

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,
ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ НА ШКОЛУ-КОНФЕРЕНЦИЮ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
«МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК»**

(Санкт-Петербург, 6—10 октября 2008 г.)

ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА И ФИТОСБОРОВ НА МАРКЕРЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ПОЧЕК МЫШИ. © А. А. Алиева,¹ В. П. Пащенко,¹ Т. Л. Киселева,² Н. А. Назаренко.¹ ¹ Северный государственный медицинский университет МЗ РФ, Архангельск, и ² Институт гомеопатии и натуротерапии Федерального клинично-экспериментального центра традиционных методов диагностики и лечения МЗ РФ, Москва.

Одним из экстремальных факторов внешней среды, ухудшающим качество жизни человека, является холод. В районах Крайнего Севера ежегодно регистрируется более 11 тыс. случаев оказания медицинской помощи пострадавшим от переохлаждения. Поэтому поиск лекарственных препаратов с фригопротекторным действием является одним из актуальных научных направлений. Ранее проведенные эксперименты на лабораторных животных на модели острой холодовой травмы показали положительную динамику нормализации некоторых показателей гомеостаза при назначении фитосборов (Алиева и др., 2006). Однако все еще остается недостаточно изученным возможный механизм их фригопротекторного действия. Поэтому целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение влияния дексаметазона и фитосборов на маркеры пролиферативной активности в системе *in vitro*. В опытах была использована культура почек мыши, обладающая высокими пролиферативными потенциальными. Водное извлечение сборов (10%-ный настой) готовили по методике издания Государственной фармакопеи XI. В состав «ядра» сбора № 1 входили листья березы бородавчатой и трава душицы обыкновенной, а сбора № 2 — трава зверобоя продырявленного и трава тысячелистника обыкновенного. Флаконы с культурой были разделены на четыре группы: к первым двум добавляли настои, к третьей дексаметазон, четвертая служила контролем. В опытных сериях готовили 7 рабочих разведений настоев с конечными концентрациями в культуре 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.37, 0.25 и 0.125 %. Дексаметазон вносили в культуру с конечными разведениями раствора 0.04, 0.02, 0.01 и 0.005 %. После инкубации в течение 2 сут в термостате при 37 °С клеточный монослой фиксировали в жидкости Буэна, окрашивали гематоксилином по Караччи и эозином. Было изготовлено 80 микропрепаратов. В фиксированной культуре определяли удельную плотность клеток (число клеток на единицу площади) и долю митозов (митотический индекс). Статистическую обработку проводили с помощью пакетов Statistica 6.0, SPSS 11.5 и Sigma Plot 8.0. Опыты показа-

ли, что сбор № 1 в отличие от сбора № 2 увеличивал численность клеточной популяции по отношению к посевной доле при разведениях от 1.5 до 0.125 %. Настой сбора № 2 ингибировал данный показатель при разведениях 1.0, 0.37, 0.25 и 0.125 %. Несмотря на различие параметров численности популяции в опытах по изучению доли митозов, были получены сходные характеристики изменения митотического индекса. В обеих опытных сериях с фитосборами численность клеток с митотическими фигурами изменялась волнообразно. При внесении в культуру дексаметазона регистрировалось дозозависимое ингибирование клеточного монослоя. Максимальное снижение численности популяции (на 55 %) регистрировалось в пробе с концентрацией 0.04 %. В этой же пробе определялся минимальный показатель доли митозов. Таким образом, получены следующие результаты. 1. Настой сбора № 2 в отличие от настоя сбора № 1 в равных дозировках ингибировал численность клеточного монослоя *in vitro*. 2. В опытах с обоими настоями митотический индекс клеточной культуры изменялся волнообразно. 3. Дексаметазон в дозированной форме снижал численность и митотический индекс клеточной популяции.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНДУКЦИИ ПЫЛЬЦЕВОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА У ГИБРИДОВ СОРТОВ И ДИГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПЕРВОГО И ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЙ. © Е. В. Антоненко. Институт генетики и цитологии НАН Республики Беларусь, Минск, E.Antonenko@igc.bas-net.by.

Метод культуры пыльников получил широкое развитие и непосредственное использование в селекционных программах разных разных сельскохозяйственных культур. Однако массовому внедрению метода в селекционную практику препятствует ряд обстоятельств: низкая эффективность индукции пыльцевого эмбриогенеза у многих генотипов, сравнительно низкий выход растений-регенерантов и появление растений-альбиносов. Очень перспективным для повышения эффективности индукции пыльцевого эмбриогенеза, на наш взгляд, является использование гибридных генотипов, так как скрещивание сортов пшеницы, характеризующихся высокой и низкой андрогенетической способностью в культуре пыльников, в ряде случаев приводит к передаче признака от лучшего родителя гибридам F₁, что свидетельствует о доминантном характере наследования. Це-

лью данной работы являлся сравнительный анализ эффективности индукции пыльцевого эмбриогенеза у полученных нами гибридов пшеницы первого и второго поколений. Исследовали 3 сорта пшеницы белорусской селекции, дигиплоидная линия пшеницы 64-18 (Китт × Скала), созданная в Лаборатории генетики морфогенеза нашего института, 6 гибридов F₁, полученных в результате скрещивания озимых и яровых форм пшеницы, и 6 гибридов F₂. Изоляцию и культивирование пыльников проводили согласно ранее опубликованной методике. Полученные эмбриониды пересаживали на регенерационную среду Мурасиге—Скуга. Регенеранты выращивали на свету при длине светового дня 16 ч и интенсивности освещения 1500—2000 лк. В ходе эксперимента оценивали следующие параметры: частота индукции эмбриогенеза (от числа посаженных пыльников), частота регенерации зеленых растений и частота регенерации альбиносных растений. Полученные нами данные свидетельствуют о снижении эмбриогенного потенциала у гибридов F₂ по сравнению с гибридами F₁. Прежде всего наблюдалось резкое уменьшение числа образующихся эмбрионидов и как следствие — снижение выхода регенерантов. Среди гибридов F₁ наиболее перспективными оказались рецiproкные гибриды, полученные от скрещивания дигиплоидных линий Dh 64-14 (Скала × Иния 66) и Dh 222-1-1 (Фло × Диамант), при культивировании пыльников которых было получено 203.4 эмбриоида и 35.7 зеленого регенеранта в расчете на 100 пыльников при прямом скрещивании и 454.8 эмбриоида и 47.6 регенеранта при обратном. В следующем поколении способность к эмбриогенезу и регенерации проявил лишь один из них (Dh 61-14 × Dh 222-1-1). Однако и в этом случае наблюдается явное снижение выхода как эмбрионидов, так и регенерантов. Несмотря на увеличение количества посаженных пыльников с 238 у гибридов F₁ до 306 у гибридов F₂, количество образовавшихся эмбрионидов у последних сократилось на 166.8 (из расчета на 100 пыльников), а выход регенерантов соответственно снизился на 31.5 (для зеленых) и на 9.0 (для альбиносов). В результате проведенного исследования можно сделать вывод о том, что эмбриогенная способность гибридов некоторых генотипов усиливается в первом поколении по сравнению с родительскими формами и затухает во втором. Наша дальнейшая работа будет направлена на проведение дополнительных исследований по данному вопросу.

РЕТИНОИДЫ: ИНДУКТОРЫ НЕЙРОГЕННОЙ ИЛИ АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КУЛЬТУРЫ КОСТНОМОЗГОВЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ММСК) КРЫСЫ? © Н. С. Безбородов,¹ Г. А. Криевина,² Д. А. Бабарыкин.^{2,3} ¹ Медицинский факультет Рижского университета, nikita@bezborodov@gmail.com, ² Биологический факультет Латвийского университета и ³ Служба медицинской консультации (Medical Consulting Service Ltd.), Рига.

В настоящее время ретиноиды активно используются в работе с различными типами стволовых клеток (ЭСК, СК взрослого организма). Посредством активации экспрессии Cdc42 и тканевой трансглутаминазы в восприимчивых, низкодифференцированных клетках ретиноиды способны влиять на их дальнейшую судьбу (Joshi

et al., 2007). В литературе многократно была описана способность ретиноидов в комбинации с другими биологически активными веществами вызывать нейрогенную, остеогенную, кардиомиоцитарную, гладкомышечную и другие дифференциации в культурах СК (Drab et al., 1997; Huang et al., 2006; Yu et al., 2006; Joshi et al., 2007). Из костного мозга крысы нами была выделена клеточная культура, по своим иммунофенотипическим и морфофункциональным характеристикам (способность к адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференциации) отвечающая минимальным критериям ММСК. С выделенной культурой была проведена серия экспериментов с целью проверить способность ретиноидов стимулировать экспрессию нейтральных маркеров в ММСК, а также индуцировать образование нейроноподобного фенотипа. Микроскопический анализ нативной культуры после инкубации в среде с добавлением bFGF и ретиновой кислоты (в конечной концентрации 10 мкмоль/л) показал, что в части клеток действительно происходят морфологические изменения (ретракция цитоплазмы, образование разветвленных периферических отростков), позволяющие называть морфологию трансформированных клеток нейроноподобной. Иммунофлуоресцентный анализ культуры показал, что индукция ретиновой кислотой в эксперименте статистически достоверно повышает экспрессию раннего нейронального маркера — нестатина — в большей части клеток культуры, но не вызывает экспрессию маркера зрелых нейронов — NF-M и астроглиального маркера — GFAP. В ходе эксперимента при исследовании данной культуры в фазово-контрастном микроскопе было замечено, что под воздействием ретиновой кислоты ММСК начинают активно накапливать в цитоплазме крупные, хорошо контрастируемые гранулы. При окрашивании культуры красителями суданового типа (жировой красный) было доказано, что эти включения имеют липидную природу. Были проведены дальнейшие эксперименты с целью определить способность ретиновой кислоты вызывать адипогенез в культуре ММСК. В результате было доказано, что добавление ретиновой кислоты к культивационной среде индуцирует массивный адипогенез во всех клетках культуры (равно в морфологически неизмененных клетках и в клетках, приобретших нейроноподобный фенотип). Открытым остается вопрос: можно ли считать столь активный адипогенез нормальным процессом, сопутствующим нейрогенной дифференциации ММСК, или мы сталкиваемся с адипогенной дифференциацией ММСК, или параллельно имеют место оба процесса? Ведутся дальнейшие исследования.

МАРКЕРЫ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЭКСПОЗИЦИИ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО С ИНТЕРФЕРОНОМ IN VITRO. © Н. А. Безденежных, Н. Ю. Лукьянова, А. А. Лихова, Ю. И. Кудрявец. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины, Киев.

Интерферон (ИФН) обладает, как известно, полипотентным действием по отношению к опухолевым клеткам: он способен ингибировать их пролиферацию и подвижность, усиливать апоптоз, модифицировать экспрессию поверхностных рецепторов и антигенов,

подавлять ангиогенез в опухолевой ткани и т. д. Интерферонотерапия, являющаяся компонентом комплексной терапии ряда онкологических заболеваний, длится на протяжении многих месяцев, а то и лет с использованием достаточно высоких доз цитокина. В этих условиях логично допустить формирование резистентности опухолевых клеток к ИФН и изменение ряда других их свойств. Целью настоящей работы было определить влияние длительной экспозиции клеток рака легкого человека с ИФН *in vitro* на экспрессию белковых маркеров, связанных с пролиферацией, дифференцировкой и злокачественностью опухолевых клеток. В работе использовали методы культивирования клеток *in vitro* и иммуноцитохимический метод выявления белковых маркеров. Клетки линии А-549 подвергали длительной экспозиции (от 22 до 360 сут) с рекомбинантным ИФН-альфа2b *in vitro* в нарастающих концентрациях от 100 до 10 000 МЕ/мл. В процессе экспозиции с ИФН в клетках (ИФН-мод) формировалась резистентность к антипролиферативному действию цитокина и отмечались признаки реверсии злокачественного фенотипа: клетки приобретали более выраженную эпителиоидную морфологию, их ультраструктурная организация свидетельствовала о повышении уровня дифференцировки; клетки практически утрачивали способность к колониеобразованию в полужидком агаре и бессывороточной среде, приобретали высокую чувствительность к проапоптотическим воздействиям; продукция ими комплекса факторов с ангиогенной активностью снижалась втрое относительно контроля. Важно, что и в отсутствие ИФН в среде клетки продолжают сохранять новые свойства; более того, в клетках сохраняется антивирусное состояние, что указывает на активацию эндогенного ИФН в опухолевых клетках. Пролиферативная активность ИФН-мод-клеток существенно снижалась: время удвоения клеток контрольной культуры А-549 составляло 29 ч, ИФН2-мод-клеток (2 тыс. ед./мл) — 48, а ИФН10-мод-клеток (10 тыс. ед./мл) — 53 ч. Методом иммуноцитохимии экспрессия белковых маркеров пролиферации клеток Ki-67 и ИПО-38 выявлялась соответственно в 80 ± 3 и 95 ± 3 % клеток в контрольной культуре, в 68 ± 2 и 80 ± 4.5 % ИФН2-мод-клеток и в 60 ± 2.8 и 56 ± 3.1 % ИФН10-мод-клеток. Аналогичная тенденция сохранялась и при исследовании белка цитоскелета клеток виментина: количество клеток с исследуемым белком снижалось соответственно со 100 % в контроле до 81 ± 2.1 и 73 ± 0.7 % в сублиниях ИФН2-10-мод-клеток. Длительное культивирование клеток А-549 с ИФН сопровождается возрастанием популяции клеток, экспрессирующих Е-кадгерин — супрессор инвазии и метастазирования: число последних нарастает от единичных клеток в контроле до 42 ± 0.3 и 63 ± 0.2 % в ИФН-мод-клетках. Напротив, экспрессия рецептора EGF падает со 100 % в контрольной культуре до 15 ± 2 % в ИФН2-мод-сублинии и до 7 ± 0.1 % в ИФН10-мод-клетках. Изучение продукции VEGF клетками рака легкого человека показало, что ее уровень прямо пропорционален пролиферативному статусу клеток: в экспоненциальной фазе роста культуры клетки секретируют достоверно больше VEGF, чем в фазе покоя ($P < 0.001$). Интерферон-альфа при длительной экспозиции клеток значительно ($P < 0.001$) и необратимо ингибирует секрецию VEGF в культуре, причем подавление продукции цитокина четко ассоциируется с подавлением экспрессии других признаков злокачественности в ИФН-модифицированных клетках. Экспрессия белка VEGF в цито-

плазме клеток, которая, как известно, коррелирует с метастазированием и с агрессивным ростом опухоли, также снижается в клетках А-549 ИФН при увеличении времени их культивирования с ИФН с 80 ± 3.1 % в контрольной культуре до 41 ± 0.3 и 21 ± 0.2 % в мод-сублиниях ИФН2 и ИФН10. Полученные данные свидетельствуют о реверсии клеток рака легкого человека к нормальному фенотипу в результате их длительной экспозиции с ИФН *in vitro*.

СПОСОБ СОЗДАНИЯ ОСТЕОЗАМЕЩАЮЩИХ ИМПЛАНТАТОВ ДЛЯ КОСТНОЙ ПЛАСТИКИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК IN VITRO. © Д. И. Билько,¹ Н. М. Билько, Н. Г. Антонюк,² М. О. Храпак.¹ ¹ Центр молекулярных и клеточных исследований Национального университета «Киево-Могилянская академия» и ² Кафедра химии Национального университета «Киево-Могилянская академия», Киев.

В условиях тяжелого повреждения кости, в результате которого формируется значительный дефект органа, аутологических клеток с остеогенным потенциалом сохраняется недостаточно. Биотехнологические подходы к разрешению этой проблемы требуют культивирования остеогенных клеток с последующей трансплантацией их в зону поражения. Одной из самых сложных проблем современной клеточной биотехнологии является выбор субстрата для культуры клеток, поскольку простое инъекционное введение клеток не дает должного результата, так как клетки не задерживаются в зоне поражения; поэтому параллельно с разработкой методов культивирования клеток с остеогенным потенциалом велись поиски оптимального носителя. Исследования показали, что наиболее биологически инертной, совместимой и биодеградирующей с наименьшей цитотоксичностью по сравнению с полиамидными и нитроцеллюлозными мембранами является мембрана на коллагеново-хитозановой основе. Данные статистически достоверны. Для культивирования адгезивнозависимых клеток костного мозга мыши на мембране использовалась среда RPMI-1640 с 15 % фетальной телячьей сыворотки и повышенным содержанием глюкозы при 37 °С. Такие условия оптимальны для накопления биомассы клеток на мембранах. Полученные результаты культивирования мезенхимных стволовых клеток являются основой для создания имплантата для лечения сложных костных дефектов.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРОНЦИЯ-90 НА КРОВЕТВОРЕНИЕ У КРЫС В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК IN VIVO. © И. З. Борбуляк,¹ Н. М. Билько,¹ Н. К. Родионова.² ¹ Центр молекулярных и клеточных исследований Национального университета «Киево-Могилянская академия» и ² Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины, Киев.

Кроветворение представляет собой одну из главных мишеней действия ионизирующего излучения. Особенностью ситуации, сложившейся в результате Чернобыльской катастрофы, считают постепенное увеличение уровня влияния внутреннего по сравнению с внешним облучения костного мозга за счет поступающих в организм радионуклидов. При этом существенным становится действие именно стронция-90, поскольку он является

остеотропным элементом, способным накапливаться в костях в непосредственной близости к костному мозгу. Поэтому целесообразным представлялось изучение особенностей кроветворения экспериментальных животных, облученных этим радионуклидом. Для исследования особенностей функционирования системы гемопоэза крыс, которым в течение 6 мес вводили стронций-90 активностью 5 кБк/сут, было проведено культивирование их костномозговых клеток в культуре *in vivo*. Клетки-предшественники в полужидком агаре помещали в гелевые диффузионные камеры, которые затем имплантировали в брюшную полость мышей линии СВА, обработанных циклофосфамидом за 1 сут до эксперимента. В результате оценки функциональной активности кроветворных клеток-предшественников в культуре было определено угнетение колониеобразования, что свидетельствовало о снижении пролиферативной активности клеток облученных стронцием-90 животных. Было также обнаружено формирование эозинофильных колоний в культуре клеток *in vivo*, что может быть следствием стимулирующего влияния стронция-90 на цитокиновую регуляцию эозинофильного роста. Полученные результаты указывают на существенное влияние этого радионуклида на функционирование системы кроветворения облученных животных.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОЛЛЮСКОВ И ИГЛОКОЖИХ. © А. В. Борода, Н. А. Одинцова. Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток, avboroda@yandex.ru.

В настоящее время криоконсервация является одним из наиболее эффективных способов сохранения биологического материала в течение длительного времени. Морские беспозвоночные являются пойкилотермными животными и не способны быстро менять вязкость липидного матрикса мембран при резких изменениях температуры. Особый жирнокислотный состав клеточных мембран морских животных и растений, в которых преобладают ненасыщенные жирные кислоты (ЖК), значительно влияет на криоустойчивость их клеток. Обычные криопротекторы, используемые при замораживании клеток млекопитающих, являются неэффективными для данных объектов, поэтому целью настоящего исследования — поиск новых криопротекторов для морских гидробионтов и разработка условий их криоконсервации при сверхнизких температурах. Установлено, что замораживание в жидком азоте эмбриональных клеток морских беспозвоночных в присутствии традиционных криопротекторов (диметилсульфоксида и трегалозы) приводит к гибели 90 % клеток. Замораживание этих клеток в присутствии разработанной нами криопротекторной смеси, содержащей помимо ДМСО и трегалозы экзогенные липиды и антиоксиданты, способствует значительному увеличению выхода жизнеспособных клеток (от 40 до 60 %). Мы предполагаем, что высокая эффективность разработанной нами криопротекторной смеси обусловлена прежде всего присутствием в ее составе липидного экстракта из тканей мидии *Crenomytilus grayanus*. Для высоконенасыщенных липидов мидии характерна низкая температура фазового перехода, большая часть которого лежит в области ниже 0 °С. Такие свойства экзогенных липидов смягчают низкотемпературный шок для клеток и могут препятствовать клеточному лизису при

низких температурах. Не исключено, что экзогенные липиды способны к эффективному обмену с мембранными липидами при резком понижении температуры или при окислении полиеновых ЖК в липидах клеточных мембран. Антиоксиданты как отдельные компоненты криопротекторной смеси не обладают криопротекторными свойствами. Однако применение в качестве криопротекторов комбинации трех важнейших компонентов, таких как мембранный стабилизатор трегалоза, липидный экстракт с высоким содержанием полиненасыщенных ЖК и специфические антиоксиданты, позволило значительно снизить потери биологической активности клеток морских беспозвоночных за счет синергического действия всех компонентов используемой криопротекторной смеси. Каждый из компонентов влияет на целостность клеточных мембран. Точные механизмы взаимодействия компонентов криопротекторной смеси с мембранными липидами клеток морских беспозвоночных (моллюсков и иглокожих) во многом остаются еще неясными. Начата работа по анализу факторов, вовлеченных в стабилизацию криопротекторных смесей. Данная работа является первым шагом к расшифровке роли этих компонентов с целью их последующей направленной модификации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-00367 и 08-04-10162 К) и ДВО РАН (гранты 06-2-06-020, 06-III -А-06-166 и НТ-08-016-04).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА СОМАТИЧЕСКОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ТРАНСПЛАСТОННЫХ РАСТЕНИЙ КРАСАВКИ ОБЫКНОВЕННОЙ *AT-ROPA BELLADONNA*. © М. Ю. Василенко, И. К. Комарнищук, А. М. Шаховский, Н. В. Кучук. Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, maxim@iicb.kiev.ua.

Трансформация пластома высших растений — относительно новый и перспективный метод в растительной биотехнологии и генетике, позволяющий получать новые линии растений, ценные как в прикладных областях сельского хозяйства и медицины, так и необходимые для изучения фундаментальных аспектов функционирования генома пластид и пр. Множество метаболических процессов, таких как фотосинтез и фотодыхание, синтез аминокислот, жирных кислот и углеводов, сосредоточено в пластидах. Отчасти они обусловлены экспрессией пластома, а также скоординированным взаимодействием с ядерным геномом, поэтому возможность влияния на экспрессию пластидных генов, модифицировать уже существующие или интегрировать новые последовательности представляется весьма привлекательной. Генетическая трансформация пластома имеет ряд преимуществ, связанных с возможностью достижения более высоких уровней экспрессии трансгена и возможностью определения места его интеграции, отсутствием эффекта замолкания генов. Кроме того, материнский тип наследования цитоплазматических генов, характерный для большинства высших растений, определяет более высокую степень контроля над распространением трансгена в окружающей среде и делает такие растения более биобезопасными. К сожалению, невысокая частота пластомной трансформации (в сравнении с ядерной) не позволяет эффективно применять ее для широкого спектра растений.

Наибольшее количество публикаций, посвященных пластомной трансформации, описывают трансформацию для модельного объекта *N. tabacum*. В связи с этим нами предложен способ трансформации пластома *A. belladonna* с использованием гибридных растений *N. tabacum* (+*A. belladonna*). Фенотипически-подобный растениям табака гибрид трансформировали методом бомбардировки микрочастицами золота с преципитированной на них векторной ДНК. Вектор содержал области гомологии с участками табачного генома *rpl32* и *trnl-ndhD*, между которыми был клонирован ген аминокликозидаденилтрансферазы (*aadA*) под контролем промотора гена *16S-PHK* и 3'-области гена *rbcL*. После трансформации листовые экспланты культивировали на регенерационных средах с добавлением спектиномицина и стрептомицина. Устойчивые клеточные линии отбирали по способности синтезировать хлорофилл на селективной среде и анализировали при помощи ПЦР с использованием праймеров, специфичных к *aadA*-гену. Затем регенерировавшие растения анализировали методом ДНК-гибридизации по Саузерну, подтверждая пластомную локализацию трансгена и гомопластомность отобранных линий. На заключительном этапе работы трансформированные пластиды красавки «переносили» из клеток гибрида *N. tabacum*(+*A. belladonna*) в клетки собственно *A. belladonna*. Листья гибрида экспонировали в γ -лучах до достижения дозы в 500 Гр, выделяли из них протопласты и затем проводили слияние с необлученными протопластами *A. belladonna*. Продукты слияния селектировали по способности делиться и образовывать клеточные колонии на средах, содержащих спектиномицин и стрептомицин. Регенерировавшие растения красавки повторно анализировали при помощи ПЦР для подтверждения трансгенной природы устойчивости к антибиотикам. В данной работе были впервые получены транспластомные растения красавки обыкновенной *A. belladonna*. Показана возможность эффективного использования гомологических последовательностей табака для рекомбинации с пластомом родственного вида. Пластидный геном красавки обыкновенной трансформирован в клетках гибридного растения *N. tabacum*(+*A. belladonna*) с последующим использованием метода соматической гибридизации для возвратного переноса модифицированных пластид в исходный вид.

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА КАК ИНДУКТОРА АПОПТОЗА НА КЛЕТКИ ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОГЕННОЙ ЛЕЙКЕМИИ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ K562. © Ю. Я. Ватажок, А. С. Цимоха, Н. Д. Аксенов, И. В. Кожухарова, В. А. Куличкова. ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, julia-vatajok@mail.cytspb.rssi.ru.

Апоптоз является одним из важнейших защитных механизмов и обеспечивает контроль над качеством и количеством клеток в многоклеточном организме. Известно, что зачастую возникновение и развитие опухоли связаны с неправильной работой апоптотической системы, поэтому индукцию апоптоза используют как один из подходов в терапии канцерогенеза и ряда других заболеваний. Хроническая миелогенная лейкомия характеризуется нарушениями хромосомного набора, которые выражаются в появлении филадельфийской хромосомы: реципрокной транслокации длинных цепей хромосом 9 и

22. В результате этого наблюдается конститутивная активация BCR-ABL тирозинкиназы, что, по-видимому, вызывает повышенную устойчивость как к лучевой терапии, так и к химиотерапии. Клетки хронической миелогенной лейкомии человека линии K562 обрабатывали с помощью противоопухолевого препарата доксорубицина (ДР). С помощью проточной цитофлуориметрии было показано, что при воздействии ДР в концентрации 0.5 мкМ в течение 24 ч клетки останавливаются в G₂/M-фазе, тогда как через 48 ч — в фазе S. Однако из литературы известно, что такая концентрация ДР вызывает апоптоз во многих клетках опухолевого происхождения. Повышение концентрации ДР до 4 мкМ вызывало блок клеточного цикла в G₀/G₁ через 24 ч, и только через 48 ч около 20—30 % клеток уходило в апоптоз. Однако при оценке индукции апоптоза по изменению морфологии ядер (окрашивание красителем Hoechst 33258) и межнуклеосомной фрагментации ДНК оказалось, что концентрация ДР 4 мкМ вызывает апоптоз около 6—10 % клеток уже и через 24 ч. Повышение концентрации ДР с 4 до 8 мкМ не вызывало значительных изменений в поведении клеток K562 как при 24 ч, так и при 48 ч воздействия данного агента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00834), фонда президента РФ по поддержке ведущих научных школ (НШ-774.2008.4) и молодых российских ученых (МК-779.2008.4) и с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ НА ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНУЮ МИГРАЦИЮ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА. © Ю. В. Э. А. Старикова, С. А. Александрова, Н. С. Николаенко, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В настоящее время существует представление о том, что стволовые клетки костного мозга (СККМ) в ответ на определенные сигналы находят из ниши, поступают в кровеносное русло и достигают поврежденного участка ткани, где, превращаясь в дифференцированные клетки, способствуют восстановлению структурной и функциональной целостности данной ткани. Целью настоящей работы является изучение механизмов, лежащих в основе миграции СККМ из кровеносного русла в ткань. Выделение СККМ проводили по отработанной методике, обеспечивающей максимально полное очищение стромальных клеток от клеток гемопоэтического ряда. Проводили оценку влияния цитокинов TNF α , TGF β и IL-8 на интенсивность трансэндотелиальной миграции стромальных клеток через монослой эндотелиальных клеток. Для моделирования процесса трансэндотелиальной миграции использовали модифицированные камеры Бойдена (трансвеллы). В верхнюю камеру вносили эндотелиальные клетки линии EA.hy 926 и инкубировали до формирования конфлюэнтного монослоя, который оценивали микроскопически. Далее в верхнюю камеру вносили стромальные клетки второго пассажа, а в нижнюю камеру — цитокины. Было показано, что стромальные клетки второго пассажа спонтанно (в отсутствие индуктора) через монослой эндотелиальных клеток не мигрируют. Под влиянием TNF α , TGF β и IL-8 интенсивность

миграции усиливалась. Наиболее сильным эффектом в отношении трансэндотелиальной миграции стромальных клеток обладали TNF α и TGF β . Таким образом, TNF α и TGF β могут играть важную роль в регуляции миграции стромальных стволовых клеток в участок повреждения тканей.

СУДЬБА КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ БЛАСТОЦИСТ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6-TGN(АСТВЕГFP)10SB/J.
© Е. Ф. Вихлянцева, А. А. Смирнова, Н. Ю. Сахарова, Б. К. Гаврилюк. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино.

Культивирование бластоцист является важным этапом при получении эмбриональных стволовых клеток млекопитающих, которое зависит от состояния клеток внутренней клеточной массы (ВКМ), а именно от сохранения ими тотипотентности и способности к размножению. На модели длительно культивируемой бластоцисты мышей можно исследовать поведение клеток трех возникающих субпопуляций (клетки-потомки клеток ВКМ, внезародышевой энтодермы и трофобласта). В этом отношении представляет интерес эмбриональный материал, полученный от животных, в геном которых включен трансген улучшенного зеленого флуоресцирующего белка (EGFP). С помощью флуоресцентного микроскопа можно следить за судьбой «зеленых» клеток и достоверно отличать их от клеток фидерного слоя. Для того чтобы выяснить, влияет ли EGFP на судьбу клеток, мы сравнивали состояние бластоцист, несущих ген *EGFP* и не имеющих его. Зародышей получали от самок C57BL/6, оплодотворенных гемизиготными самцами EGFP. Бластоцисты после вылупления из zona pellucida были перенесены на фидерный слой клеток МЕФ. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе в течение 10 сут в среде α -МЕМ с 20 % FBS + 1000 ЕД/мл LIF. Смену среды проводили ежедневно. На следующий день после прикрепления к фидеру бластоцисты представляли собой плотные скопления клеток, являющихся потомками недифференцированных клеток ВКМ, окруженные клетками внезародышевой энтодермы и гигантскими клетками трофобласта. Во флуоресцентном микроскопе клетки всех трех субпопуляций проявляли специфическое свечение. Последующие наблюдения проводили в светлом поле и лишь в последний день использовали флуоресцентный микроскоп. Через 5 сут культивирования все бластоцисты имели сходный вид. Они представляли собой скопления клеток-потомков ВКМ, окруженные выселяющимися клетками внезародышевой энтодермы и гигантскими клетками трофобласта. Через 6 сут в центральном скоплении помимо плотных кластеров мелких клеток ВКМ хорошо идентифицировались группы клеток, имеющих строение, сходное с эпителиальными клетками различного типа. Плотные скопления четко отделялись от клеток внезародышевой энтодермы. Через 7 сут были выявлены различия в состоянии культивируемых бластоцист. Некоторые бластоцисты представляли собой крупные конгломераты клеток ВКМ с четкой внешней границей. Вокруг плотных скоплений располагались гигантские клетки трофобласта и энтодермальные клетки. У других бластоцист центральное скопление не имело четко выраженных границ. По-видимому, из плотного скопления происходит интенсивное выселение

энтодермальных клеток. Через 10 сут культивирования бластоцисты также различались по внешнему виду. Некоторые из них состояли из плотных кластеров мелких клеток, отделенных четкими границами от клеток внезародышевой энтодермы. У других бластоцист на месте плотных скоплений клеток-потомков ВКМ рыхло располагались клетки внезародышевой энтодермы. Обнаруженные различия в строении говорят о двух разных состояниях длительно культивируемых бластоцист. В одних случаях сохраняются собственно клетки ВКМ, которые формируют плотные кластеры, вероятно за счет активной пролиферации. В других случаях кластеры клеток ВКМ не выражены, но при этом клетки внезародышевой энтодермы занимают обширную площадь. Эти наблюдения показали, что возможны два разных направления клеточных изменений в длительно культивируемых бластоцистах: 1) в процессе культивирования сохраняются потомки недифференцированных клеток ВКМ в виде плотных кластеров; 2) в процессе культивирования пролиферация клеток-потомков клеток ВКМ ингибируется, и они, по-видимому, дифференцируются в клетки внезародышевой энтодермы. С помощью флуоресцентного микроскопа показано, что трансген зеленого белка не влияет на выживаемость трех субпопуляций клеток. Культивирование бластоцист, несущих ген *EGFP*, также может идти по двум разным направлениям. Это говорит о том, что зеленый белок не влияет на судьбу клеток культивируемых бластоцист.

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГРАВИРЕЦЕПЦИИ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ. © Ю. Г. Гершович, П. М. Гершович, Л. Б. Буравкова. ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, juliet_g@mail.ru.

Гравитация является фундаментальным механическим фактором, определяющим особенности эволюции и структурно-функциональной организации живых организмов на Земле. Одним из факторов космического полета, лимитирующим ввиду его дезадапционного воздействия по отношению к земным условиям продолжительность пребывания человека в космическом пространстве, является невесомость, или микрогравитация. Известно, что в условиях микрогравитации происходят атрофические перестройки опорно-двигательного аппарата, преимущественно выраженные в тех его отделах, которые отвечают за противодействие силе гравитации. Такой локальный характер изменений костной ткани позволяет предположить, что рецепция механического сигнала (или его отсутствия) может осуществляться в том числе и на клеточном уровне. Вопрос о том, какой именно тип клеток костной ткани наиболее восприимчив к механическим воздействиям, остается в значительной мере дискуссионным. В моделях *in vitro* наиболее популярным объектом для изучения механического стресса (например, fluid shear stress) являются различные линии остеобластов как наиболее вероятные механосенсоры костной ткани. Однако обусловленное микрогравитацией изменение способности к самовозобновлению и дифференцировке кости указывает на то, что в эти процессы могут быть вовлечены и более ранние клетки-предшественники. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга (МСК) при опреде-

ленных условиях способны к дифференцировке в костном, хрящевом и жировом направлениях. Важным свойством МСК является их чувствительность к различным воздействиям, а также наряду с остеобластами способность к выработке широкого спектра биологически активных веществ, которые потенциально могут выступать в качестве регуляторов костного гомеостаза. Наиболее вероятными кандидатами на роль гравитационно-чувствительных структур клетки выступают рецепторные белки семейства интегринов. Интегрины опосредуют взаимодействие клеток друг с другом и внеклеточным микроокружением, а также осуществляют взаимосвязь матрикса с цитоскелетом клетки. Примечательно, что на мембране МСК экспрессируется огромное количество молекул адгезии и интегринов, регулирующих различные аспекты функционирования этих клеток, в том числе и их дифференцировочные потенции. В связи с вышесказанным данный тип клеток представляется уникальной моделью для изучения влияния различных физических и химических факторов *in vitro*. Наши исследования были посвящены изучению влияния моделирования эффектов микрогравитации (3D-клиностамирование) на актиновый цитоскелет и экспрессию связанных с ним отдельных типов интегринов у культивируемых мезенхимных стромальных клеток-предшественников костного мозга человека. Также мы изучали дифференцировочный потенциал МСК при моделировании эффектов микрогравитации *in vitro*. Оказалось, что актиновый цитоскелет МСК в короткие сроки (начиная от нескольких минут) реагирует на измененное гравитационное воздействие, что выражается в реорганизации структуры актиновых фибрилл и увеличении количества винкулиновых сайтов фокальной адгезии. В процессе 120-часового клиностамирования усиливается экспрессия клетками связанного с актином и винкулином интегрин $\beta 2 \nu 1$, что регистрируется по увеличению иммунофлуоресценции с помощью проточной цитофлуориметрии. Длительное клиностамирование приводит к модификации остеогенного потенциала дифференцировки МСК, не вызывая выраженных изменений в способности клеток дифференцироваться в адипогенном направлении. Культуры МСК-производных характеризуются редуцированной активностью щелочной фосфатазы (раннего маркера дифференцировки остеобластов), а также в существенно меньшей степени минерализуют внеклеточный матрикс. Особенно важно отметить, что под действием клиностамирования в культурах МСК, индуцированных в остеогенном направлении, активируются процессы, приводящие к увеличению числа клеток, которые приобретают адипоцитоподобный фенотип. Таким образом, полученные нами результаты согласуются с концепцией о потенциальном участии низкодифференцированных клеток-предшественников в реализации восприятия тканью различного рода механических стимулов.

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕОЛИТОВ КУЛИКОВСКОГО И ЛЮЛЬИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЙ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НТ-29 И JB6 C141. © К. С. Голохваст,¹ С. П. Ермакова,² А. М. Паничев,³ М. И. Кусайкин.² ¹ Институт нефти и газа ДВГТУ, ² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН и ³ Тихоокеанский институт географии ДВО РАН, Владивосток.

В зарубежной литературе появилось несколько сообщений о том, что природные минералы — цеолиты — в концентрации 50 мг/мл проявляют антиканцерогенные свойства *in vitro* (Pavelic K. et al., 2000, 2001, 2002). Целью настоящего исследования является изучение цитотоксического и возможного противоопухолевого действия цеолитов Куликовского и Люльинского месторождений *in vitro* в концентрациях 0.01, 0.1 и 1 мг/мл. Для оценки цитотоксичности веществ, роста клеток и антиопухолевого действия были использованы опухолевые клетки НТ-29 (рак кишечника) и клетки линии JB6 C141 с применением MTS-метода и метода мягкого агара. MTS-метод основан на свойстве живых клеток трансформировать MTS-реагент в формазан. Количество образовавшегося формазана пропорционально количеству оставшихся в живых клеток после воздействия вещества и определяется спектрофотометрически при 492 нм. Клетки JB6 C141 (10^4 клеток в 1 мл) рассевали в 96-луночные планшеты и культивировали в 200 мкл 5%-ной MEM в инкубаторе при 37 °C в течение 24 ч. Затем клетки обрабатывали цеолитами различной концентрации и инкубировали в течение 24 ч. После инкубирования добавляли по 15 мкл 3-(4,5-диметилсазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромид и помещали в инкубатор (37 °C) на 4 ч. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре фирмы Bio-Tek Instruments (США) при длине волны 570 нм (A_{570}). Метод мягкого агара (Colburn et al., 1981) основан на том, что раковые клетки, находящиеся в неприкрепленном состоянии, в толще мягкого агара дают рост клеточных колоний, тогда как вещества, обладающие антиопухолевым действием, ингибируют рост клеточных колоний. Число клеточных колоний подсчитывали в контрольной и экспериментальной группах. Клетки рака кишечника человека НТ-29 культивировали в MEM, 10 % FBS. В работе были использованы коммерческие препараты фирмы «Биолот»: питательные среды MEM, BME, EGF, фосфатный буфер, пенициллин, стрептомицин, L-глутамин, трипсин, ЭДТА, эмбриональный бычий альбумин и NaHCO_3 . Клеточные линии JB6 C141 и НТ-29 были получены из Hormel Institute University of Minnesota (Austin, MN, США). В концентрациях 0.01, 0.1 и 1 мг/мл цеолиты Куликовского и Люльинского месторождений не были токсичными для клеток JB6 C141 и не ингибировали рост колоний клеток НТ-29 в мягком агаре.

РАЗОБЩЕНИЕ НОРМАЛЬНОГО ПРОТЕКАНИЯ МИТОЗА ПРИ ТЕРМИЧЕСКОМ СТРЕССЕ. © С. А. Голышев,¹ Е. А. Арифудин,¹ И. М. Бужурина,¹ Е. М. Лазарева,² В. Ю. Поляков.¹ ¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии Московского государственного университета, sergei.golyshev@genebee.msu.ru, и ² Биологический факультет Московского государственного университета.

В работе изучена реакция митотических клеток на термический стресс. В качестве модельной системы использованы культивируемые клетки СПЭВ. Клетки инкубировали при 44 °C в течение 60 мин, после чего фиксировали спустя различные промежутки времени после переноса в нормальные условия культивирования. Показано, что термический стресс не приводит к заметным повреждениям интерфазных клеток. Все наблюдаемые изменения обратимы. Клетки сохраняют жизнеспособ-

ность и через 2 ч после снятия высокой температуры способны к вхождению в митоз. Первичной реакцией митотической клетки на термический стресс, наблюдаемой через 15 мин после начала термической обработки, является разрушение митотических фигур, сопровождающееся укорочением и утолщением индивидуальных хромосом. Спустя 60 мин в клетке формируется несколько агрегатов ДНК-содержащего материала. Эти изменения необратимы. Клетки с характерными повреждениями хромосом прослеживаются в популяции вплоть до 14 ч после снятия высокой температуры. Клетки, содержащие морфологически измененные хромосомы, способны индуцировать конденсацию хроматина при слиянии с интерфазными клетками, содержат энергизованные митохондрии и демонстрируют реконструкцию митохондриального ретикулума с течением времени. Эти данные позволяют заключить, что термическое воздействие не приводит к потере жизнеспособности митотических клеток, однако блокирует нормальное завершение деления. Детальное изучение морфологии хромосом в клетках, подвергнутых термическому стрессу, проводили на хромосомных препаратах. Показано, что индивидуальные хромосомы окружены ДНК-содержащим «галом». Окрашивание нитратом серебра не выявляет ядрышковых организаторов. Наблюдаются существенное укорочение хромосом и сегрегация центральных зон («скэффолда») отдельных хроматид. В качестве теста на функциональное состояние хромосом было изучено их взаимодействие с компонентами ядерной оболочки — ядерными мембранами и ламинами. Было показано, что спустя 4 ч хромосомы из клеток, перенесших термический стресс в митозе, не взаимодействуют с ламинами, что характерно для метафазных клеток. Ультраструктурный анализ показал отсутствие контактов мембранных цистерн с хромосомами. Также показано, что хромосомы не взаимодействуют с микротрубочками. Полученные данные свидетельствуют о том, что термический стресс, перенесенный митотической клеткой, приводит к необратимому повреждению митотических хромосом и разобщению «хромосомного» и «цитоплазматического» циклов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49560-а).

КРАТКОВРЕМЕННОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ФИБРОБЛАСТОВ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА С МЛУ УСКОРЯЕТ ПРОЦЕСС ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ГЕНОМА. © Т. М. Гринчук, И. В. Арцыбашева, Л. Л. Алексеенко, Н. В. Веселов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, gmdmk@mail.cytspb.rssi.ru.

Кариотипический анализ окрашенных на G-диски метафазных хромосом фибробластов китайского хомячка CHL V-79 RJK с МЛУ, вызванный селекцией клеток на устойчивость к бромистому этидию (БЭ), выявил прогрессирующую во времени или в связи с увеличением концентрации агента дестабилизацию структуры кариотипа. Первым ее проявлением была морфологическая нестабильность локуса 1q26, ответственного за локализацию гена *mdr*. В небольшом числе случаев это было связано с поломкой хромосомного материала в данном

локусе и последующим делетированием терминальной части р-плеча данной хромосомы, в большей части клеток — с наличием дополнительного генетического материала (ДГМ), организованного по типу ГОО или ДОО, трактуемого как морфологические проявления амплификации гена *mdr*. В связи с длительным культивированием или повышением концентрации БЭ возникшая нестабильность прогрессировала и была разнонаправленной: длина ГОО (ДОО) в 1q26 возрастала, появлялись ДОО (ГОