки, эндотелиальные прогениторные клетки и стволовые клетки сердца (СКС). Наиболее часто в качестве источника дифференцированных КМЦ используют ЭСК. Давно известно, что КМЦ могут быть получены в результате спонтанной дифференцировки ЭСК при их культивировании в виде эмбриональных телец (1). Подобные методы ненаправленной дифференцировки КМЦ из ЭСК имитируют стадии нормального эмбрионального развития сердца и используются для

получения, в частности, мышинных и человеческих КМЦ (1, 2). Однако такой подход является малоэффективным и приводит к получению не более чем 1% КМЦ от общей клеточной популяции (2). Более эффективные методы получения КМЦ из стволовых клеток основаны на направленной дифференцировке. При разработке таких методов, как правило, учитываются факторы, влияющие на стадии эмбрионального развития сердца. В частности, в эмбриогенезе последовательные этапы дифференцировки КМЦ и других клеток сердца зависят от сигнальных путей Nodal, костного морфогенетического белка (BMP), пути Wnt/ β -катенин, фактора роста фибробластов (3) и ретиноевой кислоты (4). Различные способы направленной дифференцировки стволовых клеток в КМЦ включают воздействие на сигнальные пути Nodal/активин и BMP4 (5) и Wnt/ β -катенин (6, 7). Янгом с соавт. (8) был разработан более эффективный протокол дифференцировки человеческих ЭСК, включающий последовательную стимуляцию сигнальных путей Nodal/активин, BMP4 и Wnt по мере прохождения клетками определенных стадий дифференцировки. Такой метод приводил к получению примерно 40% КМЦ от общей клеточной популяции. Несмотря на определенные успехи в получении КМЦ из ЭСК, эффективность таких методов варьирует от линии к линии. Кроме того, в случае применения дифференцированных клеток в регенеративных целях *in vivo* ограничением для использования КМЦ, полученных из ЭСК, является их аллогенное происхождение, а также выраженная геномная нестабильность (9).

Другим методом, получившим широкое распространение, является дифференцировка КМЦ из иПСК. иПСК получают путем индукции плюрипотентного состояния у зрелых соматических клеток млекопитающих с помощью набора транскрипционных факторов. иПСК впервые были описаны в 2006 г., когда группе Яманаки (10) удалось превратить фибробласты взрослых мышей в иПСК путем ретровирусного введения в клетки набора транскрипционных факторов Oct4, Sox2, c-Myc и Klf4 (известных как факторы Яманаки). иПСК по своей морфологии и экспрессии генов сходны с ЭСК, включая экспрессию маркеров плюрипотентности и способность дифференцироваться в зародышевые листки (10, 11). Различными исследователями было показано, что иПСК можно дифференцировать в КМЦ, при этом свойства полученных клеток сравнимы с характеристиками КМЦ, полученных из ЭСК (12). Для повышения эффективности направленной дифференцировки иПСК в КМЦ используют различные цитокины, ростовые факторы и низкомолекулярные соединения, влияющие на сигнальные пути, важные в ходе развития сердца (13). Такие соединения включают

аскорбиновую кислоту (14), ретиноевую кислоту (15), плюрипотин (16), 5-азациитидин (17) и ДМСО (18).

Некоторые исследователи считают более перспективным использование стволовых клеток сердца (СКС), которые считаются эндогенными предшественниками КМЦ. Эти клетки идентифицируют по наличию различных маркеров клеточной поверхности, таких как c-kit, MDR, NKX2.5, CD195 и SCA-1 (19-21). Было описано, что СКС могут дифференцироваться во все типы клеток сердечной ткани и самообновляться. СКС являются клоногенными и мультипотентными, а также экспрессируют антигены стволовых клеток и прогениторных клеток эндотелия (22). Несмотря на отсутствие доказательств роли эндогенных СКС в нормальном гомеостазе или при восстановлении сердца после повреждения, существуют данные, описывающие возможность дифференцировки выделенных СКС *in vitro* и восстановления функции сердца при их трансплантации в зону повреждения (23). На сегодняшний день наиболее эффективной считается дифференцировка СКС в кардиосферах, представляющих собой трехмерные клеточные агрегаты (24, 25). Некоторые дифференцированные *in vitro* клетки экспрессируют ранние маркеры кардиомиоцитарной дифференцировки, такие как GATA-4 и MEF2C (25). Однако сами авторы, как правило, признают, что положительный эффект СКС на функциональное состояние сердца при их трансплантации *in vivo* в основном обусловлен паракринным воздействием секретируемых ими факторов (24).

Получение КМЦ из фибробластов.

Огромное значение имели работы, показавшие возможность превращения фибробластов млекопитающих в функционально активные зрелые клетки различных типов (26-28). Метод получения КМЦ из соматических клеток включает несколько подходов, первый из которых связан с индукцией повышенной экспрессии транскрипционных факторов, характерных для КМЦ. В 2010 году Йеда с соавт. (26) показали, что введение транскрипционных факторов Gata4, Mefc2 и Tbx5 (GMT) с помощью ретровирусов в сердечные и дермальные фибробласты мышей приводило к превращению 20% клеток в индуцированные КМЦ-подобные клетки (иКМЦ), при этом уже через 3 дня культивирования наблюдалась экспрессия специфичных для КМЦ белков (26, 29). Сходные результаты были получены другими авторами при использовании подобных наборов перепрограммирующих факторов (30, 31). В полученных с помощью таких методов клетках наблюдалась активация генов тяжелой цепи

сердечного α -миозина (α MHC) и сердечного тропонина T ($cTnT1$), а также повышенная экспрессия генов других кардиоспецифичных белков, таких как сердечный α -актин и α -актинин-2. Доля клеток с активированным промотором α MHC составляла 20% от общей популяции фибробластов, а доля клеток, экспрессирующих $cTnT$, составляла всего 6 % (26). У большинства клеток с активным α MHC выявлялись саркомерные структуры, содержащие α -актинин. При этом большинство иКМЦ авторы описывают как «частично перепрограммированные» клетки. Эти клетки были сходны с неонатальными КМЦ по общему профилю экспрессии генов и электрофизиологическим показателям. Таким образом, эффективность дифференцировки оставалась достаточно низкой. Кроме того, возникали проблемы, связанные с воспроизводимостью таких методов получения КМЦ (32, 33). Более эффективным оказался метод введения транскрипционных факторов GMT в стехиометрических количествах (34). Использование комбинации из 5 сердечных транскрипционных факторов GMT, Hand2, и Nkx2.5 (GMTHN) также приводило к более эффективному перепрограммированию мышечных фибробластов, однако и в этом случае большинство дифференцированных клеток *in vitro* представляли собой частично перепрограммированные КМЦ, и лишь некоторые клетки превращались в сокращающиеся КМЦ (35). Рядом исследователей было показано, что различные другие комбинации транскрипционных факторов могут активировать многие кардиомиоцитарные гены в фибробластах, однако не приводят к получению сокращающихся КМЦ *in vitro* (32, 36).

Второй подход связан с доставкой в клетки микроРНК (miRNA), которые играют важную роль в ходе развития сердца (31). Опосредованное miRNA превращение мышечных фибробластов в КМЦ было впервые описано Джайаварденой с соавт. (37) с использованием комбинации из 4-х miRNA (miR-1, -133, -208 и -499), которые, как известно, экспрессируются в КМЦ и вовлечены в развитие и нормальное функционирование сердца (38, 39). В перепрограммированных клетках выявляли маркеры КМЦ, а также наблюдали саркомерную организацию сократительного аппарата и механические сокращения. Использование дополнительного этапа обработки клеток ингибитором Janus-киназы (JAK) приводило к повышению эффективности превращения мышечных фибробластов в КМЦ-подобные клетки *in vitro* (37). Однако несмотря на то, что клетки, дифференцированные с помощью miRNA, окрашивались на маркеры КМЦ, включая MHC, сердечный тропонин I (TNNI3) и α -актинин, спонтанные сокращения наблюдались только у 1 - 2% клеток от общей популяции (37).

Еще один подход, объединяющий несколько описанных ранее способов дифференцировки, называется методом «эпигенетической нестабильности». Он основан на временной индукции в фибробластах промежуточного состояния плюрипотентности с последующей направленной дифференцировкой в КМЦ (40). Такой метод включает гиперэкспрессию в эмбриональных фибробластах мышей транскрипционных факторов, используемых для получения iPСК (Oct4, Sox2 и Klf4), с последующей обработкой клеток низкомолекулярными ингибиторами Janus-киназы и их культивированием в кардиогенной среде с добавлением BMP4 (31, 40). Дифференцированные клетки окрашивались на маркеры КМЦ, такие как сTnT (примерно 40% клеток), тяжелая цепь миозина и α -актинин. Интересно, что в этих клетках выявлялась только предсердная изоформа легкой цепи миозина (MLC-2a), что указывает на специализацию подтипа полученных КМЦ. В некоторых колониях наблюдались сокращения (31, 40).

К настоящему времени накопилось много данных о сходстве фибробластов с МСК по экспрессии основных поверхностных маркеров и способности к мультипотентной дифференцировке. Возможно, что положительные результаты перепрограммирования фибробластов в КМЦ связаны именно с наличием у них свойств стволовых клеток. В то же время, фибробласты отличаются от МСК, например, по уровню экспрессии ряда антигенов (41).

Методы получения КМЦ из iPСК и фибробластов часто связаны с использованием вирусных систем доставки. Использование векторов на основе ретровирусов и лентивирусов, которые встраиваются в геном клеток, может приводить к генетическим нарушениям и онкогенной трансформации. В настоящее время более предпочтительным является использование не встраивающихся в геном вирусов, таких как аденовирусы и вирус Сендай, а также невирусных систем доставки (42).

Ограничения методов получения дифференцированных КМЦ.

Несмотря на наличие большого количества данных о получении дифференцированных КМЦ, методы дифференцировки имеют целый ряд ограничений, связанных с недостаточной степенью зрелости клеток и их гетерогенностью, а также небольшим количеством функционально активных КМЦ в популяции клеток.

Все доступные на сегодняшний день протоколы дифференцировки человеческих КМЦ из стволовых клеток приводят к получению смеси различных подтипов КМЦ, например, желудочковых, предсердных КМЦ и КМЦ проводящей системы сердца (43, 44). Несмотря на

то, что со временем в культуре увеличивается доля желудочковых КМЦ (45), такая гетерогенность популяции затрудняет ее использование для исследований *in vitro*, а при введении *in vivo* приводит к проаритмогенному эффекту (46). Для решения этой проблемы используются различные ростовые факторы, которые могут в некоторой степени регулировать специализацию подтипов КМЦ, дифференцированных из стволовых клеток. Такие факторы включают, например, нейрегулин, стимулирующий созревание желудочковых КМЦ (47). Кроме того, проблема неоднородности популяции усугубляется геномной нестабильностью помещенных в культуру клеток (9) и эпигенетическими модификациями, которые могут ограничивать способность клеток дифференцироваться в КМЦ (48). В результате получается культура, содержащая как КМЦ, так и недифференцированные клетки, что ограничивает ее использование *in vitro* и при введении *in vivo* может приводить к опухоленному эффекту. Таким образом, получение гомогенной культуры дифференцированных КМЦ или, по крайней мере, хорошо охарактеризованной смешанной культуры клеток разных подтипов до сих пор остается проблемой.

Другим не менее важным ограничением является то, что большинство КМЦ, полученных из стволовых клеток, а также из фибробластов, имеет так называемый «незрелый фенотип», т.е. отличается по своим характеристикам от КМЦ сердца взрослого организма. На ранних сроках КМЦ, дифференцированные из стволовых клеток, имеют намного меньшие размеры и обладают признаками эмбриональных КМЦ, такими, как аморфная форма и короткие, плохо организованные саркомеры (49, 50). Кроме того, паттерн экспрессии генов у этих клеток соответствует стадиям эмбрионального развития сердца (2, 51). В ходе длительного культивирования дифференцированные КМЦ увеличиваются в размере и приобретают более типичную морфологию и более зрелый сократительный аппарат (45, 50). Однако, даже на поздних сроках культивирования (около 180 дней в культуре) эти клетки не соответствуют взрослым КМЦ по электрофизиологическим показателям и экспрессии генов (52). Имеются данные, указывающие на пониженную массу митохондрий у дифференцированных КМЦ (53) и отсутствие Т-трубочек (54, 55). Для улучшения статуса созревания КМЦ некоторые исследователи используют трехмерные системы культивирования. Например, в КМЦ, полученных из человеческих ЭСК и помещенных в трехмерные условия, наблюдаются более длинные саркомеры и более высокий уровень экспрессии генов сердечного тропонина Т, тяжелой цепи α -миозина и кальсеквестрина по сравнению с клетками, помещенными в

двумерные условия (56). Клетки, полученные из фибробластов, также не соответствуют КМЦ взрослого сердца по морфологии, общему профилю экспрессии генов и электрофизиологическим показателям и, как правило, называются авторами «КМЦ-подобными клетками» (32).

Еще одна трудность связана с неоднозначностью интерпретации результатов дифференцировки клеток в КМЦ. В то время как существуют понятия «зрелого» и «незрелого» фенотипа КМЦ, общепринятые маркеры для идентификации дифференцированных КМЦ, а также определения статуса их созревания отсутствуют (26, 57). Несмотря на наличие огромного количества кардиоспецифичных белков, которые имеют характерный паттерн экспрессии в ходе развития сердца и которые активно используются исследователями для идентификации дифференцированных КМЦ, многие из них имеют тенденцию изменяться при стрессе или патологических состояниях (58). Например, ген тяжелой цепи α -миозина является высоко специфичным для КМЦ, однако при заболеваниях сердца происходит изменение содержания изоформ миозина (59). При сердечной недостаточности активируются гены, характерные для стадий эмбрионального развития, такие как гены предсердного натрийуретического фактора ANF, β MHC и скелетного актина (58, 60), при этом экспрессия некоторых генов, таких как ген α MHC и SERCA2a, напротив, снижается (60). При помещении КМЦ в культуру *in vitro* они начинают экспрессировать множество изоформ белков, характерных для стадий эмбрионального развития, таких как гладкомышечный α -актин, β -MHC и ANF (61, 62). В связи с этим результаты, полученные на основании таких нестабильных маркеров, следует интерпретировать с осторожностью (63).

Еще одним, широко используемым маркером кардиомиоцитарной дифференцировки является сердечный тропонин Т (сTnT) (64). Однако, было показано, что сTnT также экспрессируется и в других клетках, таких как гладкомышечные клетки (50), что ограничивает возможность его использования в качестве маркера КМЦ. На сегодняшний день единственным надежным критерием дифференцировки КМЦ можно считать соотношение изоформ сердечного тропонина I. В миокарде у всех млекопитающих встречаются две изоформы тропонина I (TnI), которые кодируются двумя отдельными генами и последовательно экспрессируются в ходе развития сердца млекопитающих *in vivo* (59, 65). Ген медленного скелетного тропонина I (ssTnI) TNNI1 экспрессируется в саркомерах эмбриональных КМЦ. На поздних стадиях эмбрионального развития или на ранних стадиях

постнатального развития его экспрессия подавляется, и происходит активация гена «взрослого» сердечного тропонина I (сTnI) TNNI3. Таким образом, в зрелом миокарде выявляется только белок сTnI с полным отсутствием ssTnI (56, 59). Важно, что стресс и патологические состояния не оказывают влияния на динамику экспрессии изоформ ssTnI и сTnI (59) в отличие от обратимых маркеров кардиомиоцитарной дифференцировки, которые чаще всего используются исследователями в настоящее время (60). Результаты анализа соотношения изоформ тропонина ssTnI и сTnI показали, что их экспрессия в культуре неонатальных КМЦ грызунов, а также КМЦ мышей, полученных из ЭСК, сравнима с паттерном их экспрессии *in vivo*.

В случае дифференцировки из человеческих ИПСК созревание КМЦ существенно запаздывает по сравнению с созреванием клеток в ходе нормального развития сердца, при этом сTnI составляет только 2% от общего тропонина I даже через 9,5 месяцев культивирования (51). Интересно, что в отличие от результатов Вестерн-блоттинга данные иммунофлуоресцентного анализа показывают значительное количество сTnI в саркомерах дифференцированных клеток (66). Такие результаты указывают на неприемлемость использования данных иммунофлуоресцентного окрашивания клеток для количественной оценки этого маркера созревания КМЦ (51).

Таким образом, несмотря на то, что многие авторы описывают получение большого количества КМЦ в результате дифференцировки, способы оценки дифференцированных клеток, как правило, являются неоднозначными, и реальное количество функционально активных КМЦ оказывается намного меньше. Например, авторы, описывающие получение из ЭСК человека культуры, содержащей 82-95% КМЦ, идентифицировали дифференцированные клетки по экспрессии транскрипционных факторов, а также по их окраске на сердечный тропонин T, при этом из описания результатов исследования следует, что сокращения наблюдались лишь в некоторых участках культуры (67). В другой работе, несмотря на выявление в клетках различных кардиоспецифичных маркеров, сокращающиеся КМЦ полностью отсутствовали (66). Авторы еще одного исследования наблюдали спонтанные сокращения всего у 1% - 2% клеток от общей популяции, в то время как у значительно большего количества клеток были выявлены такие маркеры, как МНС, сердечный тропонин I (TNNI3) и α -актинин (37).

Дифференцировка КМЦ *in vivo*.

Несмотря на низкую эффективность известных на сегодняшний день методов получения дифференцированных КМЦ, они широко применяются в условиях *in vivo*. По данным разных авторов, трансплантация стволовых клеток в поврежденную зону сердца часто приводит к положительному результату. Однако в связи с неоднозначностью оценки дифференцировки трансплантированных клеток и их участия в процессе регенерации поврежденной области миокарда мнения ученых о роли этих клеток различаются. В то время как некоторые исследователи считают, что благоприятный эффект, наблюдаемый при введении стволовых клеток в сердце, обусловлен их дифференцировкой в КМЦ, большинство все же объясняет его высвобождением растворимых факторов, которые опосредуют восстановление сердца и образование сосудов (68). В то же время, методы перепрограммирования немышечных клеток сердца в КМЦ *in vivo* показывают хорошие результаты. Так, например, было показано, что перепрограммированные *in vivo* фибробласты в КМЦ мыши являются более зрелыми по сравнению с клетками, полученными *in vitro*, и их введение в поврежденный миокард приводит к значительному уменьшению рубца после инфаркта и улучшению функции сердца (69). Таким образом, методы дифференцировки, в частности, из фибробластов, даже при низкой эффективности получения КМЦ могут приводить к положительным результатам *in vivo* и в связи с этим имеют меньше ограничений по сравнению с методами получения КМЦ *in vitro*.

Заключение.

Методы дифференцировки в кардиомиоцитарном направлении считаются довольно перспективными с точки зрения регенеративной медицины и их применения *in vivo*. Однако использование дифференцированных КМЦ *in vitro* для фундаментальных, а также прикладных исследований (например, для тестирования возможных лекарственных средств) пока еще ограничено в связи с отсутствием стандартного метода получения гомогенной культуры зрелых функционально активных КМЦ. Несмотря на существенные достижения в изучении механизмов дифференцировки КМЦ в ходе эмбриогенеза, пока еще мало известно о сигнальных путях и макромолекулах, играющих ключевую роль в процессе дифференцировки КМЦ в системе *in vitro*. Более детальное изучение особенностей дифференцировки клеток в культуре, а также факторов, влияющих на этот процесс, может приблизить исследователей к созданию более эффективных методов получения дифференцированных КМЦ, а также способов их оценки.

Список литературы

1. **Doetschman T.C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R.** The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolksac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morpholog.* 1985, 87: 27–45.
2. **Kehat I., Kenyagin-Karseni D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E., Binah O., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L.** Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. 2001, *J Clin Invest.* 108: 407–416.
3. **Prowse A.B., Timmins N.E., Yau T.M., Li R.-K., Weisel R.D., Keller G., Zandstra P.W.** Transforming the promise of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to a therapy: challenges and solutions for clinical trials. *Canadian Journal of Cardiology* 2014, 30: 1335-1349.
4. **Evans S.M., Yelon D., Conlon F.L., Kirby M.L.** Myocardial lineage development. *Circulation research.* 2010, 107: 1428-1444.
5. **Laflamme M.A., Chen K.Y., Naumova A.V., Muskheli V., Fugate J.A., Dupras S.K., Reinecke H., Xu C., Hassanipour M., Police S., O'Sullivan C., Collins L., Chen Y., Minami E., Gill E.A., Ueno S., Yuan C., Gold J., Murry C.E.** Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol.* 2007, 25: 1015–1024.
6. **Naito A.T., Shiojima I., Akazawa H., Hidaka K., Morisaki T., Kikuchi A., Komuro I.** Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2006, 103: 19812–19817.
7. **Paige S.L., Osugi T., Afanasiev O.K., Pabon L., Reinecke H., Murry C.E.** Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2010, 5(6): 11134.
8. **Yang L., Soonpaa M.H., Adler E.D., Roepke T.K., Kattman S.J., Kennedy M., Henckaerts E., Bonham K., Abbott G.W., Linden R.M., Field L.J., Keller G.M.** Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature.* 2008, 453: 524–528.
9. **Полянская Г.Г.** Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. *Цитология.* 2014, 56(10): 697-707.
10. **Takahashi K., Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006, 126: 663–676.
11. **Guenther M.G., Frampton G.M., Soldner F., Hockemeyer D., Mitalipova M., Jaenisch R., Young R.A.** Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010, 7: 249–257.
12. **Schenke-Layland K., Rhodes K.E., Angelis E., Butylkova Y., Heydarkhan-Hagvall S., Gekas C., Zhang R., Goldhaber J.I., Mikkola H.K., Plath K., MacLellan W.R.** Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells.* 2008, 26: 1537–1546.
13. **Willems E., Bushway P.J., Mercola M.** Natural and synthetic regulators of embryonic stem cell cardiogenesis. *Pediatr Cardiol.* 2009, 30: 635-642.
14. **Cao N., Liu Z., Chen Z., Wang J., Chen T., Zhao X., Ma Y., Qin L., Kang J., Wei B., Wang L., Jin Y., Yang H.T.** Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res.* 2012, 22: 219–236.
15. **Lin S.C., Dolle P., Ryckebusch L., Nosedá M., Zaffran S., Schneider M.D., Niederreither K.** Endogenous retinoic acid regulates cardiac progenitor differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010, 107: 9234–9239.

16. **Osada H.** Protein Targeting with Small Molecules: Chemical Biology Techniques and Applications. Wiley: Hoboken, NJ, USA. 2009, p. 297.

17. **Qian Q., Qian H., Zhang X., Zhu W., Yan Y., Ye S., Peng X., Li W., Xu Z., Sun L., Xu W.** 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase. *Stem Cells Dev.* 2012, 21: 67–75.

18. **Nakamura T., Sano M., Songyang Z., Schneider M.D.** A Wnt- and β -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003, 100: 5834–5839.

19. **Oh H., Bradfute S.B., Gallardo T.D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina Y., Pocius J., Michael L.H., Behringer R.R., Garry D.J., Entman M.L., Schneider M.D.** Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003, 100: 12313–12318.

20. **Valente M., Nascimento D.S., Cumano A., Pinto-do-Ó P.** Sca-1(+) Cardiac Progenitor Cells and Heart-Making: A Critical Synopsis. *Stem Cells Dev.* 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305557.

21. **Keith M.C.L., Bolli R.** “String theory” of c-kit(pos) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results. *Circ Res.* 2015, 116: 1216–30.

22. **Stastna M., Chiment I., Marbaín E., Van Eyk J.E.** Identification and functionality of proteomes secreted by rat cardiac stem cells and neonatal cardiomyocytes. *Proteomics.* 2010, 10: 245–253.

23. **Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P.** Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003, 114: 763–776.

24. **Li T.S., Cheng K., Lee S.T., Matsushita S., Davis D., Malliaras K., Zhang Y., Matsushita N., Smith R.R., Marbán E.** Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells,* 2010, 28(11): 2088-98.

25. **Oltolina F., Zamperone A., Colangelo D., Gregoletto L., Reano S., Pietronave S., Merlin S., Talmon M., Novelli E., Diena M., Nicoletti C., Musarò A., Filigheddu N., Follenzi A., Prat M.** Human Cardiac Progenitor Spheroids Exhibit Enhanced Engraftment Potential. *PLoS One.* 2015, 10(9): 0137999.

26. **Ieda M., Fu J.D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B.G., Srivastava D.** Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell.* 2010, 142: 375–386.

27. **Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Südhof T.C., Wernig M.** Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010, 463: 1035–1041.

28. **Sekiya S., Suzuki A.** Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocytelike cells by defined factors. *Nature.* 2011, 475: 390–393.

29. **Lin C., Yu C., Ding S.** Toward directed reprogramming through exogenous factors. *Acad Sci USA.* 2013, 23(5): 519-25.

30. **Song K., Nam Y.J., Luo X., Qi X., Tan W., Huang G.N., Acharya A., Smith C.L., Tallquist M.D., Neilson E.G., Hill J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N.** Heart repair by reprogramming non-miocytes with cardiac transcription factors. *Nature.* 2012, 485: 599–604.

31. **Xu C.** Turning cardiac fibroblasts into cardiomyocytes in vivo. *Trends Mol Med.* 2012, 18: 575–576.

32. **Chen J.X., Krane M., Deutsch M.A., Wang L., Rav-Acha M., Gregoire S., Engels M.C., Rajarajan K., Karra R., Abel E.D., Wu J.C., Milan D., Wu S.M.** Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res.* 2012, 111: 50–55.
33. **Srivastava D., Ieda M.** Critical factors for cardiac reprogramming. *Circ Res.* 2012, 111: 5–8.
34. **Wang L., Liu Z., Yin C., Asfour H., Chen O., Li Y., Bursac N., Liu J., Qian L.** Stoichiometry of Gata4, Mef2c, and Tbx5 influences the efficiency and quality of induced cardiac myocyte reprogramming. *Circ Res.* 2015, 116(2): 237–44.
35. **Ifkovits J.L., Addis R.C., Epstein J.A., Gearhart J.D.** Inhibition of TGF β signaling increases direct conversion of fibroblasts to induced cardiomyocytes. *PLoS One.* 2014, 9: e89678.
36. **Kim T.K., Sul J.Y., Peterenko N.B., Lee J.H., Lee M., Patel V.V., Kim J., Eberwine J.H.** Transcriptome transfer provides a model for understanding the phenotype of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011, 108: 11918–11923.
37. **Jayawardena T.M., Egemnazarov B., Finch E.A., Zhang L., Payne J.A., Pandya K., Zhang Z., Rosenberg P., Mirotsov M., Dzau V.J.** MicroRNA-mediated *in vitro* and *in vivo* direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res.* 2012, 110: 1465–1473.
38. **Zhao Y., Ransom J.F., Li A., Vedantham V., von Drehle M., Muth A.N., Tsuchihashi T., McManus M.T., Schwartz R.J., Srivastava D.** Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell.* 2007, 129: 303–317.
39. **Fu J.D., Rushing S.N., Lieu D.K., Chan C.W., Kong C.W., Geng L., Wilson K.D., Chiamvimonvat N., Boheler K.R., Wu J.C., Keller G., Hajjar R.J., Li R.A.** Distinct roles of microRNA-1 and -499 in ventricular specification and functional maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One.* 2011, 6: 27417.
40. **Efe J.A., Hilcove S., Kim J., Zhou H., Ouyang K., Wang G., Chen J., Ding S.** Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol.* 2011, 13: 215–222.
41. **Halfon S., Abramov N., Grinblat B., Ginis I.** Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem cells and development.* 2010, 20(1): 53–66.
42. **Malik N., Rao M.S.** A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol Biol.* 2013, 997: 23–33.
43. **He J.Q., Ma Y., Leev, Thomson J.A., Kamp T.J.** Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res.* 2003, 93: 32–39.
44. **Zhang J., Klos M., Wilson G.F., Herman A.M., Lian X., Raval K.K., Barron M.R., Hou L., Soerens A.G., Yu J., Palecek S.P., Lyons G.E., Thomson J.A., Herron T.J., Jalife J., Kamp T.J.** Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ Res.* 2012, 111: 1125–1136.
45. **Kamakura T., Makiyama T., Sasaki K., Yoshida Y., Wuriyanghai Y., Chen J., Hattori T, Ohno S., Kita T., Horie M., Yamanaka S., Kimura T.** Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture. *Circ J.* 2013, 77: 1307–1314.
46. **Hartman M.E., Dai D.F., Laflamme M.A.** Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for *in vitro* modeling and cell-based cardiac repair. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2016, 96: 3–17.
47. **Zhu W.Z., Xie Y., Moyes K.W., Gold J.D., Askari B., Laflamme M.A.** Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2010, 107: 776–786.
48. **Polo J.M., Liu S., Figueroa M.E., Kulalert W., Eminli S., Tan K.Y., Apostolou E., Stadtfeld M., Li Y., Shioda T., Natesan S., Wagers A.J., Melnick A., Evans T., Hochedlinger K.** Cell type of

origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2010, 28: 848–855.

49. **Mummery C., Ward-van Oostwaard D., Doevendans P., Spijker R., van den Brink S., Hassink R., van der Heyden M., Opthof T., Pera M., de la Riviere A.B., Passier R., Tertoolen L.** Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation.* 2003, 107: 2733–2740.

50. **Lundy S.D., Zhu W.Z., Regnier M., Laflamme M.A.** Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013, 22: 1991–2002.

51. **Bedada F.B., Chan S.S., Metzger S.K., Zhang L., Zhang J., Garry D.J., Kamp T.J., Kyba M., Metzger J.M.** Acquisition of a quantitative, stoichiometrically conserved ratiometric marker of maturation status in stem cell-derived cardiac myocytes. *Stem Cell Rep.* 2014, 3: 594–605.

52. **Moretti A., Bellin M., Welling A., Jung C.B., Lam J.T., Bott-Flugel L., Dorn T., Goedel A., Hohnke C., Hofmann F., Seyfarth M., Sinnecker D., Schomig A., Laugwitz K.L.** Patient specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2010, 363: 1397–1409.

53. **Yang X., Rodriguez M., Pabon L., Fischer K.A., Reinecke H., Regnier M., Sniadecki N.J., Ruohola-Baker H., Murry C.E.** Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2014, 72: 296–304.

54. **Lieu D.K., Liu J., Siu C.W., McNerney G.P., Tse H.F., Abu-Khalil A., Huser T., Li R.A.** Absence of transverse tubules contributes to non-uniform Ca(2+) wavefronts in mouse and human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells Dev.* 2009, 18: 1493–1500.

55. **Lee Y.K., Ng K.M., Lai W.H., Chan Y.C., Lau Y.M., Lian Q., Tse H.F., Siu C.W.** Calcium homeostasis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Rev.* 2011, 7: 976–986.

56. **Zhang D., Shadrin I.Y., Lam J., Xian H.Q., Snodgrass H.R., Bursac N.** Tissue-engineered cardiac patch for advanced functional maturation of human ESC-derived cardiomyocytes. *Biomaterials.* 2013, 34: 5813–5820.

57. **Shiba Y., Fernandes S., Zhu W.Z., Filice D., Muskheli V., Kim J., Palpant N.J., Gantz J., Moyes K.W., Reinecke H., Van Biber B., Dardas T., Mignone J.L., Izawa A., Hanna R., Viswanathan M., Gold J.D., Kotlikoff M.I., Sarvazyan N., Kay M.W., Murry C.E., Laflamme M.A.** Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature.* 2012, 489: 322–325.

58. **Parker T.G., Packer S.E., Schneider M.D.** Peptide growth factors can provoke “fetal” contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1990, 85: 507–514.

59. **Sasse S., Brand N.J., Kyprianou P., Dhoot G.K., Wade R., Arai M., Periasamy M., Yacoub M.H., Barton P.J.** Troponin I gene expression during human cardiac development and in endstage heart failure. *Circ Res.* 1993, 72: 932–938.

60. **Razeghi P., Young M.E., Alcorn J.L., Moravec C.S., Frazier O.H., Taegtmeier H.** Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation.* 2001, 104: 2923–2931.

61. **Eppenberger-Eberhardt M., Flamme I., Kurer V., Eppenberger H.M.** Reexpression of α -smooth muscle actin isoform in cultured adult rat cardiomyocytes. *Dev Biol.* 1990, 139: 269–278.

62. **Schaub M.C., Hefti M.A., Harder B.A., Eppenberger H.M.** Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med.* 1997, 75: 901–920.

63. **Bedada F.B., Wheelwright M., Metzger J.M.** Maturation status of sarcomere structure and function in human iPSC-derived cardiac myocyte. *Biochim Biophys Acta.* 2015, Nov 11.

64. **Chan Y.C., Ting S., Lee Y.K., Ng K.M., Zhang J., Chen Z., Siu C.W., Oh S.K., Tse H.F.** Electrical stimulation promotes maturation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013, 6: 989–999.

65. Bhavsar, P.K., Dhoot, G.K., Cumming, D.V., Butler-Browne, G.S., Yacoub, M.H., Barton, P.J. Developmental expression of troponin I isoforms in fetal human heart. *FEBS Lett.* 1991, 292: 5–8.
66. Shi S., Wu X., Wang X., Hao W., Miao H., Zhen L., Nie S. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocyte-like cells is regulated by the combined low dose treatment of transforming growth factor β 1 and 5azacytidine. *Stem Cells Int.* 2016: 3816256.
67. Lian X., Zhang J., Azarin S.M., Zhu K., Hazeltine L.B., Bao X., Hsiao C., Kamp T.J., Palecek S.P. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc.* 2013, 8: 162–175.
68. Tang X.L., Rokosh G., Sanganalmath S.K., Yuan F., Sato H., Mu J., Dai S., Li C., Chen N., Peng Y., Dawn B., Hunt G., Leri A., Kajstura J., Tiwari S., Shirk G., Anversa P., Bolli R. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation.* 2010, 121: 293–305.
69. Qian L., Huang Y., Spencer C.I., Foley A., Vedantham V., Liu L., Conway S.J., Fu J.D., Srivastava D. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature.* 2012, 485: 593–598.

**МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ
ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ И ХРЯЩЕВОЙ ТКАНЕЙ
(ОПЫТ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН)**

С.А.Александрова¹, Ю.А.Нащекина^{1,2}, Н.В.Цупкина¹

¹ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург, alekssvet2205@gmail.com,

²ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

В статье изложен краткий обзор методологических подходов к созданию тканеинженерных конструкций для восстановления дефектов костной и хрящевой тканей, разрабатываемых сотрудниками Института цитологии РАН. Определены условия, необходимые для адгезии и роста мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга кролика на матриксах различной природы (коллаген I типа, деминерализованный костный матрикс, поли(L,L)-лактид, биоситалл), оработаны способы совмещения клеток и трехмерных носителей, проведены испытания полученных тканеинженерных конструкций на лабораторных животных, показавшие возможность их применения в клинике.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга, остеогенная и хондрогенная дифференцировка, коллаген I типа, деминерализованный костный матрикс, биоситалл, поли(L,L)-лактид, тканеинженерные конструкции.

Актуальной проблемой современной травматологии и ортопедии является создание имплантатов из биоматериалов, которые бы в наибольшей степени отвечали физиологическим и биомеханическим требованиям для замещения отдельных сегментов опорно-двигательного аппарата и обеспечивали их надежную фиксацию в дефектах костной и хрящевой тканей. В хирургии костно-суставной системы применяются биodeградируемые и небиodeградируемые имплантаты. Биodeградируемые имплантаты, вошедшие в практику, изготавливаются на основе соединений гидроксиапатита, коллагена, деминерализованного костного матрикса, полимеров и др. При изготовлении небиodeградируемых имплантатов используются титан и его сплавы, стеклокерамика, композиционный углерод и др. Согласно определению международной организации по стандартизации ISO (ISO/TR 9966) и принятым в РФ ГОСТом «Р51148-98» под биоматериалами подразумевают «нежизнеспособный материал, предназначенный для контакта с живой тканью для выполнения функций медицинского назначения». Желательно, чтобы материал имплантата был биосовместимым, что подразумевает такие его свойства, как биоинертность, износостойчивость, антикоррозийность, нетоксичность и неонкогенность (1). Наряду с биомеханическими характеристиками имплантаты не должны способствовать развитию инфекций, неконтролируемому росту клеток и не вызывать иммунологические реакции отторжения (2, 3). С целью оптимизации химического состава поверхности материалов в настоящее время разрабатываются различные органические и неорганические покрытия, способствующие интеграции имплантатов (4). Для улучшения интеграции в костную ткань имплантат может быть покрыт материалами, обладающими остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами (5, 6). Также поверхности имплантатов модифицируются различными веществами, улучшающими клеточную пролиферацию, хемотаксис и ангиогенез (костный морфогенетический белок, фактор роста тромбоцитов, трансформирующий фактор роста β , инсулиноподобный фактор роста-1, фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов и др.) (7).

Перспективным направлением в развитии восстановительной хирургии костной и хрящевой тканей следует считать получение экспериментального обоснования возможности использования различных замещающих материалов для последующего клинического внедрения. Для этого необходимо проведение исследований в условиях *in vitro* по изучению взаимодействия между клетками и материалом, чтобы выявить: токсичность материалов,

влияние на морфологию и основные характеристики жизнеспособности клеток (способность к адгезии, пролиферации, сохранению свойств, присущих клеткам ткани, куда будет помещен имплантат и пр.). Важным моментом является исследование процессов дифференцировки стволовых клеток в присутствии данного материала. В литературе имеются сообщения об эффективном использовании клеточных технологий при восстановлении некоторых патологий костной и других тканей организма человека (8,9). Известно, что опухолевые, воспалительные и посттравматические изменения тканей приводят к повреждениям разного рода, что вызывает необходимость в подборе и использовании в определенном сочетании клеточного компонента и компонента материала. В настоящее время алгоритмов подбора материалов для использования в качестве имплантатов для разных патологий не существует.

Более 10 лет назад в Отделе клеточных культур Института цитологии РАН под руководством проф. Г.П. Пинаева началась разработка методологических подходов создания тканеинженерных конструкций (ТИК) для восстановления дефектов костной и хрящевой тканей с использованием мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга кролика. Показана способность ММСК к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях (10). На сегодняшний день принято, что основными функциями ММСК являются: формирование ниши, в которой располагаются гемопоэтические стволовые клетки; участие в процессе естественного тканевого обновления и регенерации при повреждении разных органов и тканей; создание микроокружения, способствующего репарации поврежденных тканей (11). Эксперименты проводились на недифференцированных и индуцированных в остеогенном и хондрогенном направлениях ММСК, заселенных на различные матриксы (коллаген I типа, деминерализованный костный матрикс, биоситалл, поли(L,L)-лактид).

Оптимальная адгезия культивируемых клеток к поверхности носителя – важнейшее условие реализации биологического действия ТИК. Адекватное совмещение клеток и матрикса должно рассматриваться как ключевой, критический момент в создании ТИК. Однако высокие требования, предъявляемые к материалам, проходящим доклиническую апробацию, определяют необходимость использования агрессивных методов их обработки. Часто материал, теоретически оптимальный для заселения его клетками и поддержания их в функционально активном состоянии, в процессе обработки теряет ряд своих положительных свойств, в том числе адгезионные. Целью начатых в Отделе клеточных культур

экспериментов была разработана оптимальных способов заселения трехмерных матриц культивируемыми клетками, обладающими потенциалом к восстановлению костной и хрящевой тканей. Одним из фундаментальных направлений этих разработок является изучение взаимодействия стромальных клеток с белками внеклеточного матрикса (ВКМ) (12). В рамках исследований для целей регенеративной медицины особенно актуально изучение белков ВКМ в качестве модификаторов поверхности материалов, используемых для имплантатов.

В первых работах по репаративному остеогенезу была отработана методика получения ММСК из костного мозга подвздошных костей кролика и доказана их способность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях (13-17). Введенная в составе коллагенового геля суспензия аутогенных ММСК, направленных в остеогенную дифференцировку, в костную рану теменных костей кролика, вызывала увеличение доли костной ткани в составе регенерата до 30% по сравнению с контролем через 120 сут (18, 19). Полученные результаты оказались чрезвычайно важны, поскольку известно, что кости черепа животных обладают крайне низким потенциалом к репаративному остеогенезу, а у человека регенерация костной ткани в зоне перелома или дефекта костей черепа вообще не происходит. Следовательно, пересаженная культура ММСК обладала отчетливым индуцирующим и оптимизирующим влиянием на течение остеорепаративных процессов даже там, где посттравматический остеогенез в обычных условиях отсутствует.

Изучение взаимодействия остеогенных клеток различного происхождения и резорбируемого стеклокристаллического материала биоситалла силикоалюмофосфатной группы (ООО ПК "ЭЛКОР", Санкт-Петербург) позволило выявить увеличение удельной активности щелочной фосфатазы в клетках, инкубировавшихся в непосредственном контакте с материалом (20). В экспериментах на кроликах, которым в область дефекта теменных костей помещали гранулы биоситалла с мобилизованными на поверхности аутогенными ММСК, было наглядно продемонстрировано, что процесс полного восстановления целостности кости происходит быстрее, чем при использовании тех же клеток в коллагеновом геле (21). Кроме того, костный регенерат, сформированный в результате трансплантации клеток, нанесенных на гранулы биоситалла, отличался большей прочностью, поскольку в этом случае в структуру костной ткани были инкрустированы гранулы, достаточно плотно охваченные костными трабекулами.

Далее были проведены исследования по разработке ТИК на основе биodeградируемого деминерализованного костного матрикса (ДКМ) (полученного из Института травматологии и ортопедии им Р. Вредена) и ММСК костного мозга кролика. ДКМ является перспективным материалом для использования в тканевой инженерии дефектов кости, так как он нетоксичен для клеток, медленно резорбируется в организме (скорость резорбции приблизительно соответствует скорости остеогенеза) и обладает необходимыми физико-механическими характеристиками. Тем не менее, ДКМ не обладает достаточными адгезионными свойствами для культивируемых клеток - предобработка агрессивными веществами, необходимая для избавления от клеточного материала, приводит к тому, что ДКМ теряет ряд своих положительных свойств, в том числе, адгезионные. В экспериментах было показано, что оптимальный способ заселения трехмерного ДКМ культивированными клетками, обладающими остеогенным потенциалом, заключается в предварительном внесении клеток в коллагеновый гель, а затем, до полимеризации геля, в пропитывании им ДКМ (22). Была проведена экспериментальная проверка с целью выявления возможности использования полученного ТИК в практической травматологии и ортопедии. На кроликах, которым в область тотального дефекта большеберцовой кости помещали ТИК, было установлено, что процессы регенерации на 30 сут опережают таковые в контрольной группе животных (23, 24).

В течение ряда лет в Институте цитологии активно проводятся исследования по разработке ТИК из биodeградируемого полимерного материала на основе молочной кислоты - поли(L,L-лактида) (25). На сегодняшний день отработан ряд методов формирования трехмерных полилактидных скаффолдов различной архитектуры. В рамках гранта РФФИ «Исследование формирования тканеподобных структур *in vitro* для регенеративной терапии и реконструктивной хирургии» с помощью метода выщелачивания были получены скаффолды, размер пор которых варьировал от 150 до 300 мкм, а с помощью метода лиофильной сушки - с размером пор до 100 мкм. Нетоксичность поли(L,L)-лактида для стромальных клеток, а также определенные физико-механические характеристики позволяют использовать этот материал для тканевой инженерии дефектов соединительных тканей (26). Однако гидрофобные свойства поверхности скаффолдов ограничивают прикрепление к ним клеток (27). Также в процессе исследований было выявлено, что немодифицированный полилактид обладает некоторой osteoиндуктивной способностью для ММСК костного мозга кролика (28). Модификации полилактидных поверхностей коллагеном I типа или фибрином привели к

увеличению гидрофильности материала и усилению его остеоиндуктивных свойств (28, 29). В последних экспериментах, в которых изучалось влияние модификации полилактида глицерофосфатом кальция на остеогенную дифференцировку ММСК костного мозга кролика, было обнаружено, что клетки, инкубировавшиеся на модифицированных полилактидных пленках, более высокими темпами нарабатывали кристаллы кальция по сравнению с клетками, инкубировавшимися на необработанной поверхности полилактида, и контролем – культуральным пластиком (неопубликованные данные).

В 2015 г. совместно с сотрудниками Отделения фтизиоостеологии и ортопедии ФГБУ «Санкт-петербургский НИИ фтизиопульмонологии» (СПб НИИФ) начаты исследования по выбору оптимального остеозамещающего материала для пластики операционных дефектов в радикально- и реконструктивно-восстановительной хирургии туберкулеза костей и суставов. Работы проводятся в рамках государственного задания «Доклиническое исследование биомедицинских клеточных продуктов и наноструктурированных материалов для профилактики и лечения туберкулеза». Актуальность исследований обоснована необходимостью поиска и разработки новых методов пластической восстановительной хирургии костно-суставного туберкулеза. Опыт по использованию в СПб НИИФ ряда коммерческих остеозамещающих материалов для пластики дефектов кости выявил необходимость дополнительной стимуляции регенерации костной ткани при лечении туберкулезных оститов (30-32). На данный момент проведено сравнительное изучение токсичности и биосовместимости четырех остеозамещающих материалов: «Биосит Ср-Элкор» (ООО ПК «Элкор», Россия), OSTEOSET-T («Wright Medical Technology», USA), Orthoss («Geistlich», Germany), ЛитАр (ЗАО «ЛитАр», Самара, Россия) в условиях *in vitro* на постоянной линии клеток остеосаркомы человека HOS (TE 85, CLONE F5), ММСК костного мозга новорожденного кролика и остеоцитах, полученных из ММСК методом индукции. Морфологию клеток и их распластывание на поверхности материалов исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии на разных сроках инкубации. Проводили также прижизненные наблюдения за морфологией клеток, культивируемых в присутствии материалов в течение 7 сут. Токсичность материалов для клеток анализировали с помощью МТТ-теста. Исследовали влияние остеозамещающих материалов на пролиферативную активность клеток. Было показано, что материалы различались по токсичности и

адгезивности. Наиболее адгезивными и наименее токсичными для клеток оказались материалы «Биосит СР-Элкор» и Orthoss (неопубликованные данные).

Несмотря на то, что первые клеточные технологии для хондропластики стали применяться в лечебной практике с 1987 г., до сих пор не решены проблемы, связанные с высокой травматичностью используемых методов для пациента и неполным восстановлением хрящевой ткани (в частности, формированием волокнистого хряща вместо гиалинового). Работы, которые проводятся в настоящее время, касаются как подбора биodeградируемого материала со свойствами высоко организованного плотного межклеточного матрикса хряща, так и выявления подходящего типа клеток и способа введения клеток в матрикс (33). При участии сотрудников Научно-исследовательского детского ортопедического института имени Г.И.Турнера проводились испытания ТИК хрящевой ткани, состоящей из аллогенных ММСК костного мозга кролика в коллагеновом геле высокой плотности. После трансплантации ТИК в дефект зоны роста большеберцовой кости кролика через 8 недель на рентгенограммах было обнаружено развитие деформаций костей кроликов, а гистохимический анализ выявил наличие зон роста столбчатых клеток, вырабатывающих коллаген II типа и протеогликаны. На основании полученных данных были сделаны выводы о необходимости трансплантировать недифференцированные ММСК, подобрав другую матрицу-носитель, так как гель коллагена очень быстро подвергался деградации (34, 35).

В настоящее время проводятся исследования по разработке условий заселения и культивирования хондроцитов кролика на полилактидных трехмерных скаффолдах. В рамках проекта были получены диплоидные культуры хондрогенных клеток из фрагментов суставного хряща новорожденного кролика. Проведен сравнительный анализ разных вариантов предобработки полилактидных скаффолдов для последующего заселения и культивирования на них культуры клеток хряща. Наличие жизнеспособных клеток оценивали с помощью методов прижизненной микроскопии и МТТ-тестирования. В результате экспериментов было обнаружено, что предобработка ростовой средой и нанесение клеток на скаффолд в составе коллагенового геля – это наиболее оптимальные условия культивирования хондроцитов кролика в составе ТИК, так как все помещенные на материал клетки остаются заключенными в гель и сохраняют жизнеспособность (36).

Таким образом, наш опыт показывает, что методологические подходы, используемые в Отделе клеточных культур Института цитологии РАН при получении ТИК, являются

перспективными, а многообещающие результаты могут стать фундаментальной основой разработки ТИК для регенеративной медицины.

Выражаем благодарность ведущим сотрудникам СПб НИИФ А.А. Вишневному и М.С. Сердобинцеву за помощь в обсуждении результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00068).

Список литературы

1. **Учебное пособие** «Биосовместимые материалы». Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М., изд-во «МИА», 2011. 560 с.
2. **Лысенко Л.Н.** Биоматериаловедение: вклад в прогресс современных медицинских технологий. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2005, (2): 56-61.
3. **Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E.** Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. San Diego, California, Elsevier Inc., 2004. 851 p.
4. **Корж Н.А., Кладченко Л.А., Малышкина С.В.** Имплантационные материалы и остеогенез. Роль оптимизации и стимуляции в реконструкции кости. Ортопедия, травматология и протезирование. 2008, (4): 5-14.
5. **Калита В.И., Маланин Д.А., Мамаева В.А., Мамаев А.И., Комлев Д.А., Деревянко И.В., Новочадов В.В., Ланцов Ю.А., Сучилин И.А.** Модификация поверхностей внутрикостных имплантатов: современные исследования и нанотехнологии. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2009, (4): 32.
6. **Nuss K.M.R, von Rechenberg B.** Biocompatibility issues with modern implants in bone a review for clinical orthopedics. Open Orthop. J. 2008, (2): 66-78.
7. **Вишне夫斯基 А.А., Казбанов В.В., Баталов М.С.** Титановые импланты в вертебрологии: перспективные направления. Хирургия позвоночника. 2015, (4): 49-55.
8. **Martino S., D'Angelo F., Armentano I., Kenny J.M., Orlicchio A.** Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. Biotechnology Advances. 2012, 30(1): 338-351.
9. **García-Gareta E., Coathupb M.J., Blunnet G.W.** Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. Bone. 2015, 81: 112-121.
10. **Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M.** Clarification of the nomenclature for MSC: International Society for cellular therapy position statement. Cytotherapy. 2005, 7(5): 393-395.
11. **Prockop D.J., Kota D.J., Bazhanov N., Reger R.L.** Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). J. Cell. Mol. Med. 2010, 14(9): 2190-2199.
12. **Воронкина И.В., Калмыкова Н.В., Петров Ю.П., Пинаев Г.П., Цупкина Н.В., Черепанова О.А.** Взаимодействие клеток с белками внеклеточного матрикса при формировании двухфазной полимерной системы. Цитология. 2002, 44(12):1187-1193.
13. **Николаенко Н.С., Цупкина Н.В., Пинаев Г.П., Гололобов В.Г., Иванов Д.Е., Деев Р.В.** Авторское свидетельство: «Способ получения культуры остеогенных клеток кролика *in vitro*». Сборник рационализаторских предложений и изобретений ВМедА, Санкт-Петербург, 2003.
14. **Николаенко Н.С., Цупкина Н.В., Пинаев Г.П., Дулаев А.К., Гололобов В.Г., Деев Р.В.** Выделение и культивирование стромальных клеток костного мозга с целью их дальнейшего использования в лечении дефектов костной ткани. Трансплантология. 2003, 4(1): 169-171.

15. Дулаев А.К., Гололобов В.Г., Деев Р.В., Иванов Д.Е., Николаенко Н.С., Цупкина Н.В., Пинаев Г.П. Остеогенные клетки и их использование в клинической практике. Мед. академ. журн. 2003, 3(3): 55-61.
16. Деев Р.В., Николаенко Н.С., Цупкина Н.В., Гололобов В.Г., Патокин И.Л., Пинаев Г.П. Формирование и морфофункциональная характеристика остеобластического фенотипа в клеточных культурах *in vitro*. Цитология. 2004, 46(3): 185-190.
17. Гололобов В.Г., Деев Р.В., Николаенко Н.С., Цупкина Н.В., Пинаев Г.П. Характеристика культуры пластинчатой костной ткани *in vitro*. Морфология. 2004, 125(2): 64-68.
18. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Гололобов В.Г., Николаенко Н.С., Иванов Д.Е., Дулаев А.К., Пинаев Г.П. Влияние трансплантации кроликам с дефектом теменной кости культивированных аутогенных стромальных клеток костного мозга на репаративную регенерацию теменной кости. Цитология. 2008, 50(4): 193-301.
19. Деев Р.В., Гололобов В.Г., Дулаев А.К., Николаенко Н.С., Цупкина Н.В., Пинаев Г.П. Оптимизация репаративного остеогенеза при трансплантации культуры стромальных клеток костного мозга. Ученые записки СПб Гос. Мед. университета им. акад. И.П.Павлова. 2004, 11(4): 44-46.
20. Николаенко Н.С., Цупкина Н.В., Деев Р.В., Патокин И.Л., Лысенко Л.Н., Орлов В.П., Гололобов В.Г., Пинаев Г.П. Культивирование остеогенных клеток различного происхождения на биоситаллах силикоалюмофосфатной группы с целью создания остеозамещающих имплантатов. Информационный бюллетень «Клеточные культуры» СПб, изд-во Политехн. Ун-та, 2004, 19: 10-16.
21. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П. Использование стромальных клеток костного мозга, мобилизованных на гранулах биоситалла, для пластики костей мозгового черепа. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007, 11(2): 62-67.
22. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Бозо И.Я., Калигин М.С., Гребнев А.Р., Исаев А.А., Пинаев Г.П. Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011, 6(1): 62-67.
23. Бозо И.Я., Деев Р.В., Цупкина Н.В., Гребнев А.Р., Пинаев Г.П. Экспериментальное обоснование использования тканеинженерного эквивалента для устранения дефектов длинных трубчатых костей. Сб. научн. трудов «Вопросы морфологии XXI века», 2010, 2: 62-65.
24. Деев Р.В., Тихилов Р.М., Цупкина Н.В., Бозо И.Я., Гребнев А.Р., Пинаев Г.П. Способ совмещения культивированных остеогенных клеток и трехмерного материала-носителя. Патент РФ на изобретение № 2414916 от 27.03.2011.
25. Нащекина Ю.А., Юдинцева Н.М., Никонов П.О., Каширова А.О., Иванова Е.А., Смагина Л.В., Шевцов М.А., Александрова С.А., Воронкина И.В., Блинова М.И. Тканеинженерные конструкции на основе полилактидных скаффолдов и клеток для регенеративной хирургии костной ткани. Материалы 2-го Национального конгресса по регенеративной медицине. М., «МЕДИ Экспо», 2015: 120.
26. van Sliedregt A., Radder A.M., de Groot K., van Blitterswijk C.A. In vitro biocompatibility testing of polylactides. Part I: proliferation of different cell types. Mater Sci: Mater Med, 1992; (3): 365-370.
27. Нащекина Ю.А., Никонов П.О., Михайлов В.М., Пинаев Г. П. Зависимость заполнения стромальными клетками костного мозга трёхмерной матрицы от способа посева клеток и типа модификации поверхности матрицы. Цитология. 2014, 56(4): 283–290.
28. Александрова С.А., Никонов П.О., Нащекина Ю.А. Остеогенная дифференцировка стромальных клеток на полилактидных матрицах. Материалы 2-го Национального конгресса по регенеративной медицине. М., «МЕДИ Экспо», 2015:16.

- 29. Александрова С.А., Никонов П.О., Нащекина Ю.А.** Характеристика остеоиндуктивных свойств полилактидных матриц. Сборник статей VI-го Международной научно-практической конференции «Физиология и медицина. Исследования, высокие технологии, стартапы». СПб, изд-во Политехн. ун-та, 2014: 199-201.
- 30. Кафтырев А.С., Сердобинцев М.С., Линник С.А., Марковиченко Р.В.** Биоситалл в хирургии туберкулеза костей и суставов. Травматология и ортопедия России. 2010, (1): 28-32.
- 31. Сердобинцев М.С., Кафтырев А.С., Бердес А.И., Луцкая О.Л.** Пластика дефектов кости остеозамещающими материалами в хирургии туберкулезного коксита (клинико-экспериментальное исследование). Медицинский альянс. 2014, (1): 31-36.
- 32. Сердобинцев М. С., Лобач В. Ю., Кафтырев А. С., Виноградова Т. И., Заболотных Н. В., Витовская М. Л., Луцкая О. Л., Искровский С. В.** Экспериментальное обоснование применения ксенотрансплантата Orthoss в хирургии костно-суставного туберкулеза. Туберкулез и болезни легких. 2015, (6): 135.
- 33. Николаенко Н.С.** Восстановление хрящевой ткани с помощью клеточных технологий. В сб. «Клеточные технологии для регенеративной медицины» (под ред. Г.П.Пинаева, М.С.Богдановой, А.М.Кольцовой). – СПб, изд-во Политехн. ун-та, 2011: 162-178.
- 34. Сахенберг Е.И., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П.** Разработка клеточного продукта с использованием стромальных клеток костного мозга для восстановления хряща в зоне роста. Материалы докладов III Всероссийской научной школы-конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина», Москва. 2010: 66-67.
- 35. Сахенберг Е.И., Быстрова О.А., Николаенко Н.С., Красногорский И.Н., Гаркавенко Ю.Е., Пинаев Г.П.** Сравнительное исследование влияния недифференцированных и дифференцированных в хондрогенном направлении стромальных клеток костного мозга на поврежденный ростковый хрящ в эксперименте. Материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». Уфа. 2012: 194-195.
- 36. Копелев П.В., Александрова С.А., Никонов П.О., Нащекина Ю.А.** Использование полилактидных матриц для культивирования клеток хряща. Сборник трудов Всерос. науч.-практ. конф. «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии». Иркутск, изд-во ИРНТУ, 2015: 220-228.

РОЛЬ ЛИЗОФОСФАТИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ НОРМАЛЬНЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Д.Е. Бобков

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; *bobkovde@yandex.ru*

В обзоре представлены результаты исследований роли лизофосфатидиловой кислоты в регуляции нормальных и патологических процессов. Лизофосфатидиловая кислота (LPA) представляет собой фосфолипидный медиатор и играет важную роль в процессах воспаления

и заживления ран, что обусловлено её способностью регулировать различные клеточные функции, такие как миграция, пролиферация и дифференцировка. LPA действует на клетки как аутокринная или паракринная сигнальная молекула. Молекулы LPA взаимодействуют на поверхности клеток со специфическими G-белок связанными рецепторами, в результате чего активируется ряд внутриклеточных сигнальных каскадов, основным из которых является сигнальный путь Rho. Также LPA принимает участие в патогенезе ряда заболеваний, таких как атеросклероз, фиброз, респираторные расстройства и рак.

Ключевые слова: лизофосфатидиловая кислота, аутоаксин, сигнальный путь Rho, канцерогенез.

Лизофосфолипиды являются производными мембранных фосфолипидов, которые синтезируются как в результате нормального липидного метаболизма, так и в ходе активации клеток под действием различных стимулов. Особый интерес вызывает LPA, которая выполняет роль вторичного посредника и участвует в разнообразных клеточных процессах, возникающих в ответ на широкий спектр стимулов [1]. В организме млекопитающих LPA представлена смесью насыщенных (16:0, 18:0) и ненасыщенных (16:1, 18:1, 18:2, 20:4) изомеров, которые обнаруживаются в различных биологических жидкостях [2]. Наиболее подробно охарактеризованным источником LPA в организме человека является сыворотка крови, где концентрация LPA составляет 1-5 μM , а доли основных изомеров оцениваются как 18:2 (30%), 20:4 (39%) и 18:1 (9%). Поскольку суммарная концентрация LPA в свежей плазме крови здорового человека значительно меньше, чем в сыворотке, то считается, что в сыворотке LPA появляется в результате свёртывания крови, в частности, источником LPA в сыворотке являются тромбоциты [3]. Однако LPA не присутствует в тромбоцитах в готовом виде, а является продуктом ферментативного гидролиза мембранных фосфолипидов при помощи различных фосфолипаз. Основным предшественником LPA считается лизофосфатидилхолин, который присутствует в крови в достаточно высокой концентрации (~190 μM), в основном в связанной с альбумином или липопротеинами форме. При этом было показано, что диета непосредственно влияет на концентрацию в крови лизофосфатидилхолина, но не влияет на уровень LPA, что может говорить либо о высокой скорости обмена LPA, либо о наличии других путей её синтеза [4]. Другим предшественником LPA может быть фосфатидная кислота, которая в незначительных количествах присутствует

во всех клеточных мембранах [5]. Предполагается, что гидролиз фосфатидной кислоты может осуществляться в плазматической мембране или в цитоплазме клеток при помощи фосфолипаз A_1 и A_2 , а внутриклеточная LPA может секретироваться. Однако прямые доказательства секреции LPA какими-либо типами клеток *in vivo* на сегодня отсутствуют [6]. Наиболее подробно охарактеризовано образование LPA в ходе отщепления от лизофосфатидилхолина холиновой группы при помощи фосфолипазы D (ENPP2), иначе называемой аутоаксином (ATX). ATX может находиться как в мембранно-связанном состоянии, так и в растворённой форме в плазме крови [7].

В норме LPA – это фактор выживания клеток, который поддерживает их нормальную пролиферацию, жизнеспособность, синтез факторов роста. Выделение LPA в очагах воспаления стимулирует фибробласты к выполнению их функций, связанных с заживлением ран и ангиогенезом. LPA взаимодействует на поверхности клеток с семейством G-белок связанных трансмембранных рецепторов (LPARs), которые активируют широкий спектр внутриклеточных сигнальных каскадов. Одним из основных белков, активируемых при действии LPA, является малая ГТФаза семейства Rho. Активация Rho пути вызывает реорганизацию актинового цитоскелета клеток [8]. В частности, было показано, что LPA-зависимая активация Rho пути в немышечных клетках приводит к сборке сократимых актомиозиновых филаментов стресс-фибрилл [9].

При анализе экспрессии генов в эмбриональных фибробластах мыши было обнаружено, что LPA индуцирует гены, вовлечённые в стимуляцию роста и реорганизацию цитоскелета, а также ряд генов, кодирующих секретлируемые факторы, включая хемокины, факторы роста, цитокины, проангиогенные и профиброзные факторы, компоненты системы активатора плазминогена и металлопротеиназы. Через 30 мин воздействия LPA активируются гены раннего ответа, включающие *Edn1* (эндотелин 1), *Fgf16*, *Nfkb1a* (ингибирующая субъединица NF- κ B) и несколько генов протеинкиназ (*Bmpr2k*, *Plk2*, *Tesk2*, *Pim1*). На более поздних сроках активируется набор LPA-специфичных генов, ассоциированных с цитоскелетом, особенно гены, кодирующие различные изоформы актина, палладин, винкулин, *Agp2/3*, кальпонины, Rho ГТФазу, Rho-киназу, миозин X и субъединицы интегринов [10].

В экспериментах на клеточных культурах было показано, что путь Rho/ROCK вовлечён в продукцию протеолитических ферментов, приводящих к LPA-индуцированной инвазии клеток рака яичника. LPA вызывает экспрессию матриксной металлопротеиназы MMP-9 в клетках

линий CAOV-3 и PA-1 [11]. Показано, что предобработка этих клеток ингибитором Rho/ROCK (Y-27632) значительно снижает в них LPA-индуцированную экспрессию протеолитических ферментов. Кроме того, Y-27632 снижает LPA-индуцированную активацию транскрипционного фактора NF-κB, что критично для экспрессии протеолитических ферментов и инвазии клеток. Таким образом, показан механизм, в котором LPA вызывает развитие рака яичников через координированную активацию сигнального пути Ras/Rho/ROCK/NF-κB и секрецию протеолитических ферментов. Тем не менее, несмотря на большое число данных, подтверждающих участие малых ГТФаз семейства Rho и Rho-киназ в регуляции актинового цитоскелета и их роль при онкогенной трансформации, конкретные молекулярные механизмы, вовлечённые в эти процессы, остаются неясными.

LPA активно вовлечена в патогенез различных заболеваний, таких как атеросклероз, респираторные расстройства и фиброзы [12]. Особую роль LPA играет в канцерогенезе, стимулируя развитие опухоли, инвазию и миграцию злокачественных клеток. Первые упоминания о LPA в связи с раковыми заболеваниями появились в начале 1990-х годов, когда было обнаружено, что LPA выявляется в биопсиях рака толстой кишки [13]. Синтезирующий LPA фермент аутоксин (ATX) был впервые описан, как «аутокринный фактор подвижности», секретлируемый клетками меланомы [14]. Было показано, что повышенный уровень ATX связан с выработкой резистентности к химио- и лучевой терапии. Дальнейшие исследования подтвердили роль ATX и LPA в осуществлении ключевых для развития рака функций, включая выживание и пролиферацию клеток, инвазию, миграцию и неоваскуляризацию. На клеточных культурах было показано, что внесение высоких концентраций LPA способно отменять ингибиторный эффект микроокружения, заключающийся в подавлении роста и усилении апоптоза раковых клеток. Выяснилось, что LPA способна стимулировать клеточную пролиферацию, поэтому нарушения в путях сигналинга LPA могут многочисленными способами приводить к гиперпролиферации, вызывать онкогенез и метастазирование [15]. В течение последнего десятилетия были накоплены данные, свидетельствующие о роли LPA в инициации и развитии некоторых видов рака, таких как рак яичника, молочной и щитовидной желёз, простаты, кишечника и меланомы. Повышенный уровень LPA в сыворотке крови был обнаружен у пациентов с множественной миеломой [16].

В настоящее время идёт разработка лекарственных препаратов, регулирующих уровень LPA. Ингибиторы ATX используются для терапии рака, ведётся поиск новых лекарств на

основе таких ингибиторов. Так, группа Бриндли установила, что подавление активности АТХ снижает рост первичных опухолей молочной железы (до 70 %) [17]. Кроме того, ими было показано, что блокирование АТХ предотвращает метастазирование опухолей. АТХ вырабатывается не самими клетками рака молочной железы, а преимущественно окружающей молочную железу жировой тканью. По мере того как опухоль растет и вызывает воспаление в железе, жировая ткань вырабатывает все больше АТХ, усугубляя проблему. Тем не менее, метод блокирования эффектов лизофосфатидиловой кислоты позволил на 80 % сократить рост опухолей молочной и щитовидной желез.

Оценка уровня LPA в крови может применяться в клинической практике как диагностический признак при выявлении опухолей, в частности, при ранней диагностике рака яичника. Показано, что рак яичника характеризуется достоверным повышением содержания в сыворотке крови LPA по сравнению с таковым у практически здоровых женщин. Максимальные показатели LPA отмечены у больных со II-й и III-й стадией заболевания. Повышенное содержание LPA является фактором, способствующим повышению пролиферации и персистенции злокачественных клеток яичника, что указывает на прогрессирование злокачественного процесса и связано с ухудшением прогноза [18, 19].

Таким образом, приведённые в обзоре результаты исследований различных регуляторных эффектов сигнальной молекулы LPA свидетельствуют об её важной роли не только в нормальной жизнедеятельности клеток, но и во многих патологических состояниях, в частности в онкогенезе. Результаты подобных исследований могут использоваться в ранней диагностике ряда онкологических заболеваний, в оценке риска опухолевой прогрессии, а также в прогнозировании исхода заболевания.

Список литературы

1. **Moolenaar W.H., Hla T.** SnapShot: bioactive lysophospholipids. *Cell* .2012, 148: 378–378.e.2.
2. **Aoki J., Inoue A., Okudaira S.** Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim. Biophys. Acta*.2008, 1781:513–518.
3. **Sano T., Baker D., Virag T., Wada A., Yatomi Y., Kobayashi T., Igarashi Y., Tigyi G.** Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 21197–21206.
4. **Block R.C., Duff R., Lawrence P., Kakinami L., Brenna J.T., Shearer G.C., Meednu N., Mousa S., Friedman A., Harris W.S., Larson M., Georas S.** The effects of EPA, DHA, and aspirin ingestion on plasma lysophospholipids and autotaxin. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2010, 82: 87–95.

5. **Wiesner P., Leid I.K., Boettcher A., Schmitz G., Liebisch G.** Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 2009, 50: 574–585.
6. **Sevastou I., Kaffe E., Mouratis M.-A., Aidinis V.** Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA2/LPC and ATX/LPA axes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2013, 1831(1): 42–60.
7. **Van Dijk M.C., Postma F., Hilkmann H., Jalink K., Van Blitterswijk W.J., Moolenaar W.H.** Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca²⁺ signaling pathways. *Curr. Biol.* 1998, 8: 386–392.
8. **Bishop A.L., Hall A.** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal.* 2000, 348(2): 241-255.
9. **Thumkeo D., Watanabe S., Narumiya S.** Physiological roles of rho and rho effectors in mammals. *European Journal of Cell Biology.* 2013, 92(10-11): 303–315.
10. **Stortelers C., Kerkhoven R., Moolenaar W. H.** Multiple actions of lysophosphatidic acid on fibroblasts revealed by transcriptional profiling. *BMC Genomics.* 2008, 9(387). doi:10.1186/1471-2164-9-387.
11. **Jeong K.J., Park S.Y., Cho K.H., Sohn J.S., Lee J., Kim Y.K., Lee H.Y.** The Rho/ROCK pathway for lysophosphatidic acid-induced proteolytic enzyme expression and ovarian cancer cell invasion. *Oncogene.* 2012, 31(39): 4279–4289.
12. **Schober A., Siess W.** Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *British Journal of Pharmacology.* 2012, 167(3): 465–482.
13. **Merchant T.E., Kasimos J.N., de Graaf P.W., Minsky B.D., Gierke L.W., Glonek T.** Phospholipid profiles of human colon cancer using ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Int. J. Colorectal Dis.* 1991, 6: 121–126.
14. **Stracke M.L., Arestad A., Levine M., Krutzsch H. C., Liotta L.A.** Autotaxin is an N-linked glycoprotein but the sugar moieties are not needed for its stimulation of cellular motility. *Melanoma Research.* 1995, 5(4): 203–209.
15. **Leblanc R., Peyruchaud O.** New insights into the autotaxin/LPA axis in cancer development and metastasis. *Experimental Cell Research.* 2015, 333, 2: 183–189.
16. **Sasagawa T., Okita M., Murakami J., Kato T., Watanabe A.** Abnormal serum lysophospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids.* 1999, 34: 17–21.
17. **Benesch M.G., Tang X., Maeda T., Ohhata A., Zhao Y.Y., Kok B.P., Dewald J., Hitt M., Curtis J.M., McMullen T.P., Brindley D.N.** Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice. *FASEB J.* 2014, 28: 2655–2666.
18. **Прохорова В.И., Лаппо С.В., Державец Л.А., Готько О.В., Шишло Л.М., Цырусъ Т.П., Шелкович С.Е., Анищенко А.Е.** Лизофосфатидиловая кислота в оценке степени риска опухолевой прогрессии у пациенток со злокачественными новообразованиями женских половых органов. *Онкологический журнал.* 2013, 7, 4 (28): 57-61
19. **Кидралиев Р.Р.** Клиническое значение лизофосфатидиловой кислоты в диагностике опухолей яичника. *Журнал Российского общества акушеров-гинекологов.* 2009, 3: 26-31.

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, ФИО 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) 297-44-20, 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

<p>Терюкова Н.П., Сахенберг Е.И., Иванов В.А., Снопов С.А. Сопоставление морфологических и функциональных свойств клональных линий монослойной гепатомы Зайдела с признаками стволовых и прогениторных клеток.....</p>	3
<p>Смирнова Т.Д., Смирнова С.С., Сивак К.В., Еропкина Е.М., Еропкин М.Ю. Клеточная линия человека ECV-304 как модель для изучения влияния антиоксидантных препаратов на пролиферацию и апоптоз клеток при инфицировании вирусом гриппа А и в присутствии бактериального липополисахарида.....</p>	14
<p>Турилова В.И., Яковлева Т.К. Функциональная активность ядрышкообразующих районов метафазных хромосом клеток линий множественной миеломы человека.....</p>	28
<p>Суетина И.А., Мезенцева М.В., Гущина Е.А., Лисицин Ф.А., Руссу Л.И. Лопатина О.А., Фирсова Е.Л., Тайсон Д.Ф., Джонсон М.Е., Хинг В., Остроумов С.А. Влияние наночастиц металлов на жизнеспособность и морфофункциональные характеристики культивируемых клеток человека и животных.....</p>	43
<p>Пашенко В.П. Опыт использования тканевых и клеточных культур в клинической практике.....</p>	53
<p>Семенова В.М., Егорова Д.М., Стайно Л.П. Возможности метода культивирования тканей в исследовании биологических свойств стволовых опухолевых клеток злокачественных глиом головного мозга</p>	62
<p>Бильдюг Н.Б. Проблема получения кардиомиоцитов с помощью методов дифференцировки.....</p>	82
<p>Александрова С.А., Нащекина Ю.А., Цупкина Н.В. Методологические подходы создания тканеинженерных конструкций для восстановления дефектов костной и хрящевой тканей (опыт Института цитологии РАН).....</p>	95
<p>Бобков Д.Е. Роль лизофосфатидиловой кислоты в регуляции нормальных и патологических процессов.....</p>	104
<p>Правила для авторов.....</p>	110