

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

ISSN 2077- 6055

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЮЛЛЕТЕНЬ

ВЫПУСК 33

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2017

Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 33.

Отв. ред. М.С. Богданова. - СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2017 – 81 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, 2017

© Составление. Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН, 2017

РЕКОНСТРУКЦИЯ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Н.М. Юдинцева¹, Ю.А. Нащекина¹, А.Н. Муравьев²

¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

²ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России

yudintceva@mail.ru

В данном обзоре освещены современные методы и подходы к реконструкции мочевого пузыря (МП) человека. В настоящее время существует единственная универсальная методика реконструкции МП – операция по его замещению фрагментами желудочно-кишечного тракта, которая часто приводит к различным тяжелым осложнениям. Показано, что интерстициальные стволовые клетки кишечника обладают пластичностью и способны к трансдифференцировке в клетки уротелия МП. Однако функционального восстановления уротелия при выполнении подобных операций не происходит, так как уровень трансдифференцировки стволовых клеток кишечника крайне незначителен. В связи с этим, большие надежды связаны с развитием и применением методов тканевой инженерии для восстановления или замещения поврежденных тканей МП. В последние годы были получены положительные результаты использования различных тканеинженерных конструкций, содержащих клетки, для реконструкции тканей МП у экспериментальных животных.

Ключевые слова: мочевого пузыря, скаффолд, стволовые клетки, тканевая инженерия, тканеинженерная конструкция.

Примерно 400 млн. людей по всему миру страдают от заболеваний мочевого пузыря (МП) (1). Наиболее тяжелый контингент составляют больные с так называемым малым МП.

Ригидность стенки МП или снижение ее растяжимости вследствие фиброза может быть вызвана целым рядом причин: интерстициальный цистит, нейрогенный МП, лучевой цистит, длительно нефункционирующий МП у больных, перенесших операции по отведению мочи и др. В настоящее время для реконструкции нефункционирующего МП, когда возможности консервативных методов исчерпаны, применяются операции по его замещению различными фрагментами желудочно-кишечного тракта. Подобные операции нередко связаны с различными инфекционными осложнениями, возникновением расстройств мочеиспускания, гематурией (наличие крови в моче сверх величин, составляющих физиологическую норму), метаболическими нарушениями, повышенной выработкой слизи, камнеобразованием и риском возникновения новообразований (2-5). В исследованиях *in vivo* на модели сингенных мышей линии С57BL было показано, что клетки эпителия слизистой кишечника обладают пластичностью и при аутопластике способны к трансдифференцировке в клетки МП. Однако ее уровень незначителен и функционального восстановления уротелия не происходит (6).

Учитывая эти проблемы, вот уже более 100 лет ученые пытаются найти альтернативные материалы для замещения МП. В 1917 г впервые опубликован опыт использования свободного тканевого лоскута при выполнении операций на МП (цистопластика). Для замещения МП у собаки использовали мышечную фасцию (7). С тех пор в качестве свободных лоскутов использовали множество других материалов в экспериментальных и клинических опытах, включая кожу, подслизистый слой мочевого пузыря, сальник, твердую мозговую оболочку, брюшину, плаценту, серозно-мышечные лоскуты и подслизистый слой тонкого кишечника (8-13). Для замещения МП пробовали использовать синтетические материалы, такие как, желатиновая и поливиниловая губки, тетрафлуорэтилен (тефлон), коллагеновые и викриловые скаффолды, покрытую смолой бумагу и силикон (14-19). Ни один из используемых вариантов не привел к положительным результатам из-за структурных, функциональных проблем, а также проблем, связанных с биологической совместимостью. Как правило, резервуар из синтетических материалов оказывался механически несостоятельным, отмечалось повышенное камнеобразование. Использование рассасывающихся материалов приводило к возникновению фиброза, рубцеванию, сморщиванию лоскута и, как следствие, уменьшению емкости МП. Очевидно, что найти подходящую замену ткани пузыря, обладающего уникальными свойствами, оказалось совсем не просто (20).

Возрастающий интерес к замещению и регенерации органов неизбежно приводит к развитию и внедрению в практику новых технологий. Применение в урологии методов регенеративной медицины и тканевой инженерии может способствовать улучшению результатов лечения многих патологических состояний (21). В последнее время сделан ряд успешных попыток по созданию тканеинженерных конструкций (ТИК) для реконструкции МП у лабораторных животных (22-26). Наибольших успехов в области реконструкции МП с использованием методов тканевой инженерии достиг А. Атала (27). В 1997 г им были выполнены удачные эксперименты на модели лабораторных животных по замещению МП конструкцией, сформированной с использованием полимерного скаффолда и клеток аутологичных тканей стенок пузыря (неоцистис). Животные были разделены на 3 группы. Животным из 1-й группы было выполнено полное удаление МП с последующим ушиванием без реконструкции (без использования фрагментов ЖКТ или ТИК). Во второй группе была выполнена реконструкция МП с использованием бесклеточного полимерного скаффолда. В третьей группе использовали неоцистис, приготовленный в условиях *in vitro*, который состоял из полимерной матрицы в форме пузыря, покрытой изнутри клетками уротелия, а снаружи – мышечными клетками. В эксперименте были использованы только аутологичные клетки МП животных. В результате у животных первой группы к концу периода наблюдения (11 мес.) сохранилось только 20 ± 2 % исходной емкости МП, а его комплаентность (свойство адаптации органа к увеличению объема мочи без резкого роста внутрипузырного давления) составила всего 10 ± 3 % от исходной. В случаях реконструкции пузыря бесклеточным полимерным скаффолдом емкость пузыря составила 46 ± 20 % от исходной, а комплаентность снизилась до 42 ± 21 %. В то время как у животных, получивших сформированный неоцистис, емкость МП составила 95 ± 9 % от предоперационных значений, а комплаентность – 106 ± 16 %. С помощью метода цистографии (предварительное наполнение МП газообразным или жидким контрастным веществом с последующей рентгенографией) также было показано выраженное уменьшение объема пузыря в 1-й группе, частичное сморщивание трансплантата во второй группе; МП нормальной формы и размеров наблюдали в третьей группе. Бесклеточный полимерный скаффолд полностью заместила соединительная ткань. У животных из третьей группы через 3 мес. после операции в неоцистисе определялись слои, характерные для нативных тканей МП: слизистая оболочка, состоящая из трех слоев – уротелия, собственной пластинки и подслизистой основы, а также формирующаяся мышечная оболочка. После 6

мес. наблюдения обнаружено прорастание нервной ткани в сформировавшиеся слои мышечной оболочки (27). Таким образом, в эксперименте было показано эффективное использование ТИК на основе полимерного скаффолда и аутологичных клеток для реконструкции МП.

После удачного опыта на экспериментальной модели А.Атала с соавт. предприняли попытку трансплантации сгенерированного *in vitro* МП человеку (28). Кандидатами на цистопластику стали 7 пациентов в возрасте 4-19 лет, обладающие пузырем повышенного давления или низкой комплаентности. При создании ТИК использовали аутологичные клетки, полученные из биоптатов стенки МП пациентов. В качестве скаффолда использовали три варианта материала: децеллюляризованный подслизистый слой МП, коллагеновый и композитный (смесь коллагена и полигликолиевой кислоты) скаффолды. В первых трех случаях пациентам выполняли реконструкцию МП с использованием ТИК на основе децеллюляризованного подслизистого слоя МП. Одному из пациентов пересаживали конструкцию, сформированную на основе коллагеновой матрицы. В остальных случаях использовали ТИК на основе композитных скаффолдов (смесь коллагена и полигликолиевой кислоты). Все варианты трансплантации выполняли с оментализацией (закрытие трансплантата жировой тканью сальника), которая способствовала более эффективной васкуляризации. Цистограммы, полученные с помощью метода цистографии, у всех пациентов через 3 недели после операции показали отсутствие затеков контрастного вещества, емкость и комплаентность МП увеличивалась в разной степени у всех пациентов. После 5 лет наблюдения никаких метаболических нарушений, а также камнеобразования не было выявлено при использовании всех вариантов скаффолда. Избыточная продукция слизи, обычная для цистопластики фрагментами кишечника, тоже отсутствовала. По данным гистологического анализа биопсии стенки нецистиса в ней определялись структуры, состоящие из уротелия, собственной пластинки слизистой, подслизистой основы и формирующейся мышечной оболочки; иммуногистохимический анализ показал нормальный фенотип уротелиальных и мышечных клеток.

Позднее было выполнено еще два исследования по замещению МП. В первом исследовании в качестве пациентов были дети с нейрогенным МП вследствие порока развития позвоночника, которым была показана цистопластика по причине высокого внутрипузырного давления или патологических изменений верхних мочевых путей (29).

Пациентам была произведена биопсия стенки МП с последующим перемещением аутологичных клеток (уротелия и мышечных) на полимерную матрицу и трансплантацией неооргана. У всех 10 пациентов отмечено клинически-значимое улучшение по данным уродинамики, лучевых методов и дневников мочеиспускания. Второе исследование выполнено на 6 взрослых пациентах с нейрогенным МП вследствие травмы спинного мозга (30). Тем же самым способом был смоделирован и пересажен пациентам новый МП. После 2 лет наблюдения у 4 из 6 пациентов наблюдали положительный ответ на перенесенную операцию.

Положительные результаты применения тканеинженерных конструкций, содержащих клетки тканей МП, открывают большие возможности для исследований в области реконструкции МП. Однако в упомянутых выше исследованиях использовались только аутологичные клетки МП, что невозможно у пациентов с микроцистисом туберкулезной и иной этиологии, когда все ткани пузыря замещены рубцовыми тканями, и практически невозможно получить нормальные аутологичные клетки уротелия и мышечного слоя стенки МП.

Одной из основных задач при создании ТИК является поиск наиболее подходящего аллогенного источника клеток. При создании ТИК могут быть использованы клетки различного тканевого происхождения: нативные клетки МП (27-30), эмбриональные стволовые клетки (ESC) (31, 32), индуцированные плюрипотентные клетки (iPSC) (33-35) и стволовые клетки взрослого организма (36-38). В клинической практике применение эмбриональных стволовых клеток невозможно по этическим и религиозным причинам. Технология тканевой инженерии с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток до сих пор несовершенна, а сведения об иммуногенных и туморогенных свойствах iPSC противоречивы. В настоящее время наиболее доступным и перспективным для реконструкции МП представляется использование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК), обладающих рядом таких уникальных свойств, как высокий пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке в различных направлениях, в том числе в перициты - клетки, принимающие участие в формировании сосудов (39-43).

Помимо прямого встраивания в структуру поврежденной ткани возможно и индукционное участие ТИК в процессах регенерации и репарации. Именно этим можно объяснить восстановление тканей после трансплантаций ТИК, содержащих стволовые клетки аллогенного происхождения. Потенциальные риски применения МСК в клинической практике

связывают, главным образом, с возможностью развития инфекционных осложнений вследствие иммуносупрессивного действия МСК (44-46). Однако проведенные клинические исследования показали эффективность и безопасность терапии мезенхимальными стволовыми клетками – не наблюдалось негативное влияние МСК на развитие осложнений и возникновение опухолей (47-49).

Другой важной составляющей ТИК, безусловно, является скаффолд, который, главным образом, выполняет функции каркаса для культивирования клеток. Однако к скаффолду также предъявляется целый ряд требований, таких как, биосовместимость, механическая прочность, биодegradация и другие свойства (50).

В последние годы проводятся исследования по созданию различных органов на основе натуральных, в том числе ксеногенных (51, 52) и безклеточных скаффолдов (53, 54), которые имеют обнадеживающие результаты. Однако синтетические полимеры являются наиболее привлекательными, как с точки зрения их доступности, так и с точки зрения возможности создания скаффолда с заданными параметрами: состав, скорость деградации, механическая прочность и др. характеристики. Для модификации скаффолда и улучшения его свойств могут быть использованы различные факторы роста и факторы, способствующие усилению ангиогенеза (55-58).

В связи с функциональными особенностями МП его реконструкция представляется достаточно непростой задачей. До широкого применения данных технологий предстоит решить еще множество вопросов. Известно о том, что зарубежные исследовательские группы добивались в условиях *in vitro* формирования ткани сходной с нативной тканью (22-26), однако функциональная активность сгенерированного МП до настоящего времени еще не была показана. Кроме того, несмотря на полученные результаты, клинические улучшения у пациентов остаются минимальными. Биопсия, взятая из сконструированного пузыря, показывает низкую васкуляризацию ткани, гибель клеток из-за плохого кровоснабжения и фиброз соединительной ткани. Главными проблемами, которые предстоит решить при создании и последующем имплантировании ТИК – это формирование достаточной васкуляризации и иннервации, а также последующее физиологическое функционирование органа. Безусловно, что сразу решить все эти проблемы невозможно.

Прежде чем перейти к вопросу реконструкции МП человека с использованием ТИК необходимо получить положительный результат применения подобной конструкции на

модели лабораторных животных. Авторами настоящей статьи - коллективом сотрудников из группы «Клеточные биотехнологии» Института цитологии РАН и НИИ фтизиопульмонологии были выполнены предварительные исследования по оценке эффективности применения ТИК на основе полилактида (полимер молочной кислоты – поли L,L-лактид), заселенной аллогенными МСК костного мозга, для восстановления поврежденной ткани МП кролика. Имплантацию ТИК выполняли на модели парциальной резекции МП кролика. Гистологические данные биоптатов, полученных через 2 мес. после операции, продемонстрировали начальную стадию процесса восстановления поврежденной ткани МП. Происходило формирование уротелия, собственной пластинки, подслизистой основы и мышечной оболочки; воспалительный процесс носил умеренный характер, не распространялся на окружающие ткани. Кроме того, происходила полная деградация материала скаффолда и шовного материала (59, 60).

Однако, несмотря на полученный положительный результат, потребовалось дальнейшее усовершенствование ТИК с целью улучшения ее эластичности. Для приготовления скаффолда использовали смесь полилактида и фиброина шелка. Скаффолд, имеющий такой состав, достаточно эластичен (61) и удобен при оперативных манипуляциях (подшивание). Кроме того, его дополнительным достоинством является отсутствие влияния продуктов его деградации на значение рН в окружающих тканях, что позволяет избежать возникновения воспалительной реакции и фиброза (62, 63).

Применение ТИК с таким составом позволило нам существенно улучшить характер восстановления поврежденной ткани МП. С помощью метода магнитно-резонансной томографии через 2 мес. после имплантации была показана полная интеграция ТИК с нативной тканью МП. Гистологическая оценка биоптатов, полученных из зоны имплантации, продемонстрировала степень васкуляризации подслизистой оболочки сопоставимую с контрольной (интактное животное), что способствовало сохранению жизнеспособности клеток, заселяющих ТИК. МСК, помеченные наночастицами (суперпарамагнитные наночастицы оксида железа), были выявлены во всех слоях сформировавшейся ткани, что позволило нам сделать вывод об активном участии клеток аллогенного происхождения в процессе ее восстановления (64).

От экспериментальных исследований до клинического применения тканеинженерных конструкций предстоит пройти длинный и трудный путь. Кроме того, идеология тканевой

инженерии подразумевает почти всегда персонифицированный сервис и «изготовление органа под заказ каждому клиенту», что имеет более чем высокую себестоимость и существенно ограничивает возможности экспансии в клиническую практику, как в России, так и за рубежом. Конечно, нужны терпение и труд, чтобы технологии тканевой инженерии вошли в рутинную практику. И все-таки тканевая инженерия МП – это уже не только пионерная страница, но и существенный шаг в развитии регенеративной медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-50-00068.

Список литературы

1. **Oberpenning F., Meng Jun., Yoo J.J., Atala A.** De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature biotech.* 1999, 17: 149–155.
2. **McDougal W.S.** Metabolic complications of urinary intestinal diversion. *J. Urol.* 1992, 147: 1199–1208.
3. **Kaefer M., Tobin M.S., Hendren W.H., Bauer S.B., Peters C.A., Atala A., Colodny A.H., Mandell J., Retik A.B.** Continent urinary diversion: the children's hospital experience. *J. Urol.* 1997, 157: 1394–1399.
4. **Kaefer M., Hendren W.H., Bauer S.B., Goldenblatt P., Peters C.A., Atala A., Retik A.B.** Reservoircalculi: a comparison of reservoirs constructed from stomach and other enteric segments. *J. Urol.* 1998, 160: 2187–2190.
5. **Soergel T.M., Cain M.P., Misseri R., Gardner T.A., Koch M.O., Rink R.C.** Transitional cell carcinoma of the bladder following augmentation cystoplasty for the neuropathic bladder. *J Urol.* 2004, 172: 1649–1651.
6. **Попов Б.В., Зайчик А.М., Бudyко М.Б., Злобина О.В., Толкунова Е.Н., Жидкова О.В., Петров Н.С.** Клетки эпителия кишечника трансдифференцируются в уротелий мочевого пузыря в опытах in vivo. *Цитология.* 2011, 53(4): 332–340.
7. **Neuhof H.** Fascial transplantation into visceral defects: an experimental and clinical study. *Surg Gynecol Obst.* 1917, 25: 383.
8. **Cheng E., Rento R., Grayhack J.T., Oyasu R., McVary K.T.** Reversed seromuscular flaps in the urinary tract in dogs. *J Urol.* 1994, 152: 2252–2257.
9. **Gleeson M.J., Griffith D.P.** The use of alloplastic biomaterials in bladder substitution. *J Urol.* 1992, 148: 1377–1382.
10. **Kelami A., Ludtke-Handjery A., Korb G., Roll J., Schnell J., Danigel K.H.** Alloplastic replacement of the urinary bladder wall with lyophilized human dura. *Europ Surg Res.* 1970, 2: 195.
11. **Probst M., Dahiya R., Carrier S., Tanagho E.A.** Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement. *Br J Urol.* 1997, 79: 505–515.
12. **Tsuji I., Ishida H., Fujieda J.** Experimental cystoplasty using preserved bladder graft. *J Urol.* 1961, 85: 42–44.
13. **Vaught J.D., Kropp B.P., Sawyer B.D., Rippy M. K., Badylak S. F., Shannon H. E., Thor K. B.** Detrusor regeneration in the rat using porcine small intestinal submucosal grafts: functional innervation and receptor expression. *J Urol.* 1996, 155: 374–378.
14. **Bona A.V., De Gresti A.** Partial substitution of urinary bladder with Teflon prosthesis. *Minerva. Urol.* 1966, 18: 43.

15. **Fujita K.** The use of resin-sprayed thin paper for urinary bladder regeneration. *Invest Urol.* 1978, 15: 355.
16. **Kudish H.G.** The use of polyvinyl sponge for experimental cystoplasty. *J Urol.* 1957, 78: 232.
17. **Monsour M.J., Mohammed R., Gorham S.D., French D.A., Scott R.** An assessment of a collagen/vicryl composite membrane to repair defects of the urinary bladder in rabbits. *Urol Res.* 1987, 15: 235–238.
18. **Rohrmann D., Albrecht D., Hannappel J., Gerlach R., Schwarzkopp G., Lutzeyer W.** Alloplastic replacement of the urinary bladder. *J Urol.* 1996, 156: 2094–2097.
19. **Tsuji I., Kuroda K., Fujieda J., Shiraishi Y., Kunishima K., Orikasa S.** Clinical experience of bladder reconstruction using preserved bladder and gelatin sponge in the case of bladder cancer. *J Urol.* 1967, 98: 91.
20. **Atala A., Retik A.** Pediatric urology – future perspectives. In: Krane RJ, Siroky MB, Fitzpatrick JM, editors. *Clinical Urology.* Philadelphia: Lippincott JB. 1994: 507–524.
21. **Petrovic V., Stankovic J., Stefanovic V.** Tissue engineering of the urinary bladder: current concepts and future perspectives. *Scientific World Journal.* 2011, 28(11): 1479–1488.
22. **Fraser M., Thomas D.F., Pitt E., Harnden P., Trejdosiewicz L.K., Southgate J.** A surgical model of composite cystoplasty with cultured urothelial cells: a controlled study of gross outcome and urothelial phenotype. *BJU Int.* 2004, 93: 609–616.
23. **Schoeller T., Lille S., Stenzl A., Ninkoviæ M., Piza H., Otto A., Russell R. C., Wechselberger G.** Bladder reconstruction using a prevascularized capsular tissue seeded with urothelial cells. *J Urol.* 2001, 165: 980–985.
24. **Kanematsu A., Yamamoto S., Noguchi T., Ozeki M., Tabata Y., Ogawa O.** Bladder regeneration by bladder acellular matrix combined with sustained release of exogenous growth factor. *J Urol.* 2003, 170: 1633–1638.
25. **Nuininga J.E., van Moerkerk H., Hanssen A, Hulsbergen C.A., Oosterwijk-Wakka J., Oosterwijk E., de Gier R.P., Schalken J.A., van Kuppevelt T.H., Feitz W.F.** A rabbit model to tissue engineer the bladder. *Biomaterials.* 2004, 25: 1657–1661.
26. **Bouhout S., Goulet F., Bolduc S.** A novel and faster method to obtain a differentiated 3-dimensional tissue engineered bladder. *J Urol.* 2015, 194: 834–841.
27. **Atala A.** Tissue engineering in the genitourinary system. In: Atala A, Mooney D, eds. *Tissue engineering.* Boston: Birkhauser Press. 1997, 149-164.
28. **Atala A., Bauer S.B., Soker S., Yoo J.J., Retik A.B.** Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* 2006, 367: 1241–1246.
29. **Joseph D., Borer J., De Filippo R.** Autologous cell seeded biodegradable scaffold for augmentation cystoplasty: phase II study in children and adolescents with spina bifida. *J Urol.* 2014, 191: 1389–1395.
30. **Yoo J.J., Olson J., Atala A., Kim B.** Regenerative medicine strategies for treating neurogenic bladder. *International Neurourology Journal.* 2011, 15(3): 109–119.
31. **Kim B.S., Chun S.Y., Lee J.K., Lim H.J., Bae J., Chung H., Atala A., Soker S., Yoo J.J., Kwon T.G.** Human amniotic fluid stem cell injection therapy for urethral sphincter in an animal model. *BMC Medicine.* 2012, 2–14.
32. **Bani-Yaghoob M., Wilson P., Hengstschläger M., Nikaido T., Pei D.** Amniotic stem cells: Potential in regenerative medicine. *Stem Cells Int.* 2012, doi: 10.1155/2012/530674.
33. **Wu S.M., Hochedlinger K.** Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol.* 2011, 13(5): 497–505.

34. **Wong W.T., Sayed N., Cooke J.P.** Induced Pluripotent Stem Cells: How They Will Change the Practice of Cardiovascular Medicine. *MDCVJ*. 2013, IX (4): 206–209.
35. **Osborn S., Kurzrock E.** Production of urothelium from pluripotent stem cells for regenerative applications. *Curr Urol Rep*. 2015, doi: 10.1007/s11934-014-0466-6.
36. **Mahla R.S.** Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *International Journal of Cell Biology*. 2016, doi.org/10.1155/2016/6940283.
37. **Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999, 284: 143–147.
38. **Geburek F., Mundle K., Conrad S.** Tracking of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with in vivo magnetic resonance imaging and histology after intralesional treatment of artificial equine tendon lesions - a pilot study. *Stem Cell Res Ther*. 2016, 7(1): 21–29.
39. **Ghoraishizadeh S., Ghoraishizadeh A., Ghoraishizadeh P., Daneshvar N., Borojerd H.** Application of nanoscaffold in mesenchymal stem cell-based therapy. *Advances in Regenerative Medicine*. 2014: 1-14.
40. **Matthay M.A., Goolaerts A., Howard J.P., Lee J.W.** Mesenchymal stem cells for acute lung injury: preclinical evidence. *Crit Care Med*. 2010, 38: S569–573.
41. **Karlsson H., Samarasinghe S., Ball L.M., Sundberg B., Lankester A.C., Dazzi F., Uzunel M., Rao K., Veys P., Blanc K.L., Ringdén O. Amrolia P.J.** Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood*. 2008, 112: 532–541.
42. **Battiwalla M., Hematti P.** Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation» *Cytoterapy*. 2009, 11(5): 503–515.
43. **Ning J., Li C., Li H., Chang J.** Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into urothelial cells and implications for reconstructing urinary bladder mucosa. *Cytotechnology*. 2011, 63: 531–539.
44. **Liotta F., Angeli R., Cosmi L., Fili L., Manuelli C., Frosali F., Mazzinghi B., Maggi L., Pasini A., Lisi V., Santarlasci V., Consoloni L., Angelotti M.L., Romagnani P., Parronchi P., Krampera M., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F.** Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells*. 2008, 26: 279–289.
45. **Князев О.В., Парфенов А.И., Щербаков П.Л., Хомерики С.Г., Ручкина И.Н., Конопляников А.Г.** Эффективность и безопасность мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у больных с рефрактерными формами болезни Крона. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2013, VIII(1): 76–84.
46. **Crop M., Baan C., Korevaar S.** Donor-derived mesenchymal stem cells suppress alloreactivity of kidney transplant patients. *Transplantation*. 2009, 87(6): 896–906.
47. **Prockop D.J., Brenner M., Fibbe W.E., Horwitz E., Le Blanc K., Phinney D.G., Simmons P.J., Sensebe L., Keating A.** Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytherapy*. 2010, 12: 576–578.
48. **Mei SH., Haitzma J.J., Dos Santos C.C., Deng Y., Lai P.F., Slutsky A.S., Liles W.C., Stewart D.J.** Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 182(8): 1047–1057.
49. **Князев О.В., Конопляников А.Г., Парфенов А.И., Ручкина И.Н., Чурикова А.А., Албулова Е.А., Быкова С.В., Болдырева О.Н., Фадеева Н.А., Лищинская А.А., Бондаренко Е.Ю., Каграманова А.В.** Безопасность терапии мезенхимальными

стромальными клетками (Обзор литературы и собственные данные за 5 лет наблюдения). Клиническая практика. 2014, 3: 5–14.

50. **Brehmer B., Rohrmann D., Becker C., Rau G., Jakse G.** Different types of scaffolds for reconstruction of the urinary tract by tissue engineering. *Urol Int.* 2007, 78(1): 23–29.

51. **De Jonge P., Simaioforidis V., Geutjes P., Oosterwijk E., Feitz W.** Ureteral reconstruction with reinforced collagen scaffolds in a porcine model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016, doi: 10.1002/

52. **Aufderklamm S., Vaegler M., Kelp A., Maurer S., Gustafsson L., Mundhenk J., Busch S., Daum L., Stenzl A., Amend B., Sievert K.D.** Collagen cell carriers seeded with human urothelial cells for urethral reconstructive surgery: first results in a xenograft minipig model. *World J Urol.* 2016. [Epub ahead of print]

53. **Watanabe E., Yamato M., Shiroyanagi Y., Tanabe K., Okano T.** Bladder augmentation using tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps. *Transplantation.* 2011, 91: 700–706.

54. **Li J., Wang W., Li J., Rexiati M., An H., Wang F., Wang Y.** The histocompatibility research of hair follicle stem cells with bladder acellular matrix. *Medicine (Baltimore).* 2016, 95(45): e4979.

55. **Perets A., Baruch Y., Weisbuch F., Shoshany G., Neufeld G., Cohen S.** Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A.* 2003, 65(4): 489–497.

56. **Chung H.J., Kim H.K., Yoon J.J., Park T.G.** Heparin immobilized porous PLGA microspheres for angiogenic growth factor delivery. *Pharm Res.* 2006, 23(8): 1835–1841.

57. **Guan J., Stankus J.J., Wagner W.R.** Biodegradable elastomeric scaffolds with basic fibroblast growth factor release. *J Control Release.* 2007, 120(1-2): 70–78.

58. **Jiang X., Xiong Q., Xu G., Fang X., Cui D., Xu M., Chen F., Geng H.** VEGF-Loaded Nanoparticle-Modified BAMAs Enhance Angiogenesis and Inhibit Graft Shrinkage in Tissue-Engineered Bladder. *Ann Biomed Eng.* 2015, 43(10): 2577–2586.

59. **Орлова Н.В., Муравьев А.Н., Виноградова Т.И., Юдинцева Н.М.** Применение аллогенных клеток для реконструкции мочевого пузыря (экспериментальное исследование). ISSN 2575-7999 Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). Ежемесячный научный журнал. 2014, 4(1): 134–137.

60. **Орлова Н.В., Муравьев А.Н., Виноградова Т.И., Блюм Н.М., Юдинцева Н.М., Блинова М.И., Нащекина Ю.А., Яблонский П.К.** Клеточные технологии в реконструктивной хирургии мочевого пузыря. *Медицинский альянс.* 2016, 1: 50-52.

61. **Franck D., Gil E.S., Adam R.M., Kaplan D.L., Chung Y.G., Estrada C.R., Jr., Mauney J.R.** Evaluation of Silk Biomaterials in Combination with Extracellular Matrix Coatings for Bladder Tissue Engineering with Primary and Pluripotent Cells. 2013, *PLOS ONE* | www.plosone.org. 8(2): 1–12.

62. **Mauney J.R., Cannon G.M.J., Lovett M.L., Gong E.M., DiVizio D., Kaplan D.L., Adam R.M., Estrada C.R.** Evaluation of gel spun silk-based biomaterials in a murine model of bladder augmentation. *Biomaterials.* 2011, 32: 808–818.

63. **Kim U., Park J., Kim H., Wada M., Kaplan D.** Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials.* 2005, 26: 2775–2785.

64. **Yudintceva N.M., Nazhchekina Y.A., Blinova M.I., Orlova N.V., Muraviov A.N., Vinogradova T.I., Sheykhov M.G., Shapkova E.Y., Emeljannikov D.V., Yablonskii P.K., Samusenko I.A., Mikhrina A.L., Pakhomov A.V., Shevtsov M.A.** Experimental bladder regeneration using poly-L-lactide/silk fibroin (PL-SF) scaffold seeded with nanoparticle labelled allogenic bone marrow stromal cells. *International Journal of Nanomedicine.* 2016, 11: 4521–4533.

BLADDER RECONSTRUCTION USING THE TISSUE ENGINEERING METHODS: PROBLEMS AND OUTLOOK

N.M. Yudintceva¹, Yu. A. Nashchekina¹, A.N. Muraviov²

¹Federal State Budget Institution of Science Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg;

²Federal State Institution Saint-Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg;

yudintceva@mail.ru

The modern methods and approaches to reconstruction of human urinary bladder (UB) are described in this review. Currently, the exclusive method of the UB reconstruction is the replacement of the bladder tissue with gastrointestinal fragments, despite a number of complications. It is shown that intestinal stem cells have some plasticity and can transdifferentiate to mature UB cells - urothelium. However, the full functional recovery of urothelial cells in this case does not occur. New developments in the field of tissue engineering can provide a possibility to solve this problem. In last year's positive results of application of various tissue-engineering constructs, containing cells for reconstruction of tissues damaged of UB in experimental animals were obtained.

Keywords: bladder, scaffold, stem cells, tissue engineering, tissue-engineering construct.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ СУПЕРНАТАНТА НЕЙРОГЕННЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОГО МОЗГА КРЫСЫ НА КЛЕТКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛИОМЫ С6 В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Л. Д. Любич

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

lyubichld@gmail.com

Одним из подходов генно-клеточной терапии злокачественных глиом головного мозга является использование нейрогенных стволовых и прогениторных клеток (НСК/НПК). Известно, что НСК обладают большим потенциалом миграции к очагам патологии в ЦНС и индукции гибели клеток опухоли у мышей и крыс, а также обеспечивают пролонгацию сроков

выживания животных или почти полную ингибицию роста глиомы. Однако механизм противоопухолевых свойств НПК остается невыясненным. Целью данного исследования явилось изучение возможных механизмов воздействия супернатанта нейрогенных клеток (СНК) фетального мозга крысы 14-х сут гестации на культивируемые клетки глиомы крысы линии С6. В клетках контрольных и опытных культур (при добавлении в среду СНК) определяли с помощью иммуноцитохимических методов экспрессию маркеров: Ki-67, CD133, TGF- β 1 и p53. На окрашенных цитологических препаратах выполняли морфометрические исследования, вычисляли митотический индекс.

При воздействии СНК в концентрации 0,10 мг/мл в течение 48 час на культивируемые клетки глиомы С6 установлено: 1) снижение общего количества клеток в культуре (в 1,7 раза); 2) уменьшение доли клеток с увеличенным количеством ядрышек (в 2,2 раза); 3) снижение митотического индекса (в 4,4 раза); 4) уменьшение количества пролиферирующих (Ki-67+) опухолевых клеток (в 2,7 раза); 5) 4-кратное снижение количества CD133+ (стволовых) опухолевых клеток; 6) уменьшение доли TGF- β 1+ опухолевых клеток (в 1,7 раза); 7) 2-кратное увеличение количества p53+ клеток. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что тестируемый супернатант фетальных нейрогенных клеток содержит противоопухолевые гуморальные факторы, ингибирующие неконтролируемую пролиферацию опухолевых клеток, влияющие на дифференцировку стволовых опухолевых клеток и, возможно, инициирующие программированную гибель клеток (апоптоз).

Ключевые слова: глиома С6, первичная культура, супернатант нейрогенных клеток фетального мозга крысы, маркеры Ki-67, CD133, TGF- β 1, p53.

Успешная разработка фундаментальных проблем современной нейробиологии и нейроонкологии в значительной степени обусловлена использованием метода культивирования нервной ткани, позволяющего в течение длительного времени прижизненно наблюдать культивируемые нейроклетки в разных экспериментальных условиях (1, 2). В нейроонкологии первичные и диссоциированные культуры клеток, полученные из различных опухолей головного мозга, широко применяются в исследовании пролиферативного потенциала и механизмов канцерогенеза, а также для первичной апробации новых подходов в терапии опухолей (3).

Среди опухолей ЦНС наиболее часто встречаются опухоли глиального гистогенеза различной степени злокачественности. Первичная культура клеток глиальных опухолей является адекватной моделью для сравнительного изучения их пролиферативных свойств и морфологических реакций опухолевых клеток на прямое воздействие антибластических препаратов и биологически активных веществ.

Несмотря на активный поиск эффективных методов лечения злокачественных глиом во всем мире, значительный прогресс пока не достигнут из-за инвазивности и высокого рецидивирования этих опухолей. Одним из альтернативных подходов для решения этой проблемы является использование нейрогенных стволовых и прогениторных клеток (НСК/НПК) (4, 5). Известно, что НСК обладают большим потенциалом миграции к очагам патологии в ЦНС: при имплантации в поврежденную нервную ткань НСК могут преодолевать большие расстояния и встраиваться в места поражения, интегрируясь в локальное микроокружение, стабильно экспрессируя гены и замещая поврежденную нервную ткань благодаря своей мультипотентности. НСК также влияют на микроокружение, запуская механизмы защиты и регенерации нервных тканей реципиента. Указанные характеристики НСК обосновывают целесообразность их применения для генно-клеточной терапии различных заболеваний ЦНС, в том числе опухолей головного мозга (6, 7). Показано, что НСК/НПК могут мигрировать в ткань глиобластом и индуцировать гибель клеток опухоли у мышей и крыс, а также пролонгировать сроки выживания животных или почти полностью ингибировать рост глиомы (8, 9). Однако механизм противоопухолевых свойств НПК остается невыясненным.

Ранее нами показан цитотоксический эффект воздействия кондиционированной среды (супернатанта) от НПК фетального мозга крысы в культурах глиом головного мозга человека (10,11). Целью данной работы является выявление вероятных механизмов противоопухолевых свойств супернатанта нейрогенных клеток (СНК) фетального мозга крысы. В связи с этим исследовали уровень экспрессии маркеров Ki-67, CD133, TGF- β 1 и p53 в культурах клеток экспериментальной глиомы С6 при воздействии СНК крысы. Выбор перечисленных маркеров обосновывался известными данными о том, что Ki-67 является маркером пролиферации, характеризующим способность клеток новообразования к неконтролируемому делению, обуславливающему их биологическую агрессивность; CD133 (проминин-1) считается одним из наиболее характерных биомаркеров стволовых клеток опухолей мозга (СКОМ) (12); TGF- β 1 (трансформирующий ростовой фактор бета-1)

регулирует пролиферацию, дифференцировку выживание и/или апоптоз клеток и является медиатором злокачественного фенотипа клеток глиом (13); p53 является проапоптотическим белком – продуктом гена-супрессора опухолей TP53.

Материал и методы

Материалом для культивирования служили клетки глиомы крысы линии С6 («Клеточный банк линий тканей человека и животных», Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, n=16). Исследования проведены в следующих группах: 1) контрольные культуры глиомы С6 (стандартные условия культивирования без добавления СНК); 2) опытные культуры глиомы С6 (с добавлением СНК).

Клетки глиомы С6 в количестве 1×10^6 наносили на покровные адгезивные стекла, покрытые полиэтиленгликолем («Sigma», ФРГ), помещенные в чашки Петри. Контрольные культуры культивировали в среде 199 и DMEM (1:1) с добавлением 10 % ФТС, 400 мг% глюкозы и 0,2 ед/мл инсулина (объем питательной среды составлял 2 мл). Культуры клеток содержали в CO₂-инкубаторе (37°C, 95 % влажности и 5 % CO₂) и прижизненно наблюдали с использованием инвертированного микроскопа («Eclips TS 100», Япония) с микрофотографической регистрацией. СНК получали из суспензии нейрогенных клеток мозга крысы на 14-е (E14) сут гестации, как описано ранее (10, 11).

Для исследования влияния СНК отбирали культуры с равномерной зоной роста, добавляли СНК (0,10 мг/мл) и инкубировали в течение 48 час. Культуры фиксировали 10 % формалином и проводили цитоморфологические и иммуноцитохимические исследования.

Цитологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином.

Иммуноцитохимическое выявление маркеров в культивированных клетках глиомы С6 крысы проводили с помощью кроличьих моноклональных антител против Ki-67 («ThermoScientific», США); мышинных моноклональных антител против CD133 («Millipore», США); мышинных моноклональных антител против TGF-β1 («Sigma», США), кроличьих антител против p53 (anti-TP53 antibody, «Sigma-Aldrich», США). В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой козы антимышинные / антикроличьи иммуноглобулины (antimouse / antirabbit IgG, «Dako», Дания). Визуализировали реакцию с помощью субстратного

раствора с диаминобензидином («Dako», Дания). Доокрашивание препаратов проводили гематоксилином.

Микроскопическое исследование и фоторегистрацию цитологических препаратов культур проводили на микроскопе AxiolmagerA2 («CarlZeissMicroscopyGmbH», ФРГ) с широкополосным фильтром и фотокамерой AxioCamMRc5 («CarlZeissMicroscopyGmbH», ФРГ), а также на светооптическом фотомикроскопе AxioPhot («OPTON», ФРГ) с объект-микрометром («CarlZeiss», ФРГ), аттестованным для калибровки увеличения изображений при морфометрических исследованиях (объектив x40, окуляр x10, переходник x2). Анализ цифровых изображений проводили с помощью программного обеспечения «ZenLite 2012» (ФРГ), а также с помощью компьютерного анализатора изображений CAI-01ABH «SELMI» (Украина) с использованием программного обеспечения «Kappa opto-electronics GmbH» (ФРГ). В препаратах опытных культур определяли общую архитектуру зоны роста, цитологические изменения клеточного состава, количество иммунопозитивных/негативных клеток, морфометрические показатели в сравнении с контрольными культурами. Количество иммунопозитивных и негативных клеток определяли в 10 произвольно выбранных полях зрения микроскопа для каждого образца при использовании стандартной измерительной шкалы (объект – микрометр) при одинаковом увеличении (x 800) и вычисляли как долю от общего количества клеток, принятого за 100 %; подсчитывали не менее 1000 клеток. Митотический индекс (МИ) определяли с помощью подсчета митозов в 3-х наблюдениях каждого образца в 10 произвольно выбранных полях зрения микроскопа (x400). МИ вычисляли как долю клеток в стадии митотического деления от общего количества клеток в процентах.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ "Statistica 8.0", программное обеспечение StatSoft, Inc. (2007).

Использовали t-критерий Стьюдента, данные представляли в виде среднего значения с ошибкой среднего. Корреляционный анализ проводили с использованием рангового критерия Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$ или $P < 0,01$.

Результаты и обсуждение

Контрольные наблюдения культур глиомы С6 головного мозга крыс показали, что в течение первых сут культивирования вокруг микроэксплантатов наблюдались разрастания опухолевых клеток недифференцированного фенотипа с узкой цитоплазмой и умеренной атипией ядер.

Между уплотненными клеточными микроагрегатами отмечались монослойные участки отростчатых клеток астроцитарного фенотипа, образующих ретикулярные структуры. Среди клеток в состоянии митотического деления встречались патологические формы митозов, характерные для злокачественных глиом головного мозга. В последующие сроки наблюдения (4-6-е сут) в культурах глиомы С6 наблюдалось разрыхление клеточных микроагрегатов с преобладанием опухолевых клеток астроцитарного фенотипа униполярной, треугольной или ромбовидной формы с длинными отростками (средней длины - $91,39 \pm 11,91$ μm), формирующих ретикулярные структуры (рис. 1,а). В участках разрастаний недифференцированных опухолевых клеток МИ культивированных клеток составлял $4,90 \pm 0,01$ %.

Для исследования влияния СНК отбирали культуры с равномерной зоной роста на 5-6-е сутки. Морфометрический анализ цитологических препаратов культур в этот срок показал, что доля клеток с визуализирующимися ядрышками составляла: с наличием 1 ядрышка – $8,44 \pm 0,91$ %; 2-х ядрышек - $4,53 \pm 0,16$ %; 3-х ядрышек и более – $7,97 \pm 0,25$ % опухолевых клеток. Как известно, наличие ядрышек отображает активность синтетических транскрипционных и трансляционных процессов в ядре, а мультипликация ядрышек является характерным признаком злокачественных глиом (14).

Доля опухолевых клеток, иммунопозитивных на Ki-67, составляла $27,86 \pm 2,91$ %, что отражает высокую пролиферативную активность клеток глиомы С6 головного мозга крыс в стандартных условиях культивирования (рис.1,в). Опухолевые клетки, иммунопозитивные на CD133 (СКОМ), составляли $12,05 \pm 4,77$ % от общего количества клеток в культуре, что в целом согласуется с известными данными литературы (12). Доля опухолевых клеток, иммунопозитивных на TGF- β 1, составляла $48,81 \pm 7,91$ %, а p53-иммунопозитивных - $8,94 \pm 6,05$ %.

Через 48 час инкубации культур глиомы С6 с СНК в концентрации 0,10 мг/мл в зоне роста культур наблюдалось разрежение структуры клеточного монослоя, появлялись дистрофически и некробиотически измененные опухолевые клетки с редукцией отростков, округленными цитоплазматическими телами и гиперхромными ядрами, а также клетки-тени (рис.1,б). Часть опухолевых клеток приобретала вид “голых” ядер в результате разрушения цитоплазмы. В то же время местами сохранялись отдельные опухолевые клетки с короткими конусовидными отростками. При этом МИ снижался в 4,5 раза по сравнению с контролем.

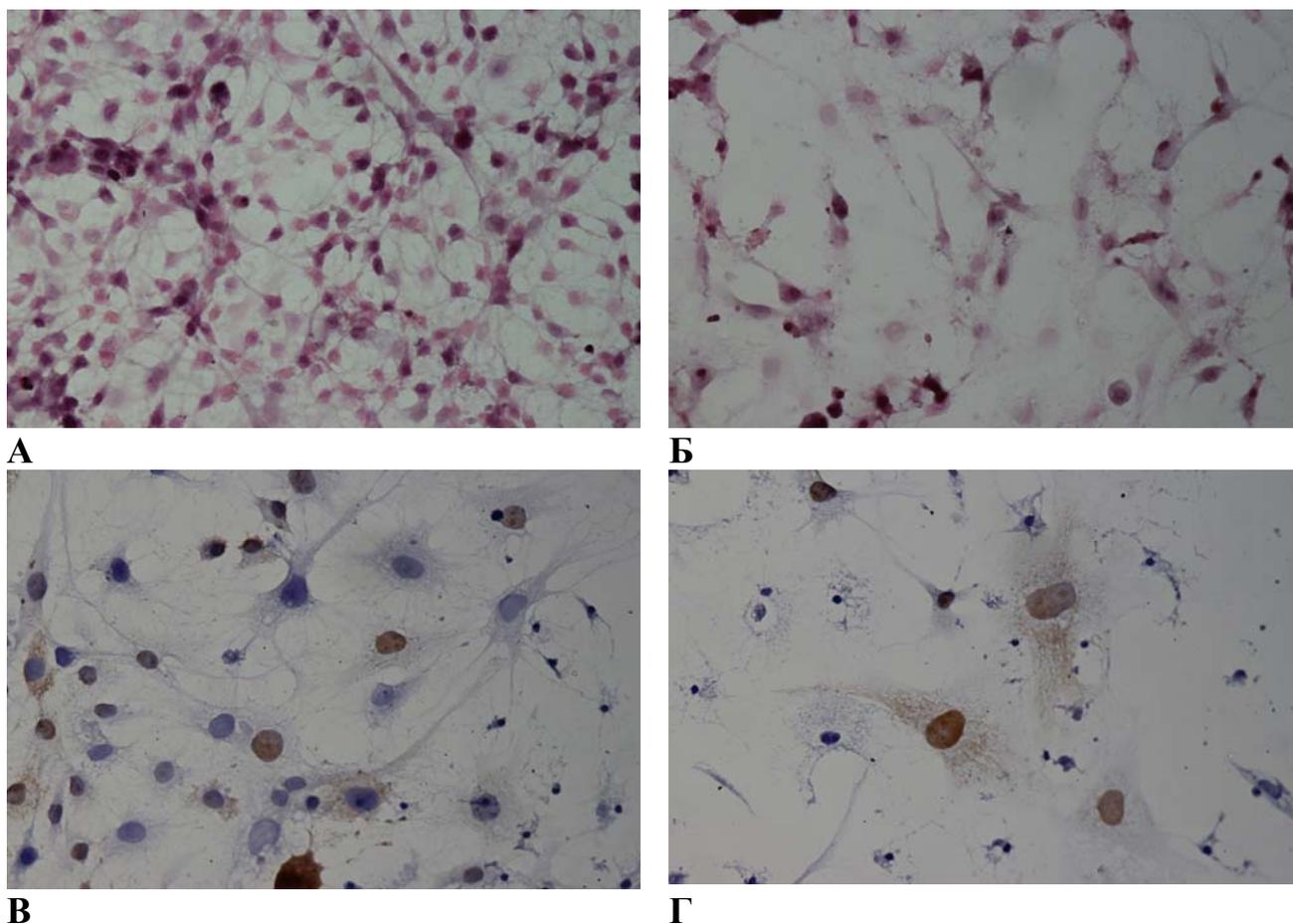


Рис.1. Морфологические изменения в культурах глиомы С6 при инкубации с супернатантом фетальных нейрогенных клеток (СНК). Световая микроскопия, а, б - окрашивание гематоксилин-эозином, 400х; в, г - иммуноцитохимическое окрашивание на Ki-67, доокрашивание гематоксилином, 800х; а, в - культура глиомы С6, 7-е сут, контроль; б, г - культура глиомы С6, инкубация с СНК 0,10 мг/мл, 48 час.

Среднее количество клеток в 10 произвольно выбранных полях зрения (0,04 мм²) снижалось в 1,7 раза. В 2,2 раза уменьшалась доля клеток с визуализирующимися множественными (≥ 3) ядрышками, что свидетельствует о снижении активности синтетических транскрипционных и трансляционных процессов в ядре опухолевых клеток после воздействия СНК.

В культурах глиомы С6 после инкубации с СНК в 2,7 раза снижалась также по сравнению с контролем доля Ki-67-иммунопозитивных клеток (рис.1,г; 2), что доказывает антипролиферативный эффект СНК на опухолевые клетки.

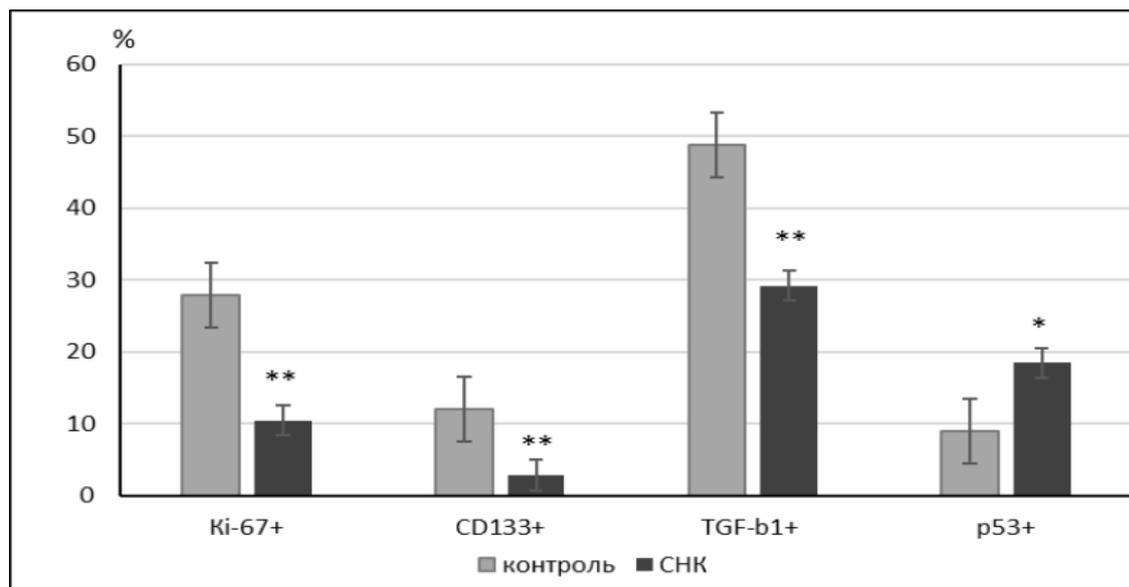


Рис.2. Влияние супернатанта фетальных нейрогенных клеток (СНК) крысы на экспрессию маркеров клетками глиомы С6 (по оси ординат – доля клеток в процентах). Статистическая значимость отличий * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$.

Количество CD133-иммунопозитивных клеток, то есть СКМ, в культуре опухолевых клеток под влиянием СНК уменьшалось в 4 раза по сравнению с контролем (рис. 2).

Количество TGF-β1-иммунопозитивных опухолевых клеток после инкубации с СНК снижалось в 1,7 раза по сравнению с контролем (рис. 2). Вместе с тем, через 48 час инкубации культур глиомы С6 с СНК доля p53-иммунопозитивных опухолевых клеток возрастала 2-кратно по сравнению с контролем (рис. 2), что свидетельствует о проапоптогенном воздействии СНК.

С целью выявления взаимосвязи между экспрессией маркеров CD133, Ki-67, TGF-β1, p53 в культивируемых клетках глиомы С6 проведен корреляционный анализ с использованием рангового критерия Спирмена. В результате анализа нами установлена статистически значимая сильная прямая корреляционная связь между количеством в культурах клеток глиомы С6 (до и после влияния СНК) TGF-β1-иммунонегативных клеток и количеством CD133-иммунонегативных клеток (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,78$, $p = 0,01$) и обратная корреляционная связь между количеством Ki-67-иммунопозитивных клеток и количеством CD133-иммунонегативных клеток (коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,71$, $p = 0,03$).

В то же время не обнаружено значимой прямой корреляционной связи между количеством CD133-иммунопозитивных (СКПМ) и Ki-67-иммунопозитивных (активно пролиферирующих) клеток (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,49$, $p = 0,18$), а также не выявлена

корреляция между количеством Ki-67-иммунопозитивных клеток и TGF- β 1- иммунопозитивных клеток в культуре глиомы С6. Об отсутствии значимой корреляции Ki-67 и TGF- β 1 при исследовании глиобластом человека сообщалось также в работе Фрей с соавт. (15).

Полученные нами данные, с нашей точки зрения, согласуются с результатами исследования Лу с соавт. (17), в котором показано, что глиобластомы содержат клетки разных молекулярных субтипов: в частности, пронейрональные СКОМ (CD133+) и мезенхимальные СКОМ (CD133-), отличающиеся по 24 генам. В настоящее время неизвестны конкретные лиганды или связи молекулы CD133 с сигнальными клеточными путями. Предложена гипотеза об антиапоптотической функциональной роли CD133 в защите опухолевых клеток, в частности, от химиотерапевтических агентов (12).

Маркер TGF- β считается медиатором злокачественного фенотипа глиом головного мозга человека и вовлекается в регуляцию пролиферации, дифференциации выживания и/или апоптоза (13), а также модулирует инвазивность, ангиогенез, ускользание от иммунологического контроля и поддержание СКОМ (15-18). В то же время, TGF- β является сильным ингибитором пролиферации эпителиальных клеток, астроцитов, иммунных клеток и считается опухолесупрессирующим фактором (15, 19). Имеются сведения о том, что TGF- β 1 оказывает антипролиферативное действие на ряд эпителиальных клеток на ранних стадиях опухолевого роста и промоторное воздействие на поздних его стадиях (20, 21). Опухولةингибирующая функция TGF- β включает в себя ингибицию пролиферации, индукцию апоптоза, регуляцию аутофагии. Однако при развитии опухоли происходит переключение клеток на утилизацию TGF- β , в результате чего он выступает потенциальным промотором клеточной подвижности, инвазии, метастазирования и поддержания СКОМ (22). Мутации элементов канонического TGF- β -сигнального пути в злокачественных глиомах позволяют избежать антипролиферативного влияния TGF- β на опухолевые клетки, способствуя таким образом его промоторному воздействию (15). TGF- β модулирует ответ клеток глиобластом аутокринным способом, поскольку в них экспрессированы и биологически активны все три изоформы TGF- β . Суммарный результат такого разнонаправленного (антипролиферативного или стимулирующего) воздействия TGF- β может варьировать между различными образцами опухолей и даже между различными участками одной и той же опухоли (15). Считают, что

экспрессия изоформ TGF- β значительно возрастает в глиомах высокой степени злокачественности (15, 20, 21, 23-25).

При тестировании СНК нами показано снижение экспрессии клетками глиомы С6 маркеров злокачественного фенотипа Ki-67, CD133, TGF- β 1 и увеличение экспрессии проапоптического белка p53.

Ранее нами установлено, что препарат СНК содержит TGF- β 1 и нейротрофический фактор мозга (brain derived neurotrophic factor – BDNF) (26). С нашей точки зрения, не исключено, что выявленные эффекты в культуре клеток глиомы С6 при воздействии СНК вызваны соответствующими свойствами указанных факторов. В частности, TGF- β 1 известен как регулятор пролиферации, дифференцировки и выживания или апоптоза клеток (13, 21, 25). BDNF способен связываться с рецепторами суперсемейства фактора некроза опухоли, запуская активацию внутриклеточных сигнальных каскадов (NF- κ B, Jun-киназа), опосредующих инициацию запрограммированной гибели клеток (апоптоза) (27).

Таким образом, при воздействии СНК в концентрации 0,10 мг/мл в течение 48 час на культивируемые клетки глиомы С6 установлено: 1) снижение общего количества клеток; 2) уменьшение количества клеток с увеличенным содержанием ядрышек; 3) снижение митотического индекса; 4) уменьшение количества пролиферирующих (Ki-67+) опухолевых клеток; 5) снижение количества CD133-иммунопозитивных (СКПМ) клеток; 6) уменьшение доли TGF- β 1+ опухолевых клеток; 7) увеличение количества p53+ клеток.

Полученные результаты, с нашей точки зрения, могут стать основой для теоретического обоснования возможности практического применения препаратов, полученных из фетальных нейрогенных клеток, в комплексной патогенетической терапии больных с глиомами. Проблема выяснения механизмов противоопухолевых свойств СНК требует дальнейшего углубленного исследования.

Список литературы

1. Пинаев Г.П. Клеточные культуры в фундаментальных и прикладных исследованиях. В кн. Методы культивирования клеток. Под ред. Г.П.Пинаева, М.С.Богдановой. – С-Пб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008: .7-21.

2. Пинаев Г.П. Проблемы и перспективы развития клеточных технологий / Г.П.Пинаев. В кн. Клеточные технологии для регенеративной медицины: под ред. Г.П.Пинаева, М.С.Богдановой, А.М.Кольцовой. – С-Пб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011: 8-24.

3. **Розуменко В.Д.** Фотодинамическая терапия глиом головного мозга. В кн. Глиомы головного мозга. Ю.А.Зозуля, И.Г.Васильева, А.Я. Главацкий и др.: под ред. Ю.А.Зозули. – К.:УИПК «ЕксОб». 2007: 495-501.

4. **Díaz-Coránguez M., Segovia J., López-Ornelas A., Puerta-Guardo H., Ludert J., Chávez B., Meraz-Cruz N., González-Mariscal L.** Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells. *PLoS One*. 2013, 8(4):e60655.

5. **Aboody K.S., Najbauer J., Metz M.Z., D'Apuzzo M., Gutova M., Annala A.J., Synold T.W., Couture L.A., Blanchard S., Moats R.A., Garcia E., Aramburo S., Valenzuela V.V., Frank R.T., Barish M.E., Brown C.E., Kim S.U., Badie B., Portnow J.** Neural Stem Cell-Mediated Enzyme/Prodrug Therapy for Glioma: Preclinical Studies. *Sci. Transl. Med.* 2013, 5 (184): 184-189.

6. **Bovenberg M.S., Degeling M.H., Tannous B.A.** Advances in stem cell therapy against gliomas. *Trends Mol.Med.* 2013, 19(5): 281-291.

7. **Morshed R.A., Gutova M., Juliano J., Barish M.E., Hawkins-Daarud A., Oganessian D., Vazgen K., Yang T., Annala A., Ahmed A.U., Aboody K.S., Swanson K.R., Moats R.A., Lesniak M.S.** Analysis of glioblastoma tumor coverage by oncolytic virus-loaded neural stem cells using MRI-based tracking and histological reconstruction. *Cancer Gene Therapy*. 2015, 22: 55–61.

8. **Stafin K., Lindvall M., Zuchner T., Lundberg C.** Instructive cross-talk between neural progenitor cells and gliomas. *J.Neurosci.Res.* 2007, 85(10): 2147-2159.

9. **Kim S.U.** Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors. *Stem Cell Rev.* 2011, 7(1): 130-140.

10. **Семенова В.М., Любич Л.Д., Лисяный Н.И., Главацкий А.Я., Стайно Л.П.** Исследование биологических свойств супернатанта прогениторных нейроклеток крыс на культурах глиом головного мозга. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 27.-Спб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011: 58-68.

11. **Любич Л.Д., Семенова В.М., Стайно Л.П., Главацкий А.Я.** Сравнительная оценка цитотоксического воздействия супернатанта нейрогенных клеток крысы и препарата галавит на культуры глиобластом человека. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 31.-Спб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2015: 3-14.

12. **Angelastro J.M., Lame M.W.** Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. *Mol. Cancer Res.* 2010, 8 (8): 1105–1115.

13. **Kaminska B., Kocyk M., Kijewska M.** TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2013; 986:171-87.

14. **Семенова В.М.** Экспериментально-морфологическая оценка эффективности антибластической терапии глиом головного мозга. Дисс-я на соискание уч. степени д. мед. н. – К., 1992, 242 с.

15. **Frei K., Gramatzki D., Tritschler I., Schroeder J.J., Espinoza L., Rushing E.J., Weller M.** Transforming growth factor- β pathway activity in glioblastoma. *Oncotarget*. 2015, 6 (8): 5963-5977.

16. **M.J., Fragoulis A., Rümmele P., Lamszus K., Schulz J.B., Weis J., Bogdahn U., Wischhusen J., Hau P., Spang R., Beier D.** The cancer stem cell subtype determines immune infiltration of glioblastoma. *Stem Cells and Dev.* 2012, 21 (15): 2753 – 2761.

17. **Lu Y., Jiang F., Zheng X., Katakowski M., Buller B., To S.S.T., Chopp M.** TGF β 1 promotes motility and invasiveness of glioma cells through activation of ADAM17. *Oncol Rep.* 2011, 25 (5): 1329 - 1335.

18. **Wang L., Liu Z., Balivada S., Shrestha T., Bossmann S., Pyle M., Pappan L., Shi J., Troyer D.** Interleukin-1 β and transforming growth factor- β cooperate to induce neurosphere

formation and increase tumorigenicity of adherent LN-229 glioma cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2012, 3 (5): 1-16.

19. **Mints M., Souchelnytskyi S.** Impact of combinations of EGF, TGF β , 17 β -oestradiol, and inhibitors of corresponding pathways on proliferation of breast cancer cell lines. *Exp Oncol*. 2014, 36 (2): 67 – 71.

20. **Calone I., Souchelnytskyi S.** Inhibition of TGF β signaling and its implications in anticancer treatments. *Exp Oncol*. 2012, 34 (1): 9 – 16.

21. **Dubrovskaya A.M., Souchelnytskyi S.S.** Low-density microarray analysis of TGF β 1-dependent cell cycle regulation in human breast adenocarcinoma MCG7 cell line. *Biopolymers and Cell*. 2014, 30(2): 107-117.

22. **Jia M., Souchelnytskyi S.** Comments on the cross-talk of TGF β and EGF in cancer. *Exp Oncol*. 2011, 33 (3): 170 – 173.

23. **Ueda R., Fujita M., Zhu X., Sasaki K., Kastenhuber E.R., Kohanbash G., McDonald H.A., Harper J., Lonning S., Okada H.** Systemic inhibition of transforming growth factor-beta in glioma-bearing mice improves the therapeutic efficacy of glioma-associated antigen peptide vaccines. *Clin Cancer Res*. 2009, 15 (21): 6551-6559

24. **Lin B., Madan A., Yoon J.-G., Fang X., Yan X., Kim T.-K., Hwang D., Hood L., Foltz G.** Massively parallel signature sequencing and bioinformatics analysis identifies up-regulation of TGFB1 and SOX4 in human glioblastoma. *PLoS ONE*. 2010, 5 (4): e10210.

25. **Zhang J., Yang W., Zhao D., Han Y., Liu B., Zhao H., Wang H., Zhang Q., Xu G.** Correlation between TSP-1, TGF- β and PPAR- γ expression levels and glioma microvascular density. *Oncol. Lett*. 2014; 7(1):95-100.

25. **Liubich L.D., Semenova V.M., Stayno L.P.** Influence of rat progenitor neurogenic cells supernatant on glioma 101.8 cells in vitro. *Biopolymers and Cell*. 2015, 31 (3): 200–208.

26. **Binder D.K., Scharfman H.E.** Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*. 2004, 22 (3): 123-131.

STUDY OF MECHANISMS OF RAT FETAL BRAIN NEUROGENIC CELLS SUPERNATANT INFLUENCE ON THE EXPERIMENTAL GLIOMA C6 CELLS IN CONDITIONS OF CULTIVATION

L.D. Liubich

SI “Romodanov Neurosurgery Institute, National Academy of Medical Sciences of Ukraine”,
Kyiv

lyubichld@gmail.com

One of the approaches of genetic-cell therapy of malignant brain gliomas is the use of neurogenic stem and progenitor cells (NSC/NPC). It is known that NSC/NPC possess great potential of migration to the centers of pathology in the CNS and induce the death of tumor cells in mice and rats; prolonging survival of animals or almost complete inhibition of glioma growth. However, the mechanism of anti-tumor properties of NPC remains unclear. The aim of this study was to identify

possible mechanisms of action of the supernatant of neurogenic cells (SNC) of rat fetal brain of the 14th (E14) day of gestation on cultivated cells of rat glioma C6. The expression of Ki-67, CD133, TGF- β 1 and p53 in cells of control and experimental cultures (with SNC adding to culture medium) were investigated using immunocytochemical reactions. In cytologic preparations the morphometric studies were performed, the mitotic index was calculated.

When exposed to a SNC (0.10 mg/ml for 48 hour) in cultured C6 glioma cells were found: 1) reduction in the total number of cells in culture (1.7 times); 2) reduction in the proportion of cells with an increased number of nucleoli (2.2 times); 3) reduction of the mitotic index (by 4.4 times); 4) reduction in the number of proliferating (Ki-67+) tumor cells (2.7-fold); 5) a 4-fold reduction of CD133+ (stem) tumor cells; 6) reduction of the share of TGF- β 1+ tumor cells (in 1.7 times); 7) 2-fold increase in p53+ cells. The results of performed experiments indicate that the tested supernatant of fetal neurogenic cells contains antitumor humoral factors which inhibit the uncontrolled proliferation of tumor cells, influence the differentiation of stem tumor cells and may trigger programmed cell death (apoptosis).

Key words: glioma C6, primary culture, rat fetal brain neurogenic cells supernatant, Ki-67, CD133, TGF- β 1, p53.

О НАСТОЯЩЕМ И БУДУЩЕМ КОЛЛЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ

И.Н. Кузовкина, М.Ю. Прокофьева, Е.В. Орлова

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, ikuz@mail.ru

На фоне ретроспективного анализа становления и развития коллекции генетически трансформированных корней высших растений рассматривается вопрос о возможности практического использования наиболее интересного и ценного ее объекта – изолированно растущих корней шлемника байкальского, исконно российского лекарственного растения, имеющего ограниченный ареал произрастания, исчезновение которого продолжается, несмотря на внесение его в Красную книгу. Предметом сбора шлемника являются корни растения, содержащие комплекс флавонов – физиологически активных вторичных соединений, для которых характерно проявление высокого гипотензивного, седативного, нейропротекторного, анксиолитического, противовоспалительного и гепатопротекторного

действия. В последнее десятилетие большое внимание фармакологов привлекает изучение цитотоксической активности флавонов, в особенности вогонина, минорного флавона корней шлемника, с характерным для него селективным действием на апоптоз только онкогенных клеток, а также его адьювантным свойством (способностью снижать миелосупрессию у пациентов, вызванную используемыми при химиотерапии препаратами). Отсутствие и сложность интродукции ценного лекарственного растения послужили причиной введения в культуру *in vitro* генетически трансформированных корней (hairy roots) шлемника с целью оценки их способности к биосинтезу корнеспецифичных метаболитов. Для линии стабильно растущих в течение 20 лет корней шлемника характерен интенсивный рост и образование в них корнеспецифичных флавонов, однако с несколько иным их соотношением. Это обеспечило возможность разработки биоконверсионного гидролиза основных компонентов корней и получения в итоге экологически чистого лекарственного сырья с повышенным содержанием в нем селективно действующего цитотоксического флавона вогонина, химический синтез которого пока не дал положительных результатов. На примере шлемника байкальского дается оценка факторов, способствующих или препятствующих осуществлению непосредственной реализации практического использования уникальных объектов Коллекции генетически трансформированных корней ценных лекарственных растений.

Ключевые слова: коллекция генетически трансформированных корней, шлемник байкальский, байкалин- β -D-глюкуронидаза, байкалин, вогонозид, вогонин, биоконверсия.

Коллекция генетически трансформированных корней – самая молодая составляющая часть Российской коллекции клеточных культур (РККК). Она начала формироваться в Институте физиологии растений РАН в конце 80-х годов как систематизированное собрание растительных объектов, объединенное по конкретному морфологическому признаку, и, как всякая коллекция, появление ее преследовало свои определенные цели. Основным стимулом для ее создания послужили трагические последствия аварии на Чернобыльской АС, которые привели к сильному загрязнению земельных участков, предназначенных для выращивания ценных растений, служивших лекарственным сырьем для приготовления аптечных галеновых препаратов, разрешенных Фармакопейным Комитетом СССР. По времени эти события совпали с появлением первых публикаций, доказавших реальность получения изолированно растущих *in vitro* корней двудольных растений в результате их сокультивирования с

Agrobacterium rhizogenes, что обеспечило возможность подключения группы сотрудников Института к освоению способа инициации неопластического корнеобразования (ризогенеза) в стерильных условиях (1, 2).

Первым растением, на котором нами к 1988 году была отработана технология проведения генетической трансформации рRi T-ДНК с целью получения изолированно растущих в условиях *in vitro* корней, было лекарственное растение гармала обыкновенная (*Peganum harmala*), исключенное в свое время из Фармакопеи СССР 1960 г. издания, но до сих пор широко используемое в традиционной медицине восточных стран. Выбор растения был чисто тактическим и определялся тем, что его корни синтезируют β -карболиновые алкалоиды (гармин, гармол, гармалин и гармалидин), имеющие интенсивную и очень специфическую флуоресценцию, которая облегчает детекцию образующихся вторичных метаболитов в корнях интактного растения и в корнях, росших в условиях *in vitro* (3). К тому же в составе объектов рабочей группы того времени уже была недифференцированно росшая каллусная ткань, причем именно корневого происхождения, что обеспечило возможность сравнения способности к сохранению биосинтеза корнеспецифичных метаболитов в неорганизованно растущих клетках и в культивируемых *in vitro* корнях одного и того же растения (4). На примере введенных в культуру *in vitro* генетически трансформированных корней (так называемых *hairy roots*) гармалы обыкновенной, было наглядно доказано, что синтез корнеспецифичных для растения вторичных метаболитов в них с успехом сохраняется, причем на уровне, сопоставимом с их содержанием в корнях интактного растения (5). Именно этот пример послужил основанием для введения нами в культуру *in vitro* корней как тривиальных лекарственных растений, издавна используемых в отечественной медицинской практике - алтея (*Althaea officinalis* L.), валерианы (*Valeriana officinalis* L.), шалфея (*Salvia officinalis* L.), бархатцев (*Tagetes patula* L.), солодки (*Glycyrrhiza uralensis* L.), марены (*Rubia tinctorum* L.), так и растений, интродукция которых у нас невозможна или по каким-то причинам затруднена - витании снотворной (*Withania somnifera*), раувольфии змеиной (*Rauvolfia serpentina* L.), руты душистой (*Ruta graveolens* L.) (6). Так постепенно увеличивалось количество объектов, вовлеченных в различные направления работы Группы специализированного метаболизма корней ИФР РАН, что и привело к осознанию необходимости создания коллекции *hairy roots*. Все выше упомянутые объекты коллекции были введены в культуру *in vitro* непосредственно сотрудниками группы, поэтому можно

говорить именно о создании коллекции, а не о собирании уже готовых объектов по единому морфологическому признаку. Однако необходимость привлечения для инициации ризогенеза pRi T-ДНК почвенной бактерии привела нас уже к сбору различных диких (природных) штаммов почвенной агробактерии (*Agrobacterium rhizogenes*) из существующих специализированных коллекций, в чем нам оказывали помощь отечественные и зарубежные коллеги. С течением времени к нам стали обращаться сотрудники различных институтов России, Белоруссии, Украины, Киргизии, Армении и других стран с просьбой оказания им помощи при получении *hairy roots* интересующих их растений. В случае проведения совместной работы, приводившей к успешному введению в культуру *in vitro* линии корней нового растения, право на ее дальнейшее использование сохраняли как сотрудники нашего института, депонировавшего эту линию в коллекцию, так и коллеги стороннего института. То есть в случае утраты данной линии корней по какой-либо причине коллеги по совместной работе имели возможность получить ее повторно, поскольку она была введена в культуру *in vitro* при их непосредственном участии, и они являлись соавторами линий корней, официально включенных в коллекцию. Одновременно с этим можно было получить у нас и штаммы *Agrobacterium rhizogenes* для самостоятельного проведения генетической трансформации.

Особенно плодотворной была десятилетняя совместная работа с коллегами Института биотехнологии растений Национальной академии наук Киргизской республики, которая была поддержана двумя международными фондами - ISTC (МНТЦ) # KR-973 2004-2007 гг. и SNSF (Swiss National Science Foundation) # IZ73Z0_1/27969 2009-2013 гг. В ходе этой кооперации мы располагали большим выбором семян эндемичных растений, собранных киргизскими коллегами во время экспедиций. В результате этой работы были введены в культуру *in vitro* корни четырех редких лекарственных растений рода *Hedysarum*, родственных с сибирским копеечником чайным (*Hedysarum theinum* L.), корни софоры (*Sophora korolkovii* Koehne), а также корни шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.), эндемичного растения, родственного со шлемником байкальским (*Scutellaria baicalensis* Georgi.) – нашим основным растительным объектом (7).

Реальность успешного использования объектов коллекции генетически трансформированных корней в качестве модельных систем для изучения физиологических и биохимических деталей образования в растениях корнеспецифичных вторичных веществ была документально подтверждена сотрудниками Группы специализированного метаболизма

корней уже в начале 90-х годов (6). На очереди стояло рассмотрение возможности и перспективности практического использования некоторых объектов коллекции. Имеется в виду крупномасштабное культивирование (*large-scale culture*) изолированно растущих корней особенно ценных растений с целью получения экологически абсолютно чистого лекарственного сырья, способного восполнить или даже заменить традиционно используемое сырье, которое зачастую бывает или дефицитно или же загрязнено ксенобиотиками и поллютантами. Следует подчеркнуть, что генетически трансформированные корни, входящие в нашу коллекцию, характеризуются не только способностью к длительному и стабильному росту на питательных средах простого состава, не содержащих ростовые гормоны (ауксины и кинетин), но и тем, что при их получении были использованы дикие (не модифицированные) штаммы почвенной агробактерии. Химический анализ состава вторичных метаболитов основных линий культивируемых *in vitro* корней коллекции показал многолетнюю стабильность их биосинтеза, а также идентичность их состава со спектром вторичных соединений корней ювенильных растений и их сопоставимость с составом веществ, содержащихся в корнях взрослого растения. Эти особенности корневых культур коллекции свидетельствовали о возможности круглогодичного получения с их помощью альтернативного экологически абсолютно чистого лекарственного сырья (8).

Ретроспективный анализ литературных данных, полученных за последние 30 лет существования метода культивирования *pRi* Т-ДНК трансформированных корней, показал, что за этот период в лабораториях разных стран были введены в культуру *in vitro* корни более 400 видов растений, которые служили удобной модельной системой для изучения как закономерностей образования вторичных метаболитов в корнях растений, так и механизмов их взаимоотношения с представителями почвенной микрофлоры (9). По мнению французских исследователей, эра расцвета этого метода к 2006 году раскрыла его недооцененный потенциал и определила реальную перспективность его практического использования в современных биотехнологических разработках (10). Видимо, настал тот долгожданный период, когда уже можно и даже нужно было делать ставку на определенную отдачу от культивируемых в условиях *in vitro* *pRi* Т-ДНК трансформированных корней определенных видов растений, которая будет представлять интерес для медицинской и пищевой промышленности, а также для косметологии. Этому энергично способствовали инженерные разработки разнообразных способов культивирования изолированно растущих корней, позволяющие рассчитывать на их

круглогодичное выращивание в биореакторах, которому обязательно должен предшествовать тщательный выбор определенной линии *hairy roots* и оптимизация ее роста, а также ее продуктивности в лабораторных условиях (11, 12). Сохранению таких перспективных линий корней, отобранных для крупномасштабного культивирования, может способствовать их сбор в виде коллекции, аналогичной нашей, появление которой неизбежно для групп научных сотрудников различных институтов, увлеченных работой с *hairy roots* и заинтересованных в реализации своего коллекционного материала. При этом немаловажную помощь в деле сохранения особо ценных линий корней, успешно апробированных в биореакторах определенного типа, может оказать инкапсулирование фрагментов инокулята в альгинате натрия в виде стерильных искусственных семян с последующим сохранением их при 4°C, что нами было апробировано, или криопрезервация растительного материала (13, 14). Большое значение при такой подготовке к практическому использованию корневой линии, отобранной для крупномасштабного культивирования, имеет анализ всех параметров роста корней и особенно деталей биосинтеза в них вторичных метаболитов.

По такому пути шла наша группа в течение последних 20-ти лет при работе с одним из основных объектов коллекции – с *hairy roots* шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi.). Само растение заслуживает большого внимания по ряду следующих причин: оно входит в состав «элитных» лекарственных растений Китая, Японии, Кореи и Монголии, где издавна используется в традиционной и официальной медицине благодаря высокой и разносторонней физиологической активности вторичных метаболитов – в основном, флавонов, которые синтезируются и накапливаются в его корнях. До 1991 года шлемник входил в состав отечественной Фармакопеи, но затем был из нее исключен из-за отсутствия сырья, ввиду чего ему присвоили статус исчезающего лекарственного растения и в 1992 году включили в Красную книгу, что, к сожалению, не мешает его неконтролируемому сбору. Фармакологические свойства шлемника байкальского, обусловленные высокой и разносторонней физиологической активностью корнеспецифичных флавонов, были долгое время предметом совместной работы группы российских специалистов из НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск) и украинских фитохимиков из Государственного научного центра лекарственных средств (г. Харьков). Результаты этой работы были опубликованы в небольшой, но очень информативной книге (15). Отсутствие сырья шлемника байкальского и незавершенность работы с этим ценным растением послужили в некоторой степени

импульсом для введения в 1996 году в культуру *in vitro* его *hairy roots*, которые стабильно растут уже в течение 20 лет, сохраняя при этом способность к биосинтезу всего набора корнеспецифичных вторичных соединений (16). Основными метаболитами корней шлемника являются флавоны, которые обладают широким спектром физиологической активности – от антимикробной до цитотоксической. Среди них центральное место занимают две группы флавонов – байкалеин и его глюкуронид байкалин, который считается биохимическим маркером корней шлемника, а также вогонин со своим глюкуронидом – вогонозидом (17). Агликоны – байкалеин и вогонин относятся к числу мощных антиоксидантов, что лежит в основе их высокой физиологической активности. Концентрация суммы четырех флавонов в *hairy roots* шлемника, имеющих первичный тип роста, в 3–4 раза ниже содержания флавонов в корнях многолетнего растения шлемника, обладающих способностью к росту за счет утолщения, но этот недостаток с успехом компенсируется (по времени и по затратам) высокой скоростью круглогодичного роста корневой культуры в относительно простой питательной среде. Многократно проведенные химические анализы количественного и качественного состава флавонов *hairy roots* шлемника при разных условиях культивирования выявили их одну стабильно проявляющуюся особенность, которая отличала корневые культуры от корней целого растения: в них было иное количественное соотношение основных групп флавонов – байкалеина с байкалином и вогонина с вогонозидом. Если в корнях интактного растения доминирующей была первая группа флавонов с глюкуронидом байкалином, то в нашей линии *hairy roots* доминировала вторая группа, возглавляемая глюкуронидом вогонозидом (18). Все попытки изменить это соотношение за счет изменения состава питательной среды или путем проведения изолированно росших корней через каллусогенез с повторной инициацией ризогенеза были безрезультатны, настолько стабильным было преобладание группы вогонина. Однако эта особенность состава флавонов в нашей линии корней оказалась очень полезной после 2007 года, когда появились первые публикации о селективном действии вогонина на апоптоз только онкогенных клеток животных и о его способности смягчать действие обычно применяемых при химиотерапии цитотоксических препаратов, вызывающих нежелательные побочные эффекты (19, 20). Избирательная цитотоксичность природного растительного соединения – явление очень редкое, поэтому вогонином заинтересовались не только фармакологи, но и фитохимики, что объяснялось большим спросом на этот флавоны, концентрация которого в корнях целого растения не превышает 1%, а химический способ его

получения пока не дал положительных результатов. Следует отметить, что вогонин и особенно его глюкуронид вогонозид не привлекали ранее к себе такого пристального внимания, так как они считались флавонами, сопровождающими основные метаболиты корней шлемника – байкалеин и байкалин, суммарная концентрация которых в корнях целого растения значительно превышает содержание второй пары соединений. Во многих публикациях до 2007 года, посвященных фитохимии корней шлемника, просто отсутствовали данные о вогонозиде, несмотря на то, что он является глюкуронидом вогонина. В связи с обнаружением селективного действия вогонина ситуация резко изменилась и стало ясно, что повышение содержания в корнях шлемника ценного флавона можно достичь путем кислотного или ферментативного гидролиза сырья, тем более, что концентрация в нем вогонозида, как правило, значительно выше, чем его агликона. По этому пути пошли, в основном, китайские фитохимики, разработавшие специальные громоздкие устройства для проведения биоконверсии измельченных корней шлемника с использованием кавитации и экзогенных гидролитических ферментов, для чего, так или иначе, требуется большое количество лекарственного сырья, которого в России нет (21).

Учитывая, что в нашей линии корней шлемника доминирующим флавоном является не байкалин, как в корнях целого растения, а вогонозид, нам удалось разработать иной биоконверсионный метод получения экологически чистого лекарственного сырья, обогащенного вогонином, за счет активации присутствующей в культивируемых *hairy roots* эндогенной (конститутивной) β -глюкуронидазы под названием *baicalin- β -D-glucuronidase* (далее sGUS). Интересная особенность растений рода *Scutellaria* состоит в том, что только в них присутствует этот гидролитический фермент, который функционирует на протяжении всего цикла их роста и развития, принимая участие в ответной реакции корней на стрессовое воздействие и обеспечивая накопление в перидерме одревесневших корней целых растений флавонов-агликонов – байкалеина и вогонина (22, 23). На примере нашей линии *hairy roots* шлемника байкальского было показано, что sGUS очень быстро реагирует на некоторые стрессовые факторы. Об этом можно было судить опосредовано – по резкому увеличению в них содержания байкалина и вогонина – свободных агликонов, превышение концентрации которых выше сбалансированной с глюкуронидами нормы токсично для корней с первичным типом роста, что сопровождается сначала потемнением корней, а затем их гибелью. Нами было впервые гистохимически доказано, что основным местом локализации sGUS в *hairy roots*

двух видов шлемника нашей коллекции являются апексы корней (меристема, зона растяжения и дифференциации), а также поверхностно расположенные эпидермальные клетки и многочисленные корневые волоски (24). Таким образом, *hairy roots*, наподобие монослойного чехла, защищены от действия на них стрессовых факторов, с учетом также одновременной надежной защиты меристематических окончаний, количество которых в одной культуральной колбе может достигать до двухсот. При подобной готовности *hairy roots* к обороне появилась возможность использования активации конститутивной sGUS корней для метаболизации флавонов-глиукуронидов (байкалина и вогонозида) в свободные агликоны (байкалеин и вогонин). Самым простым и надежным способом подобной активации оказался перевод корней на стадии их стационарного роста в колбах в состояние кратковременной гипоксии, что было осуществлено с помощью перевода корней из качалочного способа культивирования в жидкой питательной среде в состояние 5-ти часовой статики. Подобного рода стрессовое воздействие на эндогенный гидролитический фермент корней шлемника привело к метаболизации почти 95% вогонозида в вогонин и к 5-кратному увеличению концентрации агликона в *hairy roots*. В результате итоговая концентрация вогонина составила почти 2.5% от веса сухих корней, что в 2.5 раза превышает его содержание в корнях целого растения (25).

Для реализации такого относительно простого биоконверсионного способа получения растительного сырья, обогащенного флавоном с таргетной цитотоксической активностью, дополненной его адъювантной способностью, было необходимо, прежде всего, убедиться в том, что линия *hairy roots* сохранит свою уникальную способность к доминирующему синтезу вогонозида над байкалином в условиях культивирования в биореакторе, приспособленном для выращивания изолированных корней шлемника в стерильных условиях. Конструкция такого рода биореактора с туманным орошением корней была разработана в немецкой фирме ROOTec bioactives GmbH, созданной при университете Гайдельберга в 1999 году специально для получения больших масс *hairy roots* ценных и редких растений с целью их дальнейшего использования в косметологии и в пищевой промышленности. Позднее эта фирма переехала в Швейцарию (г. Базель), где просуществовала до марта 2016 года. Необходимость быть в курсе развития новых технологий культивирования корней привела нас в 2006 году к контактам с этой фирмой, а позднее, в 2011 году к непосредственному знакомству с ее сотрудниками и с оснащенностью фирмы оборудованием. Не имея финансовой и технической возможностей для создания биореактора в наших условиях, было принято решение об

апробации культивирования линии корней шлемника в биореакторе фирмы ROOTec. Результаты показали, что *hairy roots* шлемника прекрасно растут в условиях туманного орошения, сохраняя при этом свою биохимическую особенность – превалирующее содержание вогонзида над байкалином (рисунок). Подобного рода биореактор был бы очень удобен и для создания гипоксии на последней стадии культивирования корней с целью активации в них эндогенной GUS и последующего сбора лекарственного сырья, обогащенного вогонином. Однако мечта о создании подобного биореактора в наших условиях оказалась невыполнимой из-за отсутствия для ее претворения в жизнь финансовой и технической базы. Следует отметить, что сотрудники Группы специализированного метаболизма корней ИФР РАН еще до разработки биоконверсионного способа увеличения содержания в корнях шлемника вогонина с помощью активации в них эндогенной sGUS предприняли все усилия для проведения компетентного сопоставления фармакологической ценности культивируемых *in vitro* и нативных корней шлемника. Культивирование *hairy roots* шлемника в колбах в лабораторных условиях, несмотря на некоторые неудобства, позволяло получать в итоге большую массу корней, достаточную как для аналитической работы, так и для проведения тестирования физиологической активности получаемых из нее экстрактов на базе НИИ фармакологии СО РАМН, сотрудники которого заинтересовались новым типом лекарственного сырья шлемника.

Имея большой опыт многолетней работы с этим растением, они высоко оценили физиологическую активность экстрактивных метаболитов *hairy roots* и ее сходство с активностью обычного лекарственного сырья шлемника, которого они были лишены для продолжения своих фармакологических исследований уже к началу 20-го столетия. По ряду параметров было особо отмечено стимулирующее действие экстрактов из *hairy roots* шлемника на процессы кроветворения в условиях миелосупрессии подопытных животных, вызванной таким жестко действующим противоопухолевым препаратом как паклитаксел. Из заключения директора НИИ фармакологии академика РАМН А.М. Дыгая (2009 год): «Сотрудники НИИ фармакологии Томского научного центра СО РАМН, заинтересованные в продолжении работы по созданию новых лекарственных препаратов на основе корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georg.), провели исследование специфической

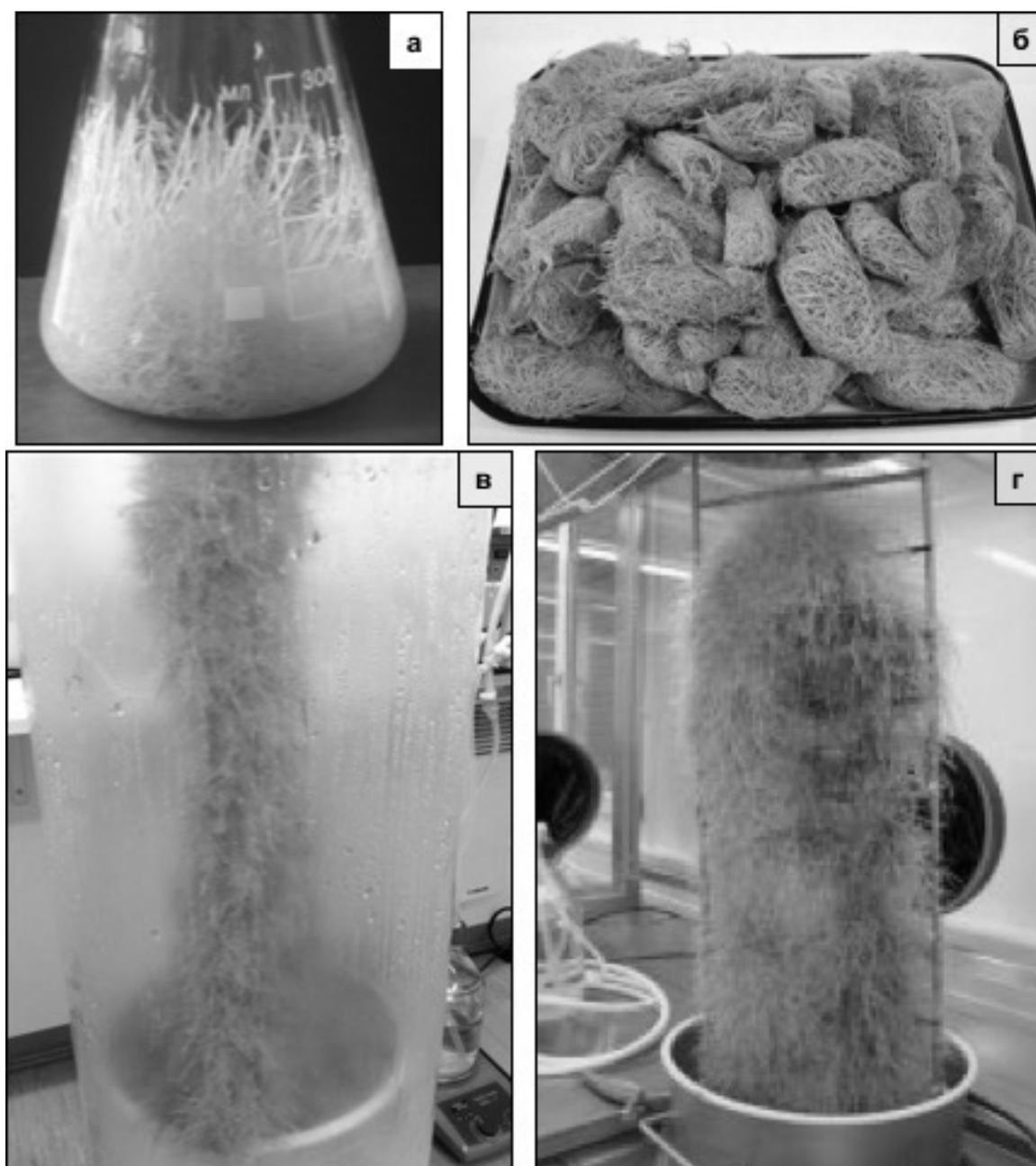


Рисунок. *Hairy roots* шлемника байкальского при выращивании в колбах на качалке и в биореакторе с туманным орошением швейцарской фирмы ROOTес: а – 6-недельные *hairy roots* (ростовой индекс 22); б – «урожай» сухих *hairy roots*, выращенных в 36 колбах; в – 8-недельные *hairy roots* в закрытом биореакторе; г – «урожай» 12-недельных *hairy roots* весом 2 кг (ростовой индекс 33).

фармакологической активности корней этого растения в объеме требований Фармакологического комитета, и корней, культивируемых в условиях *in vitro* (из Коллекции генетически трансформированных корней растений ИФР РАН). При сравнении результатов тестирования активности культивируемых корней с активностью нативных корней

исчезающего вида лекарственного растения, внесенного в Красную книгу, была установлена полная идентичность экстрактов, приготовленных из корней целых растений и корней коллекционного происхождения, выращенных в условиях *in vitro*, по проявлению ими ноотропной и гемостимулирующей активности.

Острый дефицит лекарственного сырья шлемника байкальского, создает основное препятствие для введения в клиническую практику лекарственных средств из этого растения, высокая эффективность которого показана при широком круге заболеваний, таких как сосудистые деменции и атеросклероз, анемии различного происхождения. Препараты шлемника байкальского зарекомендовали себя как эффективные средства коррекции нарушения кроветворения при терапии онкологических заболеваний противоопухолевыми препаратами. В связи с этим считаем целесообразным и перспективным использование экологически чистого лекарственного сырья нового типа, получаемого биотехнологическим способом из культивируемых корней шлемника, депонированных в КГТК ИФР РАН, для производства препаратов с церебропротекторной и гемостимулирующей активностью. НИИ фармакологии планирует проведение дальнейшей работы по созданию форм лекарственных препаратов из альтернативного лекарственного сырья шлемника байкальского и проверку их фармакологической активности в условиях клиники». По результатам проведенного томскими коллегами тестирования *hairy roots* шлемника байкальского защищена одна диссертация, получен один патент и опубликованы три статьи (26–29). Однако для клинических испытаний требуется большая масса лиофилизированных корней шлемника, получать которую можно только при культивировании *hairy roots* в условиях стабильно функционирующего специализированного биореактора, в котором, как нами уже было доказано, сохраняется уникальное свойство данной линии корней. Таким образом, к настоящему времени стало ясно, что разработанный нами биоконверсионный способ увеличения содержания вогонина в коллекционной линии *hairy roots* шлемника байкальского путем активации в них эндогенной sGUS при переводе корней на стадии стационарного роста в состояние гипоксии может стать существенным и чрезвычайно полезным дополнением к крупномасштабному культивированию корней ценного лекарственного растения в условиях биореактора. Хочется верить, что инновационная разработка, в которой использованы природные качества шлемника байкальского (эндогенная sGUS) в сочетании с обнаруженной редкой для корней растений аномалией соотношения физиологически активных флавонов в длительно растущей

линии *hairy roots* (превалирование вонозоида над байкалином) будет все-таки реализована и что это произойдет именно в нашей стране.

Список литературы

1. **Chilton M.D., Tepfer D.A., Petit A., David C., Casse-Delbart F., Tempe J.** *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 1982, 295: 432–434.
2. **Flores H.E., Hoy M.W., Pickard J.J.** Secondary metabolites from root cultures. *Trends in Biotech*, 1987, 5: 64–69.
3. **Кузовкина И.Н., Гохар А., Альтерман И.Е.** Образование β-карболиновых алкалоидов в трансформированной ризогенной культуре гармалы обыкновенной. *Физиология растений*, 1989, 36: 1022–1027.
4. **Гохар А., Кузовкина И.Н.** Алкалоиды каллусных тканей гармалы обыкновенной. *Физиология растений*, 1988, 35: 937–944.
5. **Berlin J., Mollenschott C., Greidziak N., Erdogan S., Kuzovkina I.** Affecting secondary product formation in suspension and hairy root cultures - a comparison. In: Nijkamp H.J.J., Van der Plas L.H.W., Van Aartijk J. (eds.) *Progress in plant cellular and molecular biology*: Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, the Netherlands, 1990: 763–768.
6. **Кузовкина И.Н.** Культивирование генетически трансформированных корней растений: возможности и перспективы использования в физиологии растений. *Физиология растений*, 1992, 39: 1208–1214.
7. **Кузовкина И.Н., Прокофьева М.Ю., Умралина А.Р., Чернышева Т.П.** Морфологические и биохимические особенности генетически трансформированных корней шлемника андрахновидного. *Физиология растений*, 2014, 61: 1–11.
8. **Kuzovkina I.N.** Genetically transformed roots of medicinal plants as a potential source of pharmaceutically valuable compounds. In: Skrijabin K.G. (ed.) «*Plant Biotechnology and Molecular Biology*», The Cobiotech Information Centre, Moscow, 1993, pp. 44–52.
9. **Kuzovkina I., Schneider B.** Genetically transformed root cultures – generation, properties and application in plant sciences. In: K.Esser, U.Lüttge, W.Beyschlag, J.Murata (eds.) «*Progress in Botany*», Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg, 2006, 67: 275–314.
10. **Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P.** Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends Biotechnol.*, 2006, 24: 403–409.
11. **Srivastava S., Srivastava A.K.** Hairy root culture for mass production of high-value secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2007, 27: 29–43.
12. **Georgiev M., Pavlov A., Bley T.** Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2007, 74: 1175–1185.
13. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** «Искусственные семена» как способ сохранения и оздоровления культивируемых *in vitro* корней лекарственных растений. *Физиология растений*, 2011, 586: 461–468.
14. **Kim H.-H., Popova E.V., Yi J.-Y., Cho G.-T., Park S.-U., Lee S.-C., Engelmann F.** Cryopreservation of hairy roots of *Rubia akane* (nakai) using a droplet-vitrification procedure. *CryoLetters*, 2010, 31: 473–484.
15. **Гольдберг В.Д., Дыгай А.М., Литвиненко В.И., Попова Т.П., Суслов Н.И.** Шлемник байкальский: фитохимия и фармакологические свойства. Изд. Томского университета, 1994, 223 с.

16. Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Альтерман И.Е., Карначук Р.А. Образование флавоноидов в трансформированных корнях *Scutellaria baicalensis* и пути их регуляции. Физиология растений, 2001, 48: 523–528.

17. Kovacs G., Kuzovkina I., Szoeko E., Kursinszki L. Determination of flavonoids in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Chromatogr.*, 2004, 60: 81–85.

18. Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Ковач Д., Сёке Е., Вдовитченко М.Ю. Флавоны генетически трансформированных корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) и индукция их образования при элиситации метилжасмонатом. Физиология растений, 2005, 52: 90–96.

19. Himmji M., Ohtsuki T., Fukazawa E., Tanaka M., Yazaki S., Ui S., Nishio K., Yamamoto H., Tasaka K., Mimura A. Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Letters*, 2007, 245: 269–274.

20. Wu X., Zhang H., Salmani J.M.M., Fu R., Chen B. Advances of wogonin, an extract from *Scutellaria baicalensis*, for the treatment of multiple tumor. *OncoTargets and Therapy*, 2016, 9: 2935–2943.

21. Dong L.-L., Fu Y.-J., Zu Y.-G., Luo M., Wang W., Li C.-Y., Mu P.-S. An enhanced preparation and purification of the major antioxidants baicalein and wogonin from *Scutellariae radix*. *Food Chemistry*, 2012: 430–436.

22. Hirunuma M., Shoyama Y., Sasaki K., Sakamoto S., Taura F., Shoyama Y., Tanaka H., Morimoto S. Flavone-catalyzed apoptosis in *Scutellaria baicalensis*. *Phytochemistry*, 2011, 72: 752–760.

23. Tani T., Katsuki T., Kubo M., Arichi S. Hisochemistry. VII. Flavones in *Scutellaria Radix*. *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, 33: 4894–4900.

24. Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Прокофьева М.Ю. Перспективы использования культивируемых *in vitro* корней шлемника байкальского как источника селективного цитотоксического флавоноидов. Материалы докладов VIII Международного симп. «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», 2012: 353–359.

25. Кузовкина И.Н., Гусева А.В. Культивирование *in vitro* генетически трансформированных корней шлемника байкальского как биотехнологический способ получения флавоноидов с селективной цитотоксической активностью. Сборник статей симпозиума «Биотехнология и общество в XXI веке». Барнаул, изд. Алтайского университета, 2015: 45–53.

26. Федорова Е.П. Миелотоксичность противоопухолевого препарата паклитаксела и ее фармакологическая коррекция. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Томск, 2011.

27. Дыгай А.М., Суслов Н.И., Зюзьков Г.Н., Кузовкина И.Н., Жданов В.В., Удут Е.В., Гусева А.В., Вдовитченко М.Ю., Шилова И.В., Смирнов В.Ю., Чуринов А.А., Воронова О.Л., Симанина Е.В., Неупокоева О.В., Федорова Е.П. Средство, обладающее гемостимулирующим, антимулагенным, противоопухолевым, церебропротекторным, антигипоксическим, ноотропным, ангиопротекторным и противоневротическим действием. Патент РФ № 2438691, 09.11.2010.

28. Неупокоева О.В., Воронова О.Л., Чуринов А.А., Суслов Н.И., Шилова И.В., Кузовкина И.Н. Коррекция цитогенетических эффектов паклитаксела и цисплатина экстрактом корней шлемника байкальского. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, 2013, 76: 24–27.

29. Неупокоева О.В., Федорова Е.П., Ермолаева Л.А., Филонова М.В., Чуринов А.А., Воронова О.Л., Фомина Т.И. Фармакологическая коррекция гено- и миелотоксичности

паклитаксела экстрактом из культуры hairy root шлемника байкальского. Экологическая генетика, 2015, 13, № 4, DOI: <http://dx.doi.org/10.17816/ecogen13416-21>

THE PRESENT AND THE FUTURE OF THE COLLECTION OF GENETICALLY TRANSFORMED PLANT ROOTS

I. N. Kuzovkina, M. Yu. Prokofieva, E.V. Orlova

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, Moscow, ikuz@mail.ru

Against the background of retrospective analysis of the formation and development of the collection of genetically transformed roots of higher plants, the question is considered of practical use of the most interesting and valuable collection specimen, namely isolated growing roots of *Scutellaria baicalensis*, a native Russian medicinal plant that has a limited growing area and still disappears in spite of its introduction into the Red Book. The subject of *Scutellaria baicalensis* collecting are its roots containing a complex of flavones, the physiologically active secondary compounds, which are characterized by strong hypotensive, sedative, neuroprotective, anxiolytic, anti-inflammatory and hepatoprotective actions. For last decade the attention of pharmacists is more and more drawn towards studying of cytotoxic activity of flavonoids, especially the wogonin, which is the minor flavone of *Scutellaria baicalensis* roots. The wogonin has a selective effect on apoptosis only of cancer cells and some adjuvant characteristics (the ability to reduce among the patients a myelosuppression caused by the chemotherapy). General lack of this valuable medicinal plant and difficulties of its introduction in vivo caused the introduction of *Scutellaria baicalensis* genetically transformed roots (hairy roots) in vitro culture in order to evaluate their ability to root-specific metabolites biosynthesis. The line of the *Scutellaria baicalensis* roots, which are stably growing for 20 years, is characterized by intensive growth and formation of root-specific flavones, though with slightly different ratio. This allowed the opportunity to develop bioconversion hydrolysis of the main components of the roots and to obtain ecologically pure medicinal raw material with a high content of selectively acting cytotoxic flavone, the wogonin, chemical synthesis of which still has not given the positive results. On the example of *Scutellaria baicalensis* there is given the evaluation of the factors which help or hinder in implementation of the practical usage of the unique objects in the Collection of genetically transformed roots of medicinal plants.

Keywords: collection of genetically transformed roots, hairy roots, *Scutellaria baicalensis*, baicalin- β -D-glucuronidase, baicalin, wogonoside, wogonin, bioconversion.

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ
КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ГИСТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

В.М.Семенова, Н.И.Лисяный, Л.Н.Бельская, В.Д.Розуменко, Л.П.Стайно, Д.М.Егорова

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

seveme22@rambler.ru

В статье представлен обзор литературы, освещающий дискуссионные вопросы воздействия мезенхимных стволовых клеток (МСК) из различных тканевых источников на активность роста опухолей разного гистогенеза, включая глиальные опухоли головного мозга животных и человека. Представлены также собственные результаты изучения воздействия культивированных фибробластоподобных клеток (ФПК) из жировой ткани (ЖТ) крыс на гистобиологические характеристики экспериментальной глиомы крыс (штамм 101.8). Животным подопытной группы была произведена внутримозговая имплантация суспензии опухолевых клеток глиомы совместно с культивированными ФПК из ЖТ крыс. При сравнительном гистологическом исследовании ткани глиомы у крыс подопытной группы выявлены морфологические признаки цитотоксического воздействия ФПК на клетки глиомы и значительное уменьшение числа митозов. В тоже время, показатели выживаемости подопытных крыс были достоверно увеличены по сравнению с контрольной группой, что подтверждало ингибирующее воздействие ФПК из ЖТ на рост глиомы *in vivo*. В экспериментах *in vitro* исследовано воздействие супернатантов от 8-сут. культур ФПК из ЖТ человека на культивированные клетки экспериментальной глиомы крыс и глиобластомы человека. Во всех вариантах эксперимента обнаружено цитодеструктивное дозозависимое воздействие тестируемого супернатанта на клетки глиом. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ФПК из ЖТ способны, подобно МСК, ингибировать рост опухолевых клеток злокачественных глиом головного мозга как *in vivo*, так и *in vitro*.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, фибробластоподобные клетки, жировая ткань, глиома, глиобластома, культура ткани.

Интенсивные исследования последнего десятилетия биологии мезенхимных стволовых клеток (МСК) показали, что наряду с мультипотентными свойствами и способностью дифференцироваться в различные прогениторные типы клеток они проявляют также тропизм к опухолям с трансформацией в опухолеассоциированные фибробласты (1-4). В связи со способностью МСК мигрировать в опухоли, в том числе в опухоли ЦНС, и интегрироваться в их строму, актуальным направлением современной онкологии является разработка метода клеточной терапии с использованием МСК из различных источников. В настоящее время МСК предлагают использовать в качестве транспортеров к клеткам опухолей различных противоопухолевых агентов, таких как интерфероны, цитокины, химиопрепараты, индукторы рецепторного апоптоза, онколитические вирусы (5-7). Препараты на основе МСК уже проходят предклиническую апробацию на ряде экспериментальных моделей опухолей различного гистогенеза (8). В то же время активно изучаются особенности воздействия МСК на опухолевый рост. Установлено, что МСК могут быть как промоутерами, так и ингибиторами опухолевого роста. Среди причин таких расхождений указывают на различия использованных моделей опухолевого роста, гетерогенность источников получения МСК, вариабельность доз и сроков введения МСК, видовые особенности экспериментальных животных и ряд других факторов. Выяснение условий, при которых МСК могут проявлять эти свойства, приобретает важное практическое значение для разработки протоколов их клинического применения.

К настоящему времени накопилось большое количество экспериментальных данных о стимулирующем или ингибирующем воздействии МСК на опухолевый рост. Так, Карноуб с соат. (9) показали, что меченые МСК из костного мозга (КМ), введенные иммунодефицитным мышам совместно с клетками рака легкого (в соотношении 1:3), вызывали ускорение роста трансплантированных опухолей и увеличение числа метастазов. Однако МСК стимулировали рост клеток лишь в одной из четырех клеточных линий рака легкого. Установлено также, что МСК из КМ усиливают рост лимфом, рака толстого кишечника, меланомы (10-12). Сообщается, что МСК из КМ взрослого организма и фетальные МСК, введенные животным совместно с клетками рака толстого кишечника (линии SW480 и F-6), не только усиливали рост опухолевых узлов, но и увеличивали в них количество сосудов и очагов некроза, что отражало нарастание агрессивности этих опухолей. При этом оба типа МСК оказывали примерно одинаковое воздействие на опухолевый процесс, хотя биологическая активность

МСК взрослых животных оказалась несколько выше (10). Известно также, что функциональная активность МСК из жировой ткани в большой мере подобна активности воздействия МСК из костного мозга (13).

В ряде исследований установлены ингибиторные эффекты МСК. Так, МСК, введенные животным совместно с опухолевыми клетками (в соотношении 1:1 и 1:10), подавляли рост карциномы толстого кишечника как при введении животным, так и в условиях *in vitro*. В ткани этих опухолей выявлена интенсивная воспалительная реакция в виде макрофагальной и нейтрофильной инфильтрации (14). На моделях карциномы Льюиса и саркомы Капоши крыс наблюдалось статистически достоверное угнетение роста опухолей после внутривенного введения крысам МСК из ЖТ человека (15). Сообщалось также, что фетальные МСК человека, полученные из кожи, угнетали активность опухолевых клеток ряда линий рака печени, снижая их пролиферацию, колониобразование и экспрессию онкогенов *in vivo* и *in vitro* (16).

Обнаружено также, что МСК из КМ тормозили рост клеток рака молочной железы, угнетая экспрессию β -катенина, с-Мус, сурвивина. Предполагается, что ростингибирующий эффект МСК связан с воздействием секретируемого ими протеина Dickkopf1 (DKK-1) – растворимого ингибитора сигнального пути WNT/ β -катенин. Нейтрализация этого протеина антителами или другими факторами отменяла подавляющее воздействие МСК на опухоль (17). МСК из ЖТ ингибировали пролиферацию лейкозных клеток в первичных культурах путем секреции DKK-1 (18). Установлено также, что МСК из КМ подавляли пролиферацию клеток опухоли поджелудочной железы, блокируя клеточный цикл в фазе G-1: при совместном введении МСК и опухолевых клеток животным наблюдали торможение роста опухоли (19). МСК, введенные подкожно в ткань меланомы, тормозили ее рост, индуцируя процессы апоптоза в опухоли. Интересно отметить, что МСК, помещенные в специальную камеру, предотвращающую их контакт с опухолью, не оказывали токсический эффект на опухолевые клетки. Супернатанты прогретых МСК также проявляли блокирующее воздействие на рост культуры опухолевых клеток рака яичка (20). Значительное снижение прогрессии опухоли и увеличение показателей выживаемости крыс с карциномой Герена наблюдалось также при введении животным МСК из ЖТ (21). Дозозависимый противоопухолевый эффект воздействия МСК на опухолевые клетки линии H22 (hepatoma 22) мышей, клетки линии YAC-1 (lymphoma YAC-1) и клетки линии INS-1 (insulinoma INS-1) крыс зарегистрирован в тестах *in vitro* с использованием МТТ (3-4,5 диметилтриазол-2-ил-2,5дифенил-2Н-тетразолиум бромид) и $^3\text{H-TdR}$ (22).

Вопрос о влиянии МСК на гистоструктуру опухолей является дискуссионным. Лишь в отдельных работах показано, что при введении подопытным животным с индуцированными опухолями фетальных МСК или МСК взрослых животных, активация роста опухоли сочеталась с усилением некротических процессов и ангиогенеза в ткани опухоли по сравнению с контрольными животными, которым вводили только опухолевые клетки (23). В опытах Янг с соавт. (24) при подкожной имплантации мышам BALB/c-nu/nu МСК из КМ совместно с опухолевыми клетками линии F6 или SW480 в тканях опухолей обнаружено усиление пролиферации, ангиогенеза и метастазирования.

Результаты изучения воздействия МСК на глиомы головного мозга также разноречивы. Так, МСК из ЖТ человека, введенные вместе с клетками линий глиомы человека (H-460 и U87MG) иммунокомпетентным мышам, стимулировали активность роста опухолей, увеличивая их размер (25). Это поясняется тем, что в присутствии опухолевых клеток МСК способны пролиферировать и тем самым увеличивать массу опухолевой ткани (26). Установлено также, что опухолевые клетки глиом выделяют различные хемоаттрактанты: SDF-1 β (stromal cell-derived factor-1 β), SDF-1 α , ангиогенные цитокины – интерлейкин-8 (ИЛ), TGF- α 1 (transforming growth factor), NT-3 (neurotrophin-3), VEGF (vascular endothelial growth factor), способствующие активному привлечению МСК в ткань опухоли (27). В связи с этим МСК рассматриваются как потенциальные транспортеры для доставки того или иного гена при разработке метода генной терапии в лечении глиом головного мозга (26).

Таким образом, в настоящее время нет единого мнения о направленности воздействия МСК на рост опухолей, поскольку по имеющимся экспериментальным данным они могут проявлять как стимулирующий, так и ингибирующий эффект в отношении опухолей различного гистогенеза, включая глиомы головного мозга.

Предпринимая настоящее исследование воздействия на опухолевые клетки глиом культивированных, адгезивных ФПК, выделенных из стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани, мы предполагали, что в составе популяции этих клеток содержатся МСК. Это предположение было основано на результатах многочисленных исследований биологии МСК, показавших, что при монослойном культивировании они проявляют высокие адгезивные свойства и характерный фенотип ФПК (28-32).

Целью настоящей работы является исследование: 1. особенностей воздействия культивированных ФПК, полученных из СВФ ЖТ крыс, на активность роста и гистоструктуру

внутричерепной злокачественной глиомы головного мозга крыс (штамм 101.8) с учетом сроков выживаемости животных в подопытной и контрольной группах; 2. воздействия супернатантов, полученных от культивированных ФПК из СВФ ЖТ крыс, на опухолевые клетки глиомы (штамм 101.8) в первичных культурах; 3. воздействия супернатантов, полученных от культивированных ФПК из СВФ ЖТ человека, на опухолевые клетки глиобластомы человека в первичных культурах.

Материалы и методы

В работе использовано 54 беспородных белых крыс массой 70-80 г, а также 5 крыс – самок (доноров ЖТ) разведения вивария Института нейрохирургии. Животных содержали в стандартных условиях вивария с соблюдением общепринятых правил по обеспечению гуманного отношения к животным и этических норм согласно Конвенции Совета Европы по биомедицине и соответствующим законам Украины.

Методика забора ЖТ у экспериментальных животных и человека (33, 34). Для получения ЖТ животных умерщвляли эфирным наркозом. После обработки 96° этанолом операционного поля, из паховой области брюшной полости крыс выделяли фрагменты ЖТ и промывали их несколько раз в свежих порциях раствора PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma) без Ca^{2+} и Mg^{2+} . Фрагменты ЖТ человека получали из подкожной жировой клетчатки паравертебральной области у 5 больных в ходе плановых операций по поводу опухолей спинного мозга или позвоночника.

Культивирование ФПК из ЖТ выполняли по протоколу, представленному в статье Кирик и Бутенко (31). Фрагменты ЖТ в стерильных условиях измельчали микроножницами, инкубировали в 0,075 % растворе коллагеназы (тип 1) в течение 60 мин при 37°C при постоянном помешивании. Фермент инактивировали путем добавления (1:1) среды DMEM (Sigma) с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Клетки осаждали центрифугированием 5-10 мин при 1000 об/мин. Надосадочный слой жировых клеток удаляли пипеткой Пастера, осадок ресуспендировали в ростовой среде (DMEM с 10 % ЭТС), центрифугировали в течение 30 мин при 1000 об/мин в градиенте плотности Histopaque (Sigma). Полученную суспензию клеток отмывали дважды в ростовой среде с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 1000 об/мин, фильтровали через нейлоновый фильтр и после осаждения ресуспендировали в ростовой среде. Затем клетки высевали на

дно пластиковых чашек Петри по $5-9 \times 10^6$ клеток на чашку. Осторожно, без круговых движений распределяли клеточную суспензию равномерно по всей поверхности пластика. Культуры содержали в CO_2 -инкубаторе EC160 (Nuve, Турция) в стандартных условиях (5% CO_2 , 95 % влажности, 37°C). Для удаления неадгезированных элементов на следующий день питательную среду в культурах заменяли свежей порцией. Смену культуральной среды проводили через каждые 3-4 суток. Первый пассаж (пересев) проводили при получении 50-70% конfluenceности монослоя (8-10 сут культивирования). Для этого питательную среду заменяли 0,25% раствором трипсина, инкубировали 30 мин при 37°C , осаждали адгезированные клетки с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 1000 об/мин. Клеточный осадок ресуспендировали в ростовой среде и рассаживали по 1×10^6 клеток в чашки Петри. Аналогичным способом получали второй и следующий пассажи. Культуры ежедневно наблюдали в инвертированном микроскопе TS-100 (Nikon, Япония) с проведением прижизненной фотодокументации. Для цитологического исследования часть стромальных клеток из ЖТ культивировали на адгезивных покровных стеклах, предварительно покрытых полиэтиленгликолем (Sigma), в разные сроки наблюдения культуры фиксировали в 10 % нейтральном растворе формалина и окрашивали гематоксилином Караччи.

Получение супернатантов культивированных ФПК. На 2-3 пассаже проводили отбор супернатантов на 8 сут культивирования адгезированных ФПК после центрифугирования кондиционированной среды культур при 1500 об/мин в течение 10 мин. Полученные супернатанты объединяли от 5-6 культур, сохраняли при -20°C и использовали в дальнейших опытах. В культуры глиом супернатанты вносили в объеме 10 мкл и 100 мкл на 1 мл питательной среды.

Получение внутримозговой экспериментальной глиомы крыс. Перевиваемая глиома головного мозга крыс (штамм 101.8) получена из Института морфологии человека РАН, Москва. Первичная индукция и перевивка глиомы осуществлялась путем пункционной имплантации в правое полушарие головного мозга крыс суспензии клеток глиомы в концентрации 2×10^6 в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида на глубину 4 мм (35). Все манипуляции проводили стерильно. Животных содержали в стандартных условиях вивария, ежедневно наблюдали динамику поведенческих реакций до их гибели.

В эксперименте *in vivo* в головной мозг 12 животным вводили культивированные клетки ФПК из СВФ ЖТ крыс совместно с клетками перевиваемой глиомы крыс в концентрации 2×10^6

клеток в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида в соотношении 4:1. 12 животным контрольной группы в головной мозг вводили только клетки опухоли в такой же концентрации. Подопытных и контрольных животных наблюдали до их гибели. Оценивали клинические проявления опухолевого процесса и сроки выживаемости животных.

Для исследования гистоструктуры глиомы головного мозга крыс подопытной и контрольной групп выводили из эксперимента, умерщвляли эфирным наркозом, головной мозг с опухолью извлекали из полости черепа, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, вырезали из него фронтальные блоки с опухолью, которые проводили через стандартную парафиновую заливку. Из блоков изготавливали срезы толщиной 5-6 мкм, окрашивали их гематоксилином-эозином, гематоксилином-пикрофуксином и тионином по Нисслю. Препараты исследовали в бинокулярном светооптическом микроскопе Primo-Star iLED (Carl Zeiss, Германия) с последующей фоторегистрацией на цитоанализаторе изображения Ibas-2000 (Германия).

Исследование воздействия супернатантов, полученных от 8-суточных культур ФПК из ЖТ крыс, на первичные культуры экспериментальной глиомы головного мозга крыс (штамм 101.8) и на культуры глиобластомы человека.

Для получения культур глиальных опухолей использовали фрагменты глиомы головного мозга крыс (штамм 101.8) и биоптического материала 5 глиобластом, полученных в ходе оперативного удаления опухолей головного мозга у нейрохирургических больных. Фрагменты опухолей отмывали от крови, освобождали от сосудов и некротических участков, измельчали микроножницами в фосфатно-солевом буфере, свободном от ионов Ca и Mg, механически диссоциировали с помощью многократного пипетирования. По 1×10^6 клеток наносили на адгезивные покровные стекла, предварительно обработанные полиэтиленгликолем (Sigma), помещали их в чашки Петри в среду 199 и ДМЕМ (1:1) (Sigma) с добавлением 10% телячьей сыворотки, глюкозы и инсулина. Культуры содержали в CO₂-инкубаторе EC160 (Nuve, Турция) при 37°C, 95% влажности и 5% CO₂. Культуры ежедневно прижизненно наблюдали в инвертированном микроскопе TS-100 (Nikon, Япония).

В опыты отбирали культуры с равномерной зоной роста обычно на 5-7 сутки культивирования. В каждом опыте было 3 группы культур: 1. контрольные культуры; 2. культуры, инкубированные с 8-суточным супернатантом ФПК из ЖТ в концентрации 10 мкл/мл; 3. культуры, инкубированные с 8-суточным супернатантом ФПК из ЖТ в концентрации 100

мкл/мл. Продолжительность инкубации культур с супернатантами составляла 24 час. В разные сроки наблюдения культуры фиксировали в 10 % нейтральном растворе формалина и окрашивали гематоксилином Караччи. Препараты исследовали в бинокулярном светооптическом микроскопе Primo-Star iLED (Carl Zeiss, Германия) с последующей фоторегистрацией на цитоанализаторе изображения Ibas-2000 (Германия). На окрашенных препаратах культур визуально оценивали общую архитектуру зоны роста, фенотипические особенности опухолевых клеток, частоту встречаемости митозов.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0 for Windows (Stat Soft Inc., США), Microsoft Office Excel-2007. Для статистической обработки полученных результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По нашим наблюдениям первичные культуры адгезивных клеток из ЖТ в первые дни наблюдения были морфологически гетерогенны и состояли из различных по фенотипу клеток, что связано с разнообразием клеточного состава исходной стромально-васкулярной фракции ЖТ. В ходе монослойного культивирования наблюдалось постепенное освобождение культур от слабоадгезивных клеток и к 10-12 сут. адгезивные клетки приобретали фибробластоподобный фенотип, составляя 50-70% конфлюэнтного монослоя. Суспензию таких фибробластоподобных клеток (ФПК) использовали для внутримозговой трансплантации крысам совместно с клетками глиомы (штамм 101.8), а также для получения супернатантов от 8-суточных культур ФПК.

При оценке клинических признаков опухолевого процесса и выживаемости крыс после внутримозговой инокуляции ФПК совместно с опухолевыми клетками глиомы 101.8 установлено, что в опытной группе животных на 17-е сутки все животные были живы. При этом клинические признаки опухолевого процесса (нахохливание, атаксия, деформация теменных костей черепа) появлялись у них на 3 дня позже в сравнении с животными контрольной группы. Общая продолжительность жизни подопытных животных достоверно ($P < 0,05$) превышала этот показатель в контрольной группе, составляя в среднем соответственно $(27,0 \pm 1,28$ сут) против $(17,5 \pm 0,21$ сут). При этом сроки сохранения

клинических признаков заболевания у животных подопытной группы вдвое превышали этот показатель в контрольной группе.

Таким образом, установлено, что внутримозговая имплантация культивированных ФПК из СВФ ЖТ совместно с опухолевыми клетками глиомы мозга крыс не ускоряет рост опухоли и способствует увеличению общей длительности жизни подопытных животных, что обосновывает предположение о подавляющем воздействии имплантированных ФПК из ЖТ на активность роста этой глиомы *in vivo*.

Это предположение удалось уточнить при сравнительном патоморфологическом исследовании ткани опухолей мозга контрольных и подопытных животных. В контрольных образцах ткань экспериментальной глиомы крыс имела плотноклеточную структуру, сформированную из недифференцированных опухолевых клеток с признаками ядерного полиморфизма и наличием часто встречающихся митотически делящихся клеток – по 2-3 митоза в поле зрения. Среди митозов преобладали патологические типы. Опухоль проявляла также признаки инфильтративного врастания в окружающую нервную ткань, что подтверждает ее злокачественный потенциал.

После совместной инокуляции опухолевых клеток и ФПК из ЖТ в структуре опухолей появились множественные очаги коагуляционного некроза, фрагментирующие паренхиму опухоли, а также мелкие очаги «острого» некроза в виде клеточного детрита с наличием сегментоядерных лейкоцитов. Вокруг некротических очагов определялись рыхлые разрастания фибробластов и аргирофильных волокон. В межнекротических участках опухоли на препаратах подопытных животных определялось значительное уменьшение числа митотически делящихся опухолевых клеток, вплоть до единичных, по сравнению с контрольными образцами этой глиомы.

Правомерно предположить, что обнаруженные изменения в гистоструктуре внутримозговой глиомы головного мозга подопытных крыс отражают проявление частичного цитодеструктивного и цитостатического эффекта воздействия инокулированных клеток ФПК из ЖТ на опухолевые клетки глиомы 101.8, что сопровождается увеличением среднего показателя выживаемости подопытных крыс и подтверждает снижение активности роста этой опухоли.

В поисках возможных пояснений механизмов воздействия культивированных ФПК на опухолевые клетки глиомы первоначально исследован эффект воздействия на культуры этой

опухоли супернатантов 8-суточных культур стромальной фракции ФПК из ЖТ крыс при тестировании концентраций 10 и 100 мкл/мл.

В контрольных культурах экспериментальной глиомы крыс на 4-5 сут. роста преобладали многослойные разрастания преимущественно недифференцированных опухолевых клеток (рис. 1). Лишь местами выявлялись участки сетеобразных структур, отражающие тенденцию к спонтанной дифференцировке части опухолевых клеток по нейроглиальному типу. На цитологических препаратах культур часто определялись патологические митозы. **В опытных культурах** этой глиомы после 24 ч инкубации с супернатантом ФПК от 8-суточных культур в концентрации 10 мкл/мл наблюдалось разрежение зоны роста с появлением дистрофических и некробиотических изменений в большинстве опухолевых клеток (рис. 2). Местами сохранялись лишь многослойные клеточные комплексы. На цитологических препаратах этих культур митотически делящиеся клетки не выявлялись. Увеличение тестируемой концентрации супернатанта до 100 мкл/мл индуцировало еще большее опустошение зоны роста культуры за счет десквамации погибших клеток, а также усиление деструктивных изменений в цитоплазме и ядрах опухолевых клеток, оставшихся прикрепленными к субстрату, с появлением среди них клеток-теней (рис. 3).

Подобные изменения наблюдались при тестировании супернатанта культивированных ФПК из ЖТ человека в культурах глиобластом человека. Как известно, глиобластомы представляют разновидность наиболее злокачественных опухолей головного мозга глиального гистогенеза. В клинических условиях они характеризуются агрессивным инфильтративным ростом, резистентны к традиционной химиолучевой терапии и обуславливают высокую летальность этих больных после частичной резекции. В условиях культивирования опухолевые клетки глиобластом проявляют высокую миграционную и пролиферативную активность, формируют обширную зону роста с признаками клеточного полиморфизма и наличием патологических митозов (рис.4).

В наших опытах 24-часовая инкубация культур глиобластом с супернатантом 8-суточных культур ФПК из ЖТ человека в концентрации 10 мкл/мл также вызывала выраженное разрежение зоны роста в связи с десквамацией части погибших клеток (рис. 5). В прикрепленных к подложке опухолевых клетках обнаруживались признаки дистрофии и некробиоза. С повышением тестируемой концентрации супернатанта до 100 мкл/мл

проявления его цитодеструктивного воздействия на опухолевые клетки культур усиливались (рис. 6).

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что токсическое воздействие на опухолевые клетки глиом супернатанта, полученного от культивированных ФПК из ЖТ, выявляется в культурах, как экспериментальной внутримозговой глиомы крыс, так и глиобластомы головного мозга человека в виде однонаправленного дозозависимого снижения активности роста этих опухолей с проявлением выраженного цитодеструктивного эффекта. Вероятно, культивированные ФПК из ЖТ продуцируют гуморальные факторы, токсичные для опухолевых клеток глиом. По-видимому, после очередной смены питательной среды в культурах ФПК эти факторы снова накапливаются.

Эти данные свидетельствуют о подобном механизме цитотоксического воздействия ФПК из ЖТ на перевиваемую глиому крыс в экспериментах *in vivo*. Обнаруженные в ткани этой опухоли структурные изменения деструктивного характера в сочетании со снижением активности ее роста коррелируют с увеличением продолжительности жизни этих животных в сравнении с контрольной группой.

Результаты наших исследований в отношении характера воздействия культивированных ФПК на глиомы головного мозга *in vivo* и *in vitro* в большой степени согласуются с экспериментальными данными ряда авторов, изучавшими особенности воздействия МСК на глиомы головного мозга. Так, по наблюдениям Хоу с соавт. (36) подобный эффект торможения роста глиомы как в клеточных линиях, так и в ткани глиом человека проявили также МСК, полученные *in vitro*: при совместном введении клеток глиомы и культивированных МСК объем опухоли и плотность ее капиллярной сети значительно снижались. Такой эффект отсутствовал при совместном введении клеток глиомы с иммортализованными нормальными астроцитами человека. Юю с соавт. (25) при совместном культивировании МСК с клетками глиомы обнаружили значительное угнетение экспрессии мРНК, синтеза протеинов PDGF-BB и ИЛ-1 β в опухолевых клетках в отличие от контрольных опытов при культивировании клеток глиомы с нормальными астроцитами. На модели экспериментальной глиомы головного мозга крыс совместная трансплантация клеток глиомы линии BT4Ca с альгинат-инкапсулированными МСК, продуцирующими эндостатин (endoMSC), способствовала существенному уменьшению объема опухоли (37). Подобный эффект наблюдали после внутривенного и интратуморального введения МСК из пуповинной крови крысам с

экспериментальной глиомой головного мозга крыс (линия С6) (38). Замедление роста глиомы линии 9L с повышением сроков выживаемости крыс с глиомой головного мозга наблюдалось и в исследовании Накамура с соавт. (39). Хоу с соавт. (36) предполагают, что угнетение активности роста глиомы *in vivo* после введения МСК из КМ может быть опосредовано прямыми контактами опухолевых клеток и МСК в связи с инактивацией Akt-киназы, ингибирующей процессы апоптоза и угнетение экспрессии фосфорилированной Akt и катепсина В, что наблюдалось также при одновременном культивировании МСК с клетками глиомы.

Кроме того фактором, способствующим ингибированию роста экспериментальной глиомы после введения МСК из ЖТ, может быть усиление «проницаемости» опухоли для иммунокомпетентных клеток – моноцитов и гранулоцитов (5), а также редукция неоваскуляризации и снижение экспрессии cyclin D1 протеина (7).

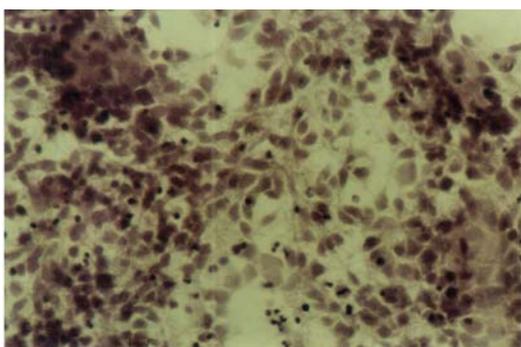


Рис.1. Контрольная культура клеток экспериментальной глиомы 101.8. Окраска гематоксилином Караччи. 400х.

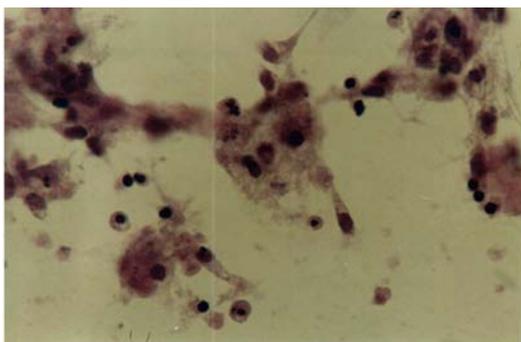


Рис.2. Культура глиомы 101.8 после 24-час инкубации с супернатантом 8-сут. культуры ФПК из ЖТ крысы (10 мкл/мл). Окраска гематоксилином Караччи. 800х.

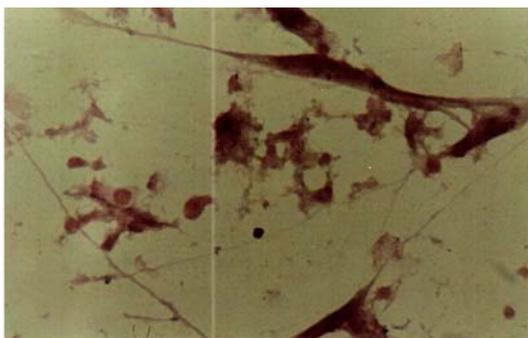


Рис. 3. Культура глиомы 101.8 после инкубации с супернатантом 8-сут. культуры ФПК из ЖТ крысы (100 мкл/мл), 24 ч. Окраска гематоксилином Караччи. 800х.

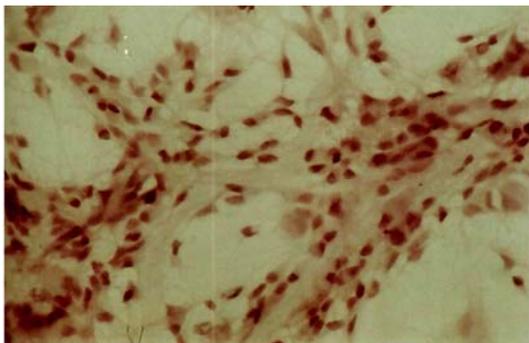


Рис.4. Контрольная культура глиобластомы. Окраска гематоксилином Караччи, 400×.

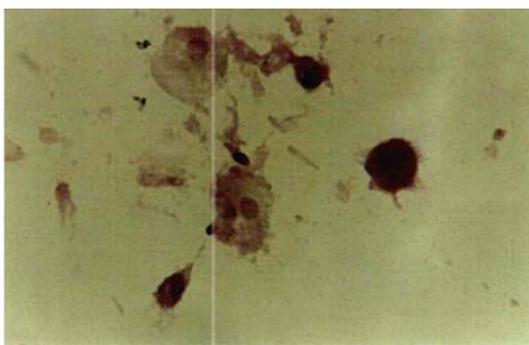


Рис.5. Культура глиобластомы после инкубации с супернатантом 8-сут. культуры ФПК из ЖТ человека, (10 мкл/мл), 24 ч. Окраска гематоксилином Караччи. 800×.

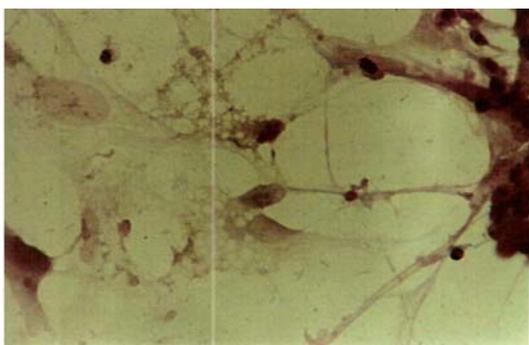


Рис.6. Культура глиобластомы после инкубации с супернатантом 8-сут. культуры ФПК из ЖТ человека (100 мкл/мл), 24 ч. Окраска гематоксилином Караччи. 800×.

Таким образом, на основании наших исследований можно заключить, что популяция ФПК, выделенных из СВФ ЖТ крыс и человека, в условиях монослойного культивирования обладает определенным сходством с гистобиологическими характеристиками МСК по фенотипическим показателям и проявлению ингибирующего воздействия на рост глиом *in vivo* и *in vitro*. Это подтверждается повышением показателей выживаемости животных с внутримозговой глиомой при совместном введении суспензии опухолевых клеток и ФПК из ЖТ и сочетается с появлением признаков цитодеструктивного противоопухолевого воздействия в гистоструктуре экспериментальной глиомы головного мозга крыс.

Наряду с этим, как в культурах экспериментальной глиомы крыс, так и глиобластомы человека, после инкубации с 8-суточным супернатантом кондиционированной среды от культивированных ФПК (при тестировании двух концентраций) также моделируется цитотоксический и цитодеструктивный эффект его воздействия дозозависимого характера на

опухолевые клетки обеих опухолей. Полученные результаты обосновывают необходимость проведения дальнейших углубленных исследований биологических свойств популяции культивированных ФПК из ЖТ с проведением иммунофенотипического тестирования.

Список литературы

1. **Klopp A.N., Gupta A., Spaeth E., Andreeff M., Marini F.** Concise Review; dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth. *Stem cells*. 2011, 29(1): 11–19.
2. **Hata N., Shinojima N., Gumin K., Gumin J., Yong R., Marini F., Andreeff M., Lang F.F.** Platelet-derived growth factor BB mediates the tropism of human mesenchymal stem cells for malignant gliomas. *Neurosurgery*. 2010, 66: 144-156.
3. **Kidd S., Spaeth E., Dembinsky J.L., Dembinski J.L., Dietrich M., Watson K., Klopp A., Battula V.L., Weil M., Andreeff M., Marini, F.C.** Direct evidence of mesenchymal stem cells tropism for tumor and wounding microenvironment using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells*. 2009, 27: 2614-2623.
4. **Spaeth E.L., Dembinsky J.L., Sasser A.K Watson K., Klopp A., Hall B., Andreeff M., Marini F.** Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *Plos One*. 2009, 4(4): e4992.
5. **Yong R.L., Shinojima N., Fueyo J., Gumin J., Vecil G.G., Marini F.C., Bogler O., Andreeff M., Lang F.F.** Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res*. 2009, 69: 8932-8940.
6. **Kidd S., Caldwell L., Dietrich M., Samudio I., Spaeth E.L., Watson K., Shi Y., Abbruzzese J., Konopleva M., Andreeff M.** Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment. *Cytotherapy*. 2010, 12: 615-625.
7. **Studeniy M., Marini F.C., Dembinsky J.L., ZompettaC., Cabreira-Hansen M., Bekele B.N., Champlin R.E., Andreeff M.** Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J. Natl. Cancer Inst*. 2004, 96: 1593-1603.
8. **Dwyer R.M., Khan S., Barry F.P., O'Brien T., Kerin M.J.** Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Res*. 2010, 1: 2010-2025.
9. **Karnoub A.E., Dash A.B., Vo A.P., Sullivan A., Brooks M.W., Bell G.W., Richardson A.L., Polyak K., Tubo R., Weinberg R.A.** Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007, 449: 557-563.
10. **Zhu W., Xu W., Jiang R., Qian H., Chen M., Hu J., Cao W., Han C., Chen Y.** Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favour tumor cell growth in vivo. *Exp. Mol. Pathol*. 2006, 80: 267-274.
11. **Djouad F., Plence P., Bony C., Tropel P., Apparailly F., Sany J.** Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogenic animals. *Blood*. 2003, 102: 3837-3844.
12. **Ame-Thomas P., Maby-El Hajjami H., Monvoisin C., Jean R., Monnier D., Caulet-Maugendre S., Guillaudeux T., Lamy T., Fest T., Tarte K.** Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood*. 2007, 109: 693-702
13. **Otsu K., Das S., Houser S.D., Quadri S.K., Bhattacharya S.** Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2009. 113: 4197-4205.

14. **Ohlsson L.B., Varas L., Kjellman C., Edvardsen K., Lindvall M.** Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp. Mol. Pathol.* 2003, 75: 248-255.

15. **Khakoo A.Y., Pati S., Anderson S.A., Reid W., Elshal M.F., Rovira I.I., Nguyen A.T., Malide D., Combs C.A., Hall G., Zhang J., Raffeld M., Rogers T.B., Stetler-Stevenson W., Frank J.A., Reitz M., Finkel T.** Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorogenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J. Exp. Med.* 2006, 203: 1235-1247.

16. **Qiao L., Xu Z., Zhao T., Zhao Z., Shi M., Zhao R.C.** Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in hepatoma model. *Cell Res.* 2008, 18: 500-507.

17. **Qiao L., Xu Z.L., Zhao T.J., Ye L.H., Zhang X.D.** Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signaling. *Cancer Lett.* 2008, 269: 67-77.

18. **Zhu Y., Sun Z., Han Q., Liao L., Wang J., Bian C., Li J., Yan X., Liu Y., Shao C., Zhao R.C.** Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia.* 2009, 23: 925-933.

19. **Cousin B., Ravet E., Poglio S., De Toni F., Bertuzzi M., Lulka H., Touil I., André M., Grolleau J.L., Péron J.M., Chavoïn J.P., Bourin P., Pénicaud L., Casteilla L., Buscail L., Cordelier P.** Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *Plos One.* 2009, 4: e6278.

20. **Cho J.A., Park H., Kim H.K., Lim E. H., Seo S.W., Choi J.S., Lee K.W.** Hyperthermia-treated mesenchymal stem cells exert antitumor effects on human carcinoma cell line. *Cancer.* 2009, 115: 311-323.

21. **Черкашина Д.В., Лебединский А.С., Пертенко Ю.А.** Торможение роста карциномы Герена у крыс после введения мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека и биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток. *Журн. АМН України.* 2010, 13(3): 492-506.

22. **Lu Y.R., Yaan Y., Wang X.** The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* 2008, 4: 42-49.

23. **Jorgensen C., Lazennec G.** Adult multipotent stromal cells and cancer risk or benefit? *Stem cells.* 2008, 26: 1387-1394.

24. **Jiang R., Xu W., Zhu W., Chen M., Hu J., Cao W., Han C., Chen Y.** Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Experimental and Molecular Pathology.* 2006, 80(3): 267-274.

25. **Yu J.M., Jun E.S., Bae Y.C., Jung J.S.** Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue favor tumor cells growth in vivo. *Stem Cells Dev.* 2008, 17: 463-473.

26. **Studený M., Marini F.C., Champlin R.E., Zompetta C., Fidler I.J., Andreeff M.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.*, 2002, 62: 3603-3608

27. **Birnbaum T., Roider J., Schankin C.** Malignant glioma actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J. Neurooncol.* 2007, 83(3): 241-247.

28. **Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г., Жуликов О. А., Правдюк А. И. Мазур С. П., Горохова Н. А., Гришук В. П.** Стромальные клетки-предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании. *Журн. АМН України.* 2008, 14(2): 354-365.

29. **Петренко А.Ю., Иванов Э.Н., Петренко Ю.А.** Стволовые клетки из жировой ткани. *Биотехнология.* 2008, 1 (4): 39-48.

30. **Пыко И.В., Мотузова Я.М., Федулов А.С., Гузов С.А., Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М., Квачева З.Б.** Условия нейральной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* для изучения влияния их трансплантации при демиелинизирующих заболеваниях центральной нервной системы. Клеточные культуры: информ. бюлл. (СПб). 2009, 24: 52-56.
31. **Кирик В.М., Бутенко Г.М.** Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине. Журн. АМН України. 2010, 16(4): 576-603.
32. **Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cells*. 2002, 13: 4279-4295.
33. **Шарифуллина С.З., Чупикова Н.И., Ростовская М.С., Тепляшин А.С.** Выделение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека и их характеристика. *Цитология*. 2004, 46(10): 947-948.
34. **Тепляшин А.С., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Чупикова Н.И., Ростовская М.С., Савченкова И.П.** Характеристика мезенхимальных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани. *Цитология*. 2005, 47(2): 130-135.
35. **Халанский А.С., Кондакова Л.И., Авцин А.П.** Новые перевиваемые глиомы головного мозга крыс. *Вопросы нейрохирургии. Журн. им.Н.Н.Бурденко*. 1995,2: 23-25.
36. **Ho I.A., Toh H.C., Ng W.H., Teo Y.L., Guo C.M., Hui K.M., Lam P.Y.** A. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis. *Stem Cells*. 2013 Jan.31(1): 146-155.
37. **Kleinschmidt K., Klinge P., Stopa E.** Alginate encapsulated human stem cells suppress syngenic glioma growth in the immunocompetent rat. *J.Microencapsul*. 2011, 28(7): 621-627.
38. **Jiao H., Guan F., Yang B.** Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit C6 glioma via downregulation of cyclin D1. *Neurol. Ind*. 2011, 59(2): 241-247.
39. **Nakamura K., Ito Y., Kawano Y.** Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in rat glioma model. *Gene Inger*. 2004, 11: 1155-1164.

STUDY OF THE INFLUENCE OF CULTIVATED FIBROBLAST-LIKE CELLS FROM ADIPOSE TISSUE ON HISTOBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MALIGNANT BRAIN GLIOMA

V.M.Semenova, N.I.Lisyany, L.N.Belska, V.D.Rozumenko, L.P.Stayno, D.M.Egorova

SI "Romodanov Neurosurgery Institute, National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv

seveme22@rambler.ru

The article presents a literature review, highlighting the controversial issues of the features of the impact of mesenchymal stem cells (MSCs) from tissue sources of different origin on the growth activity of the tumors of different histogenesis, including animal and human brain glial tumors. We present the results of studying the effects of cultured fibroblast-like cells (FLC) from rat adipose

tissue (AT) on the histobiological characteristics of experimental rat glioma (strain 101.8). The animals of the experimental group were subjected to intracerebral implantation of suspension of glioma tumor cells together with cultured FLC from rat AT. A comparative histological study of brain gliomas tissue from rats of the experimental group revealed the morphological features of FLC cytotoxic effects on glioma cells and a significant reduction in the number of mitoses. At the same time the survival of experimental rats was significantly increased compared with the control group, which confirmed the inhibitory effect of the FLC from AT on glioma growth in vivo. The effect of supernatants from 8-day cultures of FLC from human AT on cultured cells from experimental rat glioma and human glioblastoma were studied in vitro. The cytotoxic dose-dependent effects of supernatant on glioma cells were detected in all variants of the experiment. The results indicate that FLC from AT are capable, like the MSC, to inhibit growth of malignant brain gliomas tumor cells both in vivo and in vitro.

Keywords: mesenchymal stem cells, fibroblast-like cells, adipose tissue, glioma, glioblastoma, tissue culture.

ФУНКЦИИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССАХ

И.В. Воронкина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, voron@incras.ru

В представленном обзоре рассмотрены основные характеристики матриксных металлопротеиназ (ММП), их роль в разных клеточных процессах. В физиологических условиях ММП содержатся в тканях в незначительном количестве. Эти ферменты синтезируются многими клетками и принимают участие в таких процессах, как воспаление, заживление раны, ангиогенез, имплантация эмбриона, дифференцировка мезенхимных стволовых клеток, разные стадии злокачественной трансформации клеток. ММП относят к индуцируемым ферментам, транскрипция которых зависит от ряда факторов (цитокинов, факторов роста и некроза опухолей, химических агентов и др.). В представленном обзоре рассматриваются желатиназы ММП-2 и ММП-9.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы металлопротеиназ, ММП-2, ММП-9.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) относятся к семейству цинксодержащих протеолитических ферментов, участвующих в деградации основных компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) в соединительных тканях (1). От активности ММП зависит реорганизация ВКМ и функциональная активность клеток (2, 3, 4). Эти ферменты играют основную роль в развитии таких процессов как морфогенез, резорбция и ремоделирование тканей, миграция, адгезия, дифференцировка и пролиферация клеток, а также при патологических состояниях (ревматоидный артрит, гломерулонефрит, пародонтиты и др.) (5, 6). Важную роль играют ММП в процессах инвазии и метастазирования опухолей (7). В обычных условиях ММП содержатся в тканях в незначительных количествах. Эти протеиназы относятся к индуцируемым ферментам, синтез которых контролируется рядом факторов на уровне транскрипции и трансляции. ММП относят к семейству цинксодержащих эндопептидаз (они содержат в активном центре ионы цинка), которое включает также серализины, астазины, дезинтегрины и семейство ADAMT (A Disintegrin-like And Metalloproteinase domain with Thrombospondin-type 1 motifs) (8). В настоящее время описано 28 ферментов семейства ММП, которые на основании строения и субстратной специфичности разделены на следующие группы: коллагеназы (ММП-1, ММП-8 и ММП-13), желатиназы (ММП-2 и ММП-9), стромелизины (ММП-3, ММП-10 и ММП-11); мембраносвязанные (ММП-14-17, ММП-24, ММП-25); и неклассифицированные (ММП-7, ММП-12, ММП-27). Эта классификация является в достаточной степени условной, так как с одной стороны, ММП имеют частично перекрывающуюся субстратную специфичность, с другой – субстраты для некоторых ферментов (например, ММП-21, ММП-23, ММП-27) в настоящее время не известны (1, 5).

ММП секретируются многими типами клеток, в том числе фибробластами, нейтрофилами, макрофагами, остеокластами, хондроцитами, кератиноцитами, клетками эндотелия (в форме проферментов) и могут активироваться разнообразными внутри- и внеклеточными факторами. Спектр агентов, активирующих ММП, широк и включает протеиназы и тиол-окисляющие соединения (9–11). В физиологических условиях функция системы ММП связана с ремоделированием белков ВКМ, деградация которого происходит в процессах эмбриогенеза, морфогенеза, ангиогенеза, дегенеративных возрастных изменений, миграции и адгезии клеток (1, 12). Нарушение регулируемой деградации ВКМ может приводить к развитию многих патологических состояний.

ММП ингибируются специфическими тканевыми ингибиторами (ТИМП), секретируемыми в комплексе с ММП (14). Семейство ТИМП состоит из четырех белков, три из которых — ТИМП-1, 2 и 4 — секретируются в растворимой форме, а один — ТИМП-3 — связан с ВКМ. По своей структуре ТИМП высокоспецифичны к активному связывающему участку ММП и ингибируют весь спектр ММП. Наиболее полно изучены ТИМП-1, специфически связывающий ММП-1 и ММП-9, а также ТИМП-2, связывающий преимущественно ММП-2 (13, 14). Целостность и ремоделирование ВКМ зависит от равновесия системы ММП/ТИМП. Установлена корреляция между изменением баланса протеолитической активности ММП, активности ТИМП и накоплением ВКМ (13).

Недавние исследования доказали важную роль таких членов семейства ММП как желатиназы ММП-2 и ММП-9. Оба фермента интенсивно гидролизуют желатины, получаемые из различных типов коллагенов, а также ряд белков ВКМ, в том числе и эластин. ММП-2 в отличие от ММП-9 гидролизует фибронектин, ламинин и белок тенасцин-С, а ММП-9 расщепляет энтактин и коллаген XIV типа (7, 15).

ММП-2 экспрессируется и секретируется в виде предшественника многими нормальными и опухолевыми клетками. ММП-2 (ранее называемая желатиназой А или коллагеназой IV типа) в физиологических условиях синтезируется преимущественно в фибробластах в период роста и регенерации ткани. В небольших количествах она также синтезируется нейтрофилами (содержится в специфических гранулах), моноцитами/макрофагами. Субстратами для ММП-2 являются: коллагены (I, IV, V, VII, X и XIV типов), желатин, эластин, фибронектин, ламинин, протеогликан-связанный белок, остеоонектин, α 1-антитрипсин, IL-1 α (14, 16). ММП-2 может активировать ММП-1, -9, -13 (17).

ММП-9 (ранее называемая желатиназой В) синтезируется нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, кератиноцитами и фибробластами; является наиболее индуцируемым ферментом семейства. Субстратами для ММП-9 являются: коллагены (IV, V, VII, X, XIV типов), желатин, эластин, галектин-3, протеогликан-связанный белок, фибронектин, остеоонектин, α 1-антитрипсин, плазминоген (14).

Желатиназы принимают участие практически во всех процессах, связанных с ремоделированием ВКМ в организме. Оба фермента достаточно легко определяются в образцах тканей и сред, поэтому существует большое количество данных в литературе по их влиянию на разнообразные процессы (1, 6).

Все ферменты системы ММП играют важнейшую роль в воспалительном процессе, регулируя адгезию и миграцию лейкоцитов, модулируя биологическую активность цитокинов, хемокинов, сериновых протеаз и факторов свертывания крови. Желатиназы ММП-2 и ММП-9 играют основную роль на последних этапах воспалительного процесса, так как только они способны разрушать денатурированный остальными металлопротеиназами коллаген (18). В опытах на животных с нокаутом генов ММП-9 показано нарушение развития лейкоцитарной инфильтрации очага воспаления (18, 19). ММП-9 протеолитически активизирует хемокины СХС и IL-8, увеличивая их хемотаксический потенциал, а также гранулоцитарный хемотаксический белок GCP-2 и эндотелиальный пептид, стимулирующий нейтрофилы-78 (ENA-78) (18, 19). ММП-9 является основным ферментом семейства ММП, участвующим в процессе активации провоспалительных цитокинов, в частности TNF- α . Активируя цитокины IL-1 β и TGF- β , ММП-9 высвобождает их из ВКМ (14). ММП-2 через активацию MAP-киназного пути стимулирует синтез интегрина CD11b/CD18 на поверхности нейтрофилов (19).

ММП-2 обладает митогенными эффектами по отношению к клеткам эндотелия, гладкомышечным клеткам сосудов и дыхательных путей (20, 21). Описанные эффекты находят свое подтверждение в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также в клинических исследованиях. Например, при ревматоидном артрите доминирующую роль в повреждении суставов играет ММП-9, а экспрессия ММП-2, наоборот, подавляет воспалительную реакцию (22).

Успешная имплантация эмбриона при экстракорпоральном оплодотворении зависит, кроме соответствующего состояния матки, и от активности ММП, цитокинов, простагландинов, молекул «адгезии». Наиболее активные изменения в экспрессии ММП выражены в тканях, претерпевающих циклическую перестройку: в эндометрии при менструальном цикле, при инволюции матки после родов (12, 23). Следует отметить, что ММП, и в первую очередь желатиназы, играют ключевую роль в процессах ремоделирования ВКМ, связанных с развитием фолликулов в неизменных яичниках (23). ММП-2 и ММП-9, а также ТИМП-1, и ТИМП-2 локализируются в оболочке развивающихся фолликулов и в строме яичников, именно вокруг фолликулов выявляется наибольшая желатинолитическая активность коллагеназ. Качественные характеристики созревающего фолликула во многом зависят от уровня активности и соотношения компонентов системы ММП/ТИМП. Была изучена экспрессия ММП-9 и ММП-2, а также ММП мембранного типа 1 (MT1-ММП), ТИМП-1 и ТИМП-2 в эпителиальных

опухолях яичников. Показано, что частота выявления этих белков в злокачественных опухолях (за исключением ТИМП-1 в карциномах яичников) была значительно выше, чем в пограничных и доброкачественных опухолях (24). В то же время исследование биоптатов тканей и культур нормальных и опухолевых клеток эпителия яичников показало, что ММП-9 и ММП-2 чаще выявляются в пренеопластических тканях и клетках, чем в карциномах с уже установившимся злокачественным фенотипом. Авторы предположили, что увеличение экспрессии желатиназ происходит на ранних стадиях злокачественной трансформации эпителия яичников и является одним из факторов этого процесса и/или фактором риска возникновения рака яичников (25).

Установлено, что нормальные уровни экспрессии ММП-2 и ММП-9 в эндометрии необходимы для успешной имплантации зародыша и дальнейшего развития беременности (26). Хронический эндометрит в сочетании с бесплодием и невынашиванием беременности также ассоциируется со снижением активности ММП-2 и ММП-9 в эндометрии и в сыворотке крови. Возрастание активности желатиназ в сыворотке крови до нормы отражает нормализацию эндометрия (26).

Показано, что ММП, и в частности, ММП-2 и ММП-9, присутствуют в миокарде и являются важными регуляторами ВКМ в сердце, участвуя в поддержании его структуры и функции (27, 28). Изменение экспрессии различных ММП в сердце может наблюдаться в ходе нормального развития, а также при различных заболеваниях (27, 29). Активность желатиназ изменялась при острой ишемии, инфаркте миокарда, кардиомиопатии и при других сердечнососудистых заболеваниях (29-31). Повышенная активность ММП-2 была выявлена при атеросклеротических повреждениях аорты (32). Повышение активности ММП-9 наблюдалось при атеросклерозе сосудов сердца, гипертензии, сердечной недостаточности и остром инфаркте миокарда (32-34). В то же время, показано, что подавление активности ММП-9 улучшает сердечную функцию (35). Установлено, что нарушение баланса ММП/ТИМП в сердце связано со многими сердечнососудистыми заболеваниями, включая сердечную недостаточность и инфаркт миокарда (36-38).

Активность ММП изменяется и в ходе процесса заживления раны. Наиболее информативными ММП в этом случае также считают желатиназы ММП-2 и ММП-9. Так как спектр ММП различен для разных типов клеток, то по изменению активности ММП в раневом экссудате можно следить за процессом заживления раны без дополнительного

травмирования новообразованной грануляционной ткани (39). ММП-9 секретируется нейтрофилами в процессе деструкции поврежденных тканей. Между числом нейтрофилов в тканях раны и активностью ММП-9 выявлена прямая корреляционная связь. Активность ММП-2 положительно коррелирует с количеством фибробластов и капилляров (39). Активность ММП-9 наиболее значительна в раннем периоде заживления раны. Активность ММП-2, напротив, повышается при формировании грануляционной ткани (18).

Спектр и активность ММП могут меняться и в процессе клеточной трансформации (40, 41). Многочисленные исследования показали, что при различных видах новообразований повышение экспрессии металлопротеиназ в первичной опухоли и/или метастазах положительно коррелирует с низкой дифференцировкой клеток, высокой инвазивностью рака, интенсивностью метастазирования, плохим прогнозом и низкой выживаемостью пациентов (41, 42). Для многих типов опухолей повышение уровня желатиназ – ММП-2 и ММП-9 – в плазме крови считается неблагоприятным прогностическим маркером (42, 43). В экспериментальных исследованиях доказана взаимосвязь между повышением экспрессии ММП опухолевыми и стромальными клетками и метастазированием и ангиогенезом в опухолях (44, 45). У больных с бронхоальвеолярной карциномой был выявлен значительный уровень экспрессии ММП-2 и ММП-9 опухолевыми клетками, что обуславливало высокую инвазивность опухоли (48). Повышение активности ММП-9, обнаруженное в клетках карциномы желудка, находилось в строгой корреляционной зависимости со степенью опухолевой прогрессии (49).

Роль ММП в инвазии и метастазировании опухолей впервые была обнаружена при изучении протеолиза коллагена IV типа. Первоначально предполагали, что опухолевые клетки самостоятельно вырабатывают ММП, а стромальные клетки индуцируют секрецию ММП опухолями. Позднее показали, что стромальные клетки экспрессируют желатиназы чаще, чем опухолевые клетки (46). Секреция многих ММП фибробластами, моноцитами/макрофагами, нейтрофилами и лимфоцитами является ответной реакцией на возникновение опухоли. Но хотя мРНК желатиназы ММП-2 продуцируется преимущественно клетками стромы опухоли, сам фермент опосредованно активируется опухолевыми клетками на границе с нормальной тканью, что способствует инвазии опухоли (47).

Для многих ММП, в частности для желатиназ, продемонстрировано увеличение экспрессии в опухолях различного генеза, причем активация происходит с участием факторов роста и

цитокинов, секретируемых инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, а также клетками стромы опухоли. В связи с этим различные представители семейства ММП, в основном ММП-2 и ММП-9, в настоящее время рассматриваются в качестве возможных биологических маркеров прогноза и лекарственной чувствительности злокачественных опухолей (50), а использование природных и синтетических ингибиторов ММП считается перспективным подходом к противоопухолевой терапии (45, 52).

В последнее время систему ММП–ТИМП рассматривают как возможную терапевтическую мишень онкологических заболеваний. Исследуется возможность использования либо прямых ингибиторов ММП (преимущественно ММП-9, реже ММП-2), либо аналогов естественных ТИМП (8, 51).

Известно, что ММП участвуют в ремоделировании ВКМ, поэтому представляется существенным изучение активности ММП при изменении микроокружения клетки (2, 3). Установлена корреляция между изменением баланса протеолитической активности ММП, активности ТИМП и накоплением ВКМ (13). ВКМ является не только структурной матрицей для клеток, но играет существенную роль в и функционировании клеток, участвуя в запуске множественных внутриклеточных сигнальных каскадов (1). Наличие некоторых компонентов ВКМ, таких как ламинин и фибронектин, также может влиять на активность ММП в клетках разных типов (68; 69). Внеклеточным фактором, влияющим на активность ММП, секретируемых клеткой, могут быть и антиоксиданты. Действие таких антиоксидантов, как например, N-ацетилцистеин (NAC) и альфа-липоевая кислота приводит не только к изменению активности некоторых сигнальных белков в клетке, но и к активированию или инактивированию молекул на поверхности клетки или в ВКМ (53-55). Молекулами, находящимися на поверхности клетки и являющимися прямыми мишенями действия антиоксидантов, могут быть ММП (56). При длительном воздействии антиоксиданта может меняться синтез клетками компонентов ВКМ (57, 58), приводящий к изменению микроокружения клетки. Таким образом, существует функциональная связь между ММП, антиоксидантами и ВКМ.

В литературе есть данные, подтверждающие прямое ингибирование ММП-2 и ММП-9 различными антиоксидантами и серосодержащими соединениями. Предполагается, что антиоксидант NAC связывается с цинком в активном центре фермента, полностью его инактивируя (9). По-видимому, ингибирование действия ММП изменяет сигнальные

комплексы на поверхности клетки, за счет которых происходит узнавание трансформированных клеток. Например, после обработки клеток антителами к ММП-2 или ингибитором ММП чувствительность клеток к действию естественных киллерных клеток практически исчезала (53). Именно ингибированием желатиназ SH-группой NAC авторы объясняют подавление метастазирования злокачественных клеток в легкие после внутривенного или перорального введения мышам антиоксиданта NAC в исследованиях *in vivo* (59, 60). В опытах *in vivo* и *in vitro* показано, что NAC ингибирует ММП-2 и ММП-9 в легочных мышинных фибробластах (61) и в оболочках эмбриона человека – децидуальной, амниотической и хорионе (56).

Отмечена существенная роль ММП в дифференцировке разных стволовых клеток. В частности, было продемонстрировано участие ММП в кардиогенной дифференцировке эмбриональных стволовых клеток (65). Показано, что эмбриональные МСК взаимодействуют с экзогенными ММП на клеточной мембране и активируют проММП-2 и проММП-13, регулируя перичеллюлярную активность ММП (64). Была описана также экспрессия ММП -2, -3, -7 и -9 в ходе дифференцировки эмбриональных МСК в миоциты (66).

Показано, что ММП, в частности желатиназы ММП-2 и -9, играют важную роль в дифференцировке мезенхимных стволовых клеток взрослого человека (МСК) в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях (62, 63). Обнаружено, что уровни активности ММП-2 и ММП-9 были повышены во время дифференцировки преадипоцитов взрослого человека в адипоциты, а ингибирование ММП приводило к подавлению дифференцировки преадипоцитов (70). Исследована зависимость дифференцировки МСК в хондрогенном направлении от активности ММП-2 (71). Обработка клеток активатором ММП-2 ускоряла хондрогенез. Выявлены резкие изменения в дифференцировке МСК в остеогенном направлении при воздействии на ММП ингибитором широкого спектра действия (72). Эти данные свидетельствуют о том, что дифференцировка МСК коррелирует с активностью ММП и ТИМП и балансом ММП/ТИМП.

На ранней стадии дифференцировки прогениторных клеток сердца человека линии L9TV выявлено снижение экспрессии ММП-1 и повышение экспрессии ММП-2 и ММП-9 (67). Показано, что ММП содействуют высвобождению связанных с ВКМ или с клеточной поверхностью цитокинов, которые затем регулируют дифференцировку стволовых клеток (73).

ММП играют ключевую роль в ремоделировании ВКМ при ангиогенезе, миграции и морфогенной дифференцировке эндотелиальных клеток (74). Кроме того, было показано, что выход стволовых и эндотелиальных прогениторных клеток из ниши покоя в костном мозге зависит от ММП-9, которая увеличивает клеточную подвижность и способствует ускорению дифференцировки (75).

Результаты исследований, представленных в настоящем обзоре, свидетельствуют об участии ММП, в частности желатиназ, в дифференцировке клеток и их функционировании в норме и при различных патологических процессах. Подчеркивается роль ММП, в том числе желатиназ - ММП-2 и ММП-9, в ускорении дифференцировки и миграционной активности клеток различного морфогенеза. Однако в литературе приводятся и некоторые противоречивые данные об активности ММП. Тем не менее, пока не получено достоверной информации о конкретных механизмах, регулирующих экспрессию ММП и их роль в процессах дифференцировки МСК в различных направлениях. В настоящее время продолжается изучение взаимодействий МСК-ММП и МСК-ВКМ *in vivo* и *in vitro*.

Список литературы

1. **Stamenkovic I.** Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of pathology*. 2003, 200(4): 448-464.
2. **Nagase H., Woessner J.F.** Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 21491—21494.
3. **Curry T.E., Osteen K.G.** The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr. Rev.* 2003, 24: 428-465.
4. **Boudreau N., Bissell M. J.** Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Current opinion in cell biology*. 1998, 10 (5): 640-646.
5. **Page-McCaw A, Ewald A.J, Werb Z.** Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8 (3): 221–233.
6. **Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z.** Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010, 141 (1): 52–67.
7. **Соловьева Н. И.** Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции. *Биоорганическая химия*. 1998, 24 (4): 245-255. (Solov'eva, N. I. Matrix metalloproteinases and their biological functions. *Bioorganicheskaja khimija*. 1998, 24 (4): 245-255.
8. **Malemud C.J.** Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2005, 11: 1696-1701.
9. **Pei P., Horan M.P., Hille R., Hemann C.F., Schwendeman S.P., Mallery S.R.** Reduced nonprotein thiols inhibit activation and function of ММП-9: implications for chemoprevention. *Free Rad. Biol. Med.* 2006, 41:1315—1324.
10. **Van Wart H. E., Birkedal-Hansen H.** The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA.* 1990, 87: 5578—5582.

11. **Bjorklund M, Koivunen E.** Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim. biophys. acta.* 2005, 1755: 37—69.
12. **Рогова Л.Н., Шестернина Н.В., Замечник Т.В., Фастова И.А.** Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах. *Вестник новых медицинских технологий.* 2011, 18 (2): 86-89.
13. **Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G.** Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 2002, 115: 3719-3727.
14. **Visse R., Nagase H.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research.* 2003, 92 (8): 827-839.
15. **Werb Z.** ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell.* 1997, 91(4): 439-442.
16. **Elkington P.T.** Friedland J. S. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax.* 2006, 61 (3): 259-266.
17. **X. Fu, W.C.Parks, J.W. Heinecke.** Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2008, 19 (1): 2-13.
18. **Le N. T., Xue M., Castelnoble L. A., Jackson, C. J.** The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. *Front Biosci.* 2007, 12(1) : 1475-1487.
19. **Allport J. R., Lim Y. C., Shipley J. M., Senior R. M., Shapiro S. D., Matsuyoshi N., Luscinikas F. W.** Neutrophils from MMP-9 or neutrophil elastase-deficient mice show no defect in transendothelial migration under flow in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 2002, 71: 821-828.
20. **Zheng H., Takahashi H., Murai Y., Cui Z., Nomoto K., Niwa H., Takano Y.** Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer research.* 2006, 26(5A): 3579-3583.
21. **Giannelli G., Erriquez R., Fransvea E., Daniele A., Trerotoli P., Schittulli F., Antonaci S.** Proteolytic imbalance is reversed after therapeutic surgery in breast cancer patients. *International journal of cancer.* 2004, 109(5): 782-785.
22. **Itoh Y., Nagase H.** Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays in biochemistry.* 2002, 38: 21-36.
23. **Goldman S., Shalev E.** MMPs and TIMPs in ovarian physiology and pathophysiology. *Front. Biosci.* 2004, 9: 2474—83.
24. **Sakata K., Shigemasa K., Nagai N., Ohama K.** Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int. J. Oncol.* 2000, 17 (4): 673—681.
25. **Cai K. Q., Yang W. L., Capochichi C. D., Vanderveer L., Wu H., Godwin A. K., Xu X. X.** Prominent expression of metalloproteinases in early stages of ovarian tumorigenesis. *Molecular carcinogenesis.* 2007, 46 (2): 130—143.
26. **Соболева Г. М. Шуршалина А. В., Сухих Г. Т.** Активность матриксных металлопротеиназ-2 и-9 в сыворотке крови. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2006, 141(2): 210-213.
27. **Matrisian L. M., Hogan B. L.** 8 Growth Factor-Regulated Proteases and Extracellular Matrix Remodeling during Mammalian Development. *Current topics in developmental biology.* 1990, 24: 219-259.
28. **Woessner J. F.** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal.* 1991, 5(8): 2145-2154.
29. **Spinale F. G.** Matrix metalloproteinases. *Circulation research.* 2002, 90(5): 520-530.

30. **Mann D. L., Spinale F. G.** Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart. 1998, 98 (17): 1699-1702.
31. **Gao C. Q., Sawicki G., Suarez-Pinzon W. L., Csont T., Wozniak M., Ferdinandy P., Schulz R.** Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovascular Research*. 2003, 57(2): 426-433.
32. **Li Z., Li L., Zielke H. R., Cheng L., Xiao R., Crow M. T., Lakatta E. G.** Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *The American journal of pathology*. 1996, 148(1): 121-128.
33. **Yabluchanskiy A., Ma Y., Iyer R. P., Hall M. E., Lindsey M. L.** Matrix metalloproteinase-9: many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology*. 2013, 28(6): 391-403.
34. **Ovechkin A. V., Tyagi N., Rodriguez W. E., Hayden M. R., Moshal K. S., Tyagi S. C.** Role of matrix metalloproteinase-9 in endothelial apoptosis in chronic heart failure in mice. *Journal of applied physiology*. 2005, 99(6): 2398-2405.
35. **Romanic A. M., Harrison S. M., Bao W., Burns-Kurtis C. L., Pickering S., Gu J., Yue T. L.** Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovascular research*. 2002, 54(3): 549-558.
36. **Yabluchanskiy A., Ma Y., Chiao Y. A., Lopez E. F., Voorhees A. P., Toba H., Jin Y. F.** Cardiac aging is initiated by matrix metalloproteinase-9 mediated endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2014, 306(10): H1398-1407.
37. **Matsumura S. I., Iwanaga S., Mochizuki S., Okamoto H., Ogawa S., Okada Y.** Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2005, 115(3): 599-609.
38. **Creemers E. E., Davis J. N., Parkhurst A. M., Leenders P., Dowdy K. B., Napke E., Daemen M. J.** Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003, 284(1): H364-H371.
39. **Протасов М. В., Смагина Л. В., Галибин О. В., Пинаев Г. П., Воронкина И. В.** Зависимость активности ММП в раневом экссудате крыс от состояния тканей раны на начальных этапах раневого процесса. *Цитология*. 2008, 50(10): 882-886.
40. **Mott J. D., Werb Z.** Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current opinion in cell biology*. 2004, 16(5): 558-564.
41. **Клишо Е. В., Кондакова И. В., Чойнзонов Е. Л., Васильева О. С.** Прогностическая значимость протеаз у больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2005, 2: 82-91.
42. **Pirinen R., Kosma V. M., Böhm J., Johansson R., Leinonen T.** Increased expression of matrix metalloproteinase-2-MMP-2-predicts tumour recurrence and unfavourable outcome in non-small cell lung cancer. *Histology and histopathology*. 2008, 23 (6): 693-700.
43. **Somiari S. B., Shriver C. D., Heckman C., Olsen C., Hu H., Jordan R., Somiari R. I.** Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer. *Cancer letters*. 2006, 233(1): 98-107.
44. **Deryugina E.I., Quigley J.P.** Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010, 1803 (1): 103-120.
45. **Nelson A.R., Fingleton B., Rothenberg M.L., Matrisian L.M.** Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol*. 2000, 18 (5): 1135-1149.
46. **Furuya M., Ishikura H., Nemori R.** Clarification of the active gelatinolytic sites in human ovarian neoplasms using in situ zymography. *Hum. Pathol*. 2001. 32 (2): 163-168.

47. **Deryugina E.I., Quigley J.P.** Matrix metalloproteinases and tumor metaslasias. *Cancer Melaslasias Rev.* 2006. 25 (1): 9-34.
48. **Kanomata N., Nakahara R., Oda T., Aoyagi Y., Ishii G., Yokose T., Ochiai A.** Expression and localization of mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors in mixed bronchioloalveolar carcinomas with invasive components. *Modern pathology.* 2005, 18(6): 828-837.
49. **Zhang J. F., Zhang Y. P., Hao F. Y., Zhang C. X., Li Y. J. Ji X. R.** DNA ploidy analysis and expression of MMP-9, TIMP-2, and E-cadherin in gastric carcinoma. *World journal of gastroenterology.* 2005, 11(36): 5592-5600.
50. **Zucker S., Vacirca J.** Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2004. 23 (1-2): 101-117.
51. **J. Verstappen, J.W. Von den Hoff.** Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J. Dent Res.* 2006. 85 (12): 1074-1084.
52. **Zucker S., Cao J.** Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors in cancer therapy: ready for prime time? *Cancer biology & therapy.* 2009, 8(24): 2371-2373.
53. **Gamaley I., Efremova T., Kirpichnikova K., Kever L., Komissarchik Y., Polozov Y., Khaitlina S.** N-acetylcysteine-induced changes in susceptibility of transformed eukaryotic cells to bacterial invasion. *Cell biology international,* 2006, 30(4): 319-325.
54. **Воронкина И. В., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Гамалей И. А.** Изменение активности матриксных металлопротеиназ нормальных и трансформированных фибробластов мыши при действии антиоксидантов. *Цитология,* 2008, 50(10): 877-881.
55. **Воронкина И. В., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Кожухарова И. В., Гамалей И. А.** Изменение активности матриксных металлопротеиназ первичных эмбриональных фибробластов мыши в процессе культивирования. *Цитология,* 2011, 53 (1): 49–54.
56. **Weiss A., Goldman S., Ben Shlomo I., Eyali V., Leibovitz S., Shalev E.** Mechanisms of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 inhibition by N-acetylcysteine in the human term decidua and fetal membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003, 189: 1758—1763.
57. **Dooley A., Shi-Wen X., Aden N., Tranah T., Desai N., Denton C. P., Bruckdorfer R.** Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. *Rheumatology.* 2010, 49(11): 2024-2036.
58. **Воронкина И.В., Вахромова Е.А., Кирпичникова К.М., Смагина Л.В., Гамалей И.А.** Анализ изменения активности матриксных металлопротеиназ трансформированных фибробластов при действии N-ацетилцистеина. *Цитология.* 2014, 56 (10): 717-724
59. **Albini A., D'Agostini F., Giunciuglio D., Paglieri I., Balansky R., De Flora S.** Inhibition of invasion, gelatinase activity, tumor take and metastasis of malignant cells by N-acetylcysteine. *Int. J. Cancer.* 1995, 61:121--129.
60. **Morini M., Cai T., Aluigi M.G., Noonan D.M., Masiello L., De Flora S., D'Agostini F., Albini A., Fassina G.** The role of the thiol N-acetylcysteine in the prevention of tumor invasion and angiogenesis. *Int. J. Bio. Markers.* 1999, 14: 268-271.
61. **Wang H.T., Gao J.L., Tian Y.X., Kan Q.** Inhibition of N-acetyl-L-cysteine on expressions of matrix metalloproteinases increased by exposure to silicon dioxide in lung fibroblasts in rats. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2006, 24: 514-517.
62. **Kasper G, Dankert N, Tuischer J, Hoeft M, Gaber T, Glaeser JD., Zander D., Tschirschmann M., Thompson M., Matziolis G., Duda G.N.** Mesenchymal stem cells regulate angiogenesis according to their mechanical environment. *Stem Cells.* 2007; 25(4): 903–910.
63. **Воронкина И. В., Смагина Л. В., Крылова Т. А., Мусорина А. С., Полянская Г. Г.** Сравнительный анализ динамики активности матриксных металлопротеиназ в процессе

дифференцировки мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из разных тканей одного донора. Цитология. 2016, 58(11): 867-874.

64. **Lozito TP, Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS.** Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs. *Matrix Biol.* 2014, 34:132–143.

65. **Kawai T., Takahashi T., Esaki M., Ushikoshi H., Nagano S., Fujiwara H, Kosai K.** Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J.* 2004, 68: 691-702.

66. **Mannello F., Tonti G. A., Bagnara G. P., Papa S.** Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006, 24 (3): 475–481.

67. **Bax N. A., van Marion M. H., Shah B., Goumans M. J., Bouten C. V., van der Schaff D. W.** Matrix production and remodeling capacity of cardiomyocyte progenitor cells during in vitro differentiation. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2012, 53(4): 497-508.

68. **Turpeenniemi-Hujanen T., Thorgeirsson U. P., Rao C. N., Liotta L. A.** Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. *Journal of Biological Chemistry.* 1986, 261(4): 1883-1889.

69. **Werb Z., Tremble P., Behrendtsen O., Crowley E., Damsky C.** Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol.* 1989, 109: 877-889.

70. **Lilla J, Stickens D, Werb Z.** Metalloproteases and adipogenesis: a weighty subject. *Am J Pathol.* 2002, 160: 1551–1554.

71. **Jin EJ, Choi YA, Kyun Park E, Bang OS, Kang SS.** MMP-2 functions as a negative regulator of chondrogenic cell condensation via down-regulation of the FAK-integrin beta1 interaction. *Dev Biol.* 2007, 308: 474–484.

72. **Kasper G, Glaeser JD, Geissler S, Ode A, Tuischer J, Matziolis G.** Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior. *Stem Cells.* 2007, 25: 1985–1994.

73. **De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L.** Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007, 25: 100–106.

74. **Gingras D, Be R.** Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation. *Blood.* 2016, 103: 3020–3029.

75. **Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR.** Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-Ligand. *Cell.* 2002, 109: 625–637.

MATRIX METALLOPROTEINASES FUNCTIONS IN CELLULAR PROCESSES

I.V. Voronkina

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, voron@incras.ru

This review describes the main characteristics of matrix metalloproteinases (MMP), representation of their role in various cellular processes and effects on different body systems.

These enzymes are synthesized by many cells and are involved in processes such as inflammation, tissue healing process, angiogenesis, cell transformation, embryo implantation and mesenchymal stem cells differentiation. Under normal conditions MMPs are found in tissues in small amounts. MMP refers to inducible MMP enzymes whose transcription depends on a number of factors (cytokines, growth factors, and tumor necrosis factor, chemical agents, etc.). Presented review discusses gelatinases MMP-2 and MMP-9.

Keywords: matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, MMP-2, MMP-9.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КОЛЛЕКЦИОННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Т.Н. Ефремова, Н.С. Шарлаимова

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, tefi45@mail.ru

Работа по поддержанию коллекционных клеточных линий, а также по расширению Коллекции за счет получения новых культур клеток имеет ряд специфических особенностей. Одним из основных требований культивирования коллекционных клеток – ведение на питательных средах при отсутствии антибиотиков, которые могут изменять целый ряд физиологических особенностей исходных линий и их генетический аппарат, что недопустимо. В связи с этим особое внимание в Коллекции уделяется микробиологическому контролю. Контроль контаминации культур клеток также необходим при проведении исследований, поскольку работа с зараженными клетками может привести к получению заведомо некорректных данных. В настоящей статье рассмотрены основные методы определения бактериальной, дрожжевой, грибковой и микоплазменной контаминации, а также их ограничения.

Ключевые слова: коллекционные клеточные линии, микробиологический контроль, контаминация микроорганизмами, бактерии, грибы, дрожжи, микоплазмы, методы детекции.

Микробиологический контроль – важнейший параметр ведения и поддержания коллекционных клеточных линий, а для вновь поступающих культур клеток – главный показатель возможности включения новой линии в коллекцию. В настоящей статье

рассмотрены основные моменты, определяющие специфику работы с коллекционными клеточными линиями.

Заражение (контаминация) клеточных линий различными группами микроорганизмов – одна из основных проблем в работе с культурами клеток. Причинами частой контаминации клеток в культуре могут быть реагенты, необходимые для культивирования: сыворотка крови, трипсин, вода. Источником инфицирования может быть и сам оператор при работе с клеточными культурами без особых средств защиты – специальных перчаток, масок. Необходимым требованием для работы с клеточными культурами является стерильность ламинарных боксов и всех окружающих помещений. С этой целью осуществляется ежедневное, не менее часа, облучение ультрафиолетом до начала работы и после ее окончания. Для стерилизации поверхностей и стенок ламинара применяют специальные чистящие жидкости: «Аламинол» (Государственный научный центр «НИОПИК»), «Мелисептол» («Б. Браун Медикал») и многие другие. Использованная стеклянная посуда после окончания работы помещается в емкости со стерилизующей жидкостью (как правило, это 1%-ный раствор гипохлорида натрия). Для контроля стерильности бокса периодически в ламинар помещают чашки Петри с агаризованными питательными средами, селективными для бактериальной микрофлоры окружающего воздуха. Чашки оставляют открытыми в течение 4-х часов, после чего закрывают и инкубируют при +37°C и +25°C в течение не менее двух суток. Отсутствие роста бактериальных колоний на поверхности агара – показатель правильной подготовки ламинара к работе.

В качестве примера проведения микробиологического контроля коллекционных клеточных линий приведем работу Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (СПб), являющейся Центром коллективного пользования (ЦКП). Согласно своему статусу, ЦКП в течение года обеспечивает образцами разных коллекционных линий многочисленные учреждения РФ. Регулярная выдача образцов требует постоянного обновления фондов коллекции. Расширение фондов связано как с приобретением культур клеток, отсутствующих в коллекции, так и с получением новых клеточных линий сотрудниками в самой коллекции. Обновление пула культур клеток происходит путем получения новых закладок коллекционных линий. Обе эти функции не могут быть выполнены без проведения микробиологического контроля. Согласно международному паспорту коллекционной клеточной линии проводится

микробиологический контроль контаминации бактериями, дрожжами, мицелиальными микроорганизмами и микоплазмами.

Начиная с момента поступления новой культуры, должны соблюдаться следующие правила. Прежде всего, необходимо использовать отдельный карантинный бокс. Новые линии поступают в транспортировочной среде, содержащей антибиотики. Анализ на микробную контаминацию выполняется только после удаления из среды антибиотиков. Зараженность бактериями, грибами и дрожжами, как правило, определяется визуально в течение нескольких дней до первого пересева. Анализ на микоплазменную контаминацию проводится с помощью методов, дающих возможность быстрого получения результата. Такими методами для обнаружения микоплазмы являются окраска флуорохромами и/или метод полимеразной цепной реакцией (ПЦР). По мере наращивания объема клеток для подготовки к криоконсервации проводится неоднократный контроль контаминации, включая метод микробиологического культивирования на селективных для разных групп контаминантов твердых и жидких питательных средах и перечисленные выше методы (метод прямого окрашивания ДНК клеток флуоресцентными красителями DAPI или Hoechst 33258 и ПЦР). При этом для объективного анализа микоплазменной контаминации обязательно одномоментно использовать сочетание не менее 2–3-х методов. Необходимость этого связана с их спецификой, в частности с разной разрешающей способностью, что будет подробно рассмотрено ниже.

Культивирование коллекционных клеточных линий требует строгого соблюдения регламента всех процедур, позволяющих содержать в криоконсервированном состоянии только жизнеспособные клетки с хорошими ростовыми свойствами, свободные от контаминантов при обязательном условии отсутствия в ростовой среде антибиотиков. При работе с коллекционными клеточными линиями применение антибиотиков недопустимо, так как антибиотики могут изменять генетический аппарат клетки (1–3), а постоянное культивирование в присутствии антибиотика приводит к появлению резистентных к данному антибиотику видов микроорганизмов (1, 2, 4).

Контаминация бактериями, микроскопическими грибами, дрожжами. Для выявления бактериальной контаминации инкубацию клеток проводят в термостате при двух температурных режимах: +37°C и +25°C. Для клеток, полученных от человека, рекомендуется также инкубация при +35°C, то есть в условиях близких для патогенов человека.

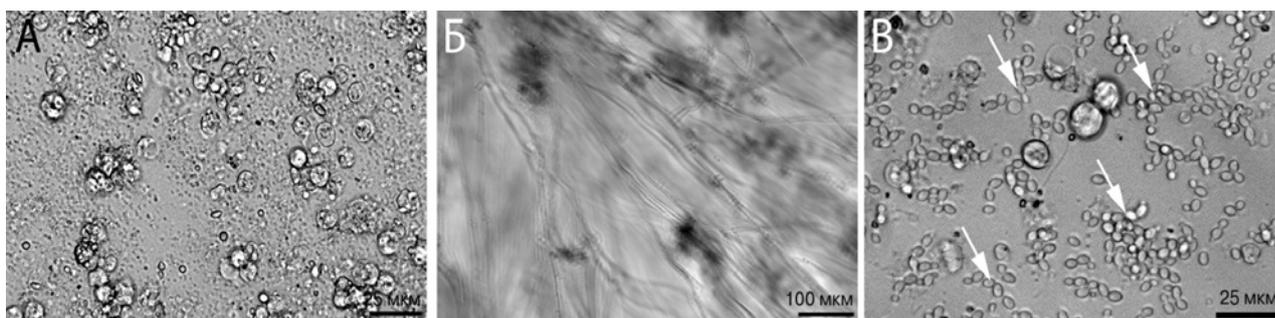


Рис. 1. Контаминация клеток микроорганизмами: А – бактериальное заражение; Б – контаминация мицелиальными микроорганизмами; В – заражение дрожжами, стрелками указаны почкующиеся клетки дрожжей. Световая микроскопия - об. 20х, изображение получено при помощи микроскопа ZOE Fluorescent Cell Imager (BioRad).

Как правило, заражение клеточных линий бактериями легко обнаруживается при визуальном осмотре (рис. 1, А). Бактерии-контаминанты вызывают быстрое, в течение 2–3-х суток изменение цвета и помутнение среды, сопровождающееся откреплением клеток от подложки.

Определение мицелиальных микроорганизмов проводится визуально в световом инвертированном микроскопе. В поле зрения можно видеть тонкие филаментозные нити и плотные скопления спор (рис. 1, Б).

Дрожжевая инфекция иногда, также как и бактериальная, вызывает изменения рН среды и, соответственно, ее цвета, а крупные, почкующиеся клетки дрожжей достаточно четко отличаются от культивируемых клеток при микроскопическом анализе (рис. 1, В).

При обнаружении всех трех перечисленных выше инфекций в коллекционных культурах, зараженные клетки подлежат немедленному уничтожению, также как и все использованные в работе с ними материалы. Ламинарный бокс и окружающие помещения должны быть сразу подвергнуты дополнительной стерилизационной обработке. Для исключения этих видов инфекций проверяются все компоненты питательных сред, детергенты и мембранные фильтры, если они применялись для приготовления этих компонентов – аликвоты приготовленных сред рекомендуется инкубировать при указанных выше температурах в течение 28 суток. Это время установлено, исходя из продолжительности инкубационного периода отдельных видов бактерий.

Для исключения заражения бактериями, обладающими длительным инкубационным периодом, применяются методы микробиологического высева на селективные питательные

среды. Состав сред и порядок проведения анализов описаны в литературе, в частности в руководстве Фрешни (5) и публикациях наших сотрудников (6).

Микоплазменная контаминация. Микоплазмы относятся к персистирующим инфекциям, присутствие которых почти незаметно на ранних стадиях контаминации. Подробная характеристика морфологии, метаболизма и особенностей жизнедеятельности этих микроорганизмов описана в многочисленных статьях и монографиях (7–9). По данным. Апхофф и Дрекслера (10) зараженность культур клеток микоплазмами в лабораториях может достигать 15–35 % от общего числа имеющихся культур. В острой форме инфекции это может составлять до 25 % общего белка и 15 % тотальной ДНК зараженной линии. Микоплазменной контаминации свойственна также очень быстрая передача инфекции от линии к линии. В отличие от бактериальных, дрожжевых и грибных инфекций, которые, как уже было сказано, проявляются достаточно быстро, в течение 2–3 суток, микоплазменная контаминация на начальном этапе протекает без явных симптомов, что создает дополнительные трудности для ее определения (11). Эти организмы вызывают замедление скорости роста, хромосомные абберации, подавление экспрессии цитокинов, изменение состава мембран и замедление метаболизма аминокислот и нуклеиновых кислот эукариотических клеток (1, 2, 12–14), что приводит к получению исследователями заведомо некорректных данных (15).

При получении гибридом микоплазмы, присутствующие в клетках, влияют не только на выход продукта гибридизации, но и могут препятствовать самому процессу слияния клеток. (16). И хотя микоплазменная контаминация клеточных линий известна давно, она до сих пор представляет наиболее серьезную проблему при работе с клеточными культурами.

К основным видам, спонтанно контаминирующим перевиваемые клеточные линии, относятся 6 видов рода *Mycoplasma*: *Mycoplasma orale*, *M.salivarium*, *M.hyorhinitis*, *M.hominis*, *M.fermentans*, *M.arginini*, а также представители рода ахлеплазм: *Acholeplasma laidlawii*.

Основными методами детекции микоплазм, официально одобренными рядом международных экспертных организаций, такими как Фармакопея США, Европейская Фармакопея, Фармакопея Японии и другие (9), являются микробиологическое культивирование (высев на жидкие и твердые питательные среды), метод прямого окрашивания ДНК клеток флуоресцентными красителями и ПЦР (17, 18).

Для выявления микоплазменной контаминации при стандартном микробиологическом высеве теоретически должно определяться заражение на уровне одной колониеобразующей единицы (КОЕ). Основная ростовая среда для микоплазм - триптический перевар бычьего сердца (PPLO) обязательно должна содержать ацетат таллия для подавления роста бактерий (19, 20). Подробное описание состава сред и процедуры микробиологического посева также

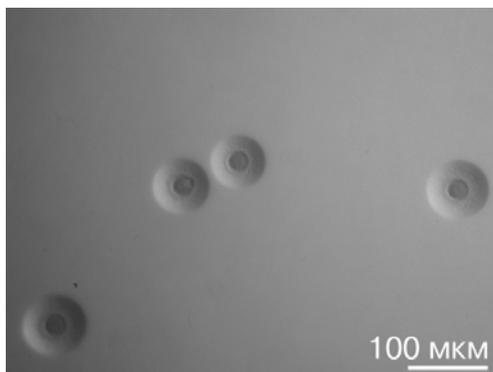


Рис. 2. Колонии *Mycoplasma agalactiae* на агаре (21). Световая микроскопия.

приводятся, в частности, в наших предыдущих публикациях (6). Важнейшим доказательством присутствия микоплазмы в исследуемой культуре является рост колоний на твердом агаре. Состав среды при этом отличается от жидких сред только добавлением 1,5–2,0 % агар-агара. На твердом агаре при наличии микоплазменной инфекции появляются специфические двухфазные колонии типа «fried-eggs» - «яичница-глазунья» (рис. 2). Однако на практике выращивание микоплазм даже в чистой

культуре на селективных средах является сложной методической задачей. При анализе культивируемых клеток микробиологический метод требует длительного (до 28 суток) времени инкубации супернатанта клеточной культуры в достаточно дорогой селективной среде. Очень малые размеры колоний некоторых видов затрудняют выявление их на твердом агаре и требуют большого опыта оператора. Поэтому микробиологический метод не может использоваться в качестве единственного метода для определения микоплазменной контаминации в культурах клеток.

Как уже упоминалось выше, рекомендованным международными экспертными организациями подходом для обнаружения микоплазменной контаминации также является метод окраски ДНК анализируемых клеток флуорохромами Dapi или Hoechst 33258 (18). На рис. 3 представлены культивируемые клетки, окрашенные флуорохромом Hoechst 33258: контрольные клетки монослойной линии Vero (рис. 3, А) и клетки первичной культуры эндометрия, инфицированной микоплазмой (рис. 3, Б). Следует учитывать, что микоплазма, содержащая ДНК, локализуется, как правило, на наружной мембране соматической клетки.

Для анализа суспензионных клеток с помощью этого метода требуется обязательное сокультивирование с индикаторными монослойными клетками. В качестве индикаторных

клеток чаще всего используют клеточные линии Vero, LMTK или 3T6. Выбор этих линий обусловлен их высокой подверженностью микоплазменной контаминации. При сокультивировании в течение нескольких суток микоплазма испытуемых клеток заражает индикаторные клетки и легко обнаруживается на их мембране при микроскопировании. Необходимость этого продиктована тем, что небольшой размер наружной мембраны суспензионной клетки, а также большое количество фрагментов разрушенных клеток затрудняет получение достоверного результата. Таким образом, сокультивирование с индикаторными линиями повышает чувствительность анализа суспензионных клеток (12). Метод сокультивирования заключается в том, что аликвота анализируемых суспензионных клеток добавляется к уже растущей на стеклах индикаторной культуре. Клетки инкубируют в термостате при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение не менее 2–3 суток. Недостатком этого метода окраски является трудность оценки из-за возможности артефактов за счет флуоресценции фрагментов разрушенных клеток. Важным фактором, который может существенно влиять на интерпретацию результатов, является наличие в свободной от микоплазм культуре выделяемых эукариотическими клетками внеклеточных везикул, содержащих ДНК и РНК. Поэтому метод требует большого опыта оператора и применения не менее 2–3 способов проверки, о чем уже было сказано выше. Подробное описание подготовки клеток, реагентов и последовательности процедур для выполнения данного анализа, приводится в 4-ой главе учебного пособия (6).

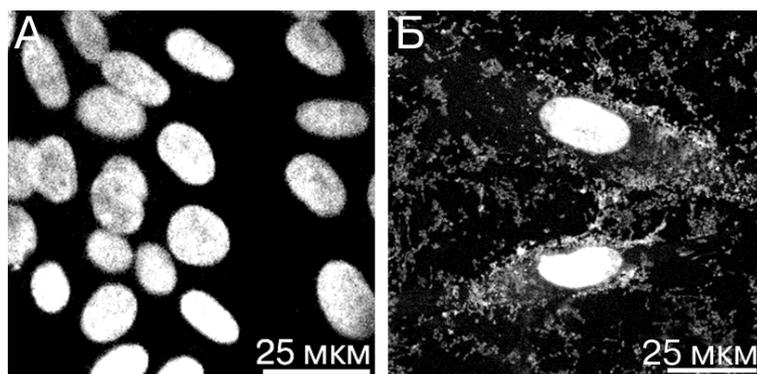


Рис. 3. Окраска клеток ядерным красителем Hoechst 33258: А – контрольные клетки линии Vero; Б – первичная культура клеток эндометрия, инфицированная микоплазмой (об. 100 \times , изображение получено при помощи микроскопа Leica TCL SP5).

Одним из трех методов для выявления микоплазменной контаминации в культивируемых клетках, также официально одобренным международными экспертными организациями является анализ с помощью ПЦР. Целым рядом авторов были предложены универсальные праймеры для определения микоплазменной ДНК. При этом одним из основных критериев служила максимальная гомология со всеми последовательностями генов 16S РНК прокариот.

Также были подобраны праймеры контрольных вариантов ДНК эукариотических клеток, рассчитанные для амплификации фрагмента гена эукариотической 18S рРНК (16, 22, 23). ПЦР-анализ, как и метод окрашивания флуорохромами, является экспресс-методом. Он достаточно легко выполним и экономичен. Однако также не рекомендуется ограничиваться только одним этим методом для обнаружения микоплазм в культивируемых линиях, поскольку, как и выше рассмотренные методы, он имеет ограничения. В зависимости от качества тестируемого образца и специфичности праймеров, метод ПЦР может давать как ложноположительный результат (например, после деконтаминации клетки могут содержать фрагменты уже нежизнеспособной ДНК), так и ложноотрицательный (24).

Проблема деконтаминации от микоплазменной инфекции. С момента обнаружения микоплазм в постоянных клеточных линиях стоит вопрос о методах получения клеток, свободных от этой инфекции. Сложность задачи заключается в необходимости разработки способов, при которых можно получать абсолютно неповрежденные, свободные от микоплазм клетки. Но в основе всех, имеющихся на данный момент методов деконтаминации, лежит воздействие на микоплазму антибиотиками. Для коллекционных культур клеток недопустима деконтаминация с помощью антибиотиков, изменяющих функциональные свойства клеток и влияющих на метаболические пути (12).

Заключение. Обсуждаемые в данной работе методы обнаружения микоплазменной контаминации на настоящий момент наиболее широко используются. Помимо этого, в разное время был предложен ряд других методов детекции микоплазм в культурах клеток. Наибольшее распространение получили, в частности, электронная микроскопия, детекция аденозинфосфорилазной активности (6-MPDR) и дот-блот гибридизация со специфическими зондами (9). Однако, ни один из этих методов также не может быть рекомендован, как единственный. Таким образом, проблема разработки одного универсального способа определения микоплазм в клеточных культурах пока не решена. В то же время, широкое использование клеточных культур в различных областях медицины и в фундаментальных исследованиях предъявляет строгие требования к чистоте клеточных линий, исключая присутствие в них каких-либо видов контаминации.

Список литературы

1. **Parker R.C.** Methods of Tissue Culture. 3rd ed. Hoeber-Harper, New York. 1961, 358
2. **Langdon S.P.** Cell Culture Contamination. In: Methods in Molecular Medicine. 2004, 88: 309–317.
3. **Полянская Г.Г.** Влияние условий культивирования на кариотипическую структуру двух клеточных сублиний фибробластов индийского мунджака. Цитология. 1989, 31(7): 807–817.
4. **Couldwell D.L., Tagg K.A., Jeffreys N.J., Gilbert G.L.** Failure of moxifloxacin treatment in Mycoplasma genitalium infections due to macrolide and fluoroquinolone resistance. Int. J. STD. AIDS. 2013, 24(10): 822–828.
5. **Freshney R. I.** Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th Ed. John Wiley & Sons, Inc. 2005, 580 p.
6. **Пинаев Г.П., Блинова М.И., Николаенко Н.С., Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Шарлаимова Н.С., Шубин Н.А.** Контаминация клеточных линий микроорганизмами. В кн.: «Клеточная биотехнология: учебное пособие». СПб: Изд-во Политехн. ун-та. 2012, 206 с.
7. **Razin S.** The mycoplasmas. Microbiol Rev. 1978, 42(2): 414–470.
8. **McGarrity G.J., Kotani H., Burler H.** Mycoplasmas and tissue culture cells. In: Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. Eds J. Maniloff et al., Washington. 1992, 445–456 p.
9. **Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вишняков И.Е.** Микоплазмы в биологии и медицине начала XXI века. СПб: «Наука». 2016, 334 с.
10. **Uphoff C.C., Drexler H.G.** Eradication of mycoplasma contaminations. Methods Mol Biol. 2005, 290:25–34.
11. **O'Hara C.M., Weinstein M.P., Miller J.M.** Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover P.C., Tenover F.C., Tenover P.C. (eds) Manual of clinical microbiology. ASM, Washington, D.C. 2003: 185–207.
12. **Cobo F., Stacey G.N., Hunt Ch., Cabrera C., Nieto A., Montes R., Cortés J.L., Catalina P., Barnie A., Á. Concha.** Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardization. Appl Microbiol Biotechnol. 2005, 68: 456–466.
13. **Razin Sh., Herrmann R.** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. New York: Kluwer. 2002, 572 p.
14. **Uphoff C.C., Drexler H.G.** Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. Cytotechnology. 2002, 39(2): 75–90.
15. **Stacey G.N., Masters J.R.W., Hay R.J., Drexler H.G., MacLeod R.A.F., Freshney R.I.** Cell contamination leads to inaccurate data: we must take action now. Nature. 2000, 403: 356.
16. **Говорун В.М.** Молекулярно-биологические методы выявления и идентификации инфекционных агентов. В кн.: «Клиническая лабораторная аналитика. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории» Под ред. В. В. Меньшикова. М. 1999, (2): 301–322.
17. **Uphoff C.C., Drexler H.G.** Detection of mycoplasma contaminations. Methods Mol Biol. 2013; 946:1–13.
18. **Chen T.R.** In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by Hoechst 33258 stain. Exp. Cell research. 1977, 104: 255.
19. **European Pharmacopeia.** European Pharmacopeia section 2.6.7 (Mycoplasma). Maisonneuve SA, Sainte Ruffine. 2004b: 149–152.
20. **European Pharmacopeia.** European Pharmacopeia section 2.6.7, Mycoplasmas, 7th ed. Maisonneuve SA, Sainte Ruffine. 2012: 178.

21. **Hegde S., Rosengarten R., Chopra-Dewasthaly R.** Disruption of the *pdhB* pyruvate dehydrogenase [corrected] gene affects colony morphology, in vitro growth and cell invasiveness of *Mycoplasma agalactiae*. PLoS One. 2015, 23;10(3):e0119706. doi: 10.1371/journal.pone.0119706
22. **Harasawa R., Imada Y., Kotani H., Koshimizu K., Barile M.F.** *Ureaplasma canigenitalium* sp. nov., isolated from dogs. Int J Syst Bacteriol. 1993, 43(4): 640–644.
23. **Sung H., Kang S.H., Bae Y.J., Hong J.T., Chung Y.B., Lee C.K., Song S.** PCR-based detection of *Mycoplasma species*. J Microbiol. 2006, 44(1): 42–49.
24. **Young L., Sung J., Stacey G., Masters J.R.** Detection of Mycoplasma in cell cultures. Nat Protoc. 2010, 5(5): 929–934.

MICROBIOLOGICAL CONTROL IN CELL CULTURE COLLECTION

T.N. Efremova, N.S. Sharlaimova

Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, tefi45@mail.ru

Maintaining of the cell culture Collection, as well as its development by the obtaining of new cell lines has a variety of aspects. One of the basic cell culturing requirements in the Collection is the keeping the cells on nutrient media in the absence of antibiotics, which can modify a various of physiological characteristics of the original cell line and their genetic apparatus, that is unacceptable. In this regard, in the Collection special attention is paid at microbiological control of cells. Control of cell culture contamination is also needed for researchers, since the work with the infected cells may result in obviously incorrect data. In this article the basic methods for the detection of bacterial, yeast, fungal and mycoplasma contamination, as well as their limitations, are discussed.

Key words: cell culture collection, microbiological control, cell culture contamination with microorganisms, bacterial, fungal, yeast and mycoplasmal contamination, detection methods.

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

Юдинцева Н.М., Нащекина Ю.А., Муравьев А.Н. Реконструкция мочевого пузыря с помощью методов тканевой инженерии: проблемы и перспективы.....	3
Любич Л.Д. Исследование механизмов воздействия супернатанта нейрогенных клеток фетального мозга крысы на клетки экспериментальных глиом С6 в условиях культивирования.....	14
Кузовкина И.Н., Прокофьева М.Ю., Орлова Е.В. О настоящем и будущем коллекции генетически трансформированных корней растений.....	26
Семенова В.М., Лисяный Н.И., Бельская Л.Н., Розуменко В.Д. Стайно Л.П., Егорова Д.М. Изучение воздействия культивированных фибробластоподобных клеток из жировой ткани на гистобиологические характеристики злокачественных глиом головного мозга.....	41
Воронкина И.В. Функции матриксных металлопротеиназ в клеточных процессах	57
Ефремова Т.Н., Шарлаимова Н.С. Микробиологический контроль коллекционных клеточных линий.....	70
Правила для авторов.....	80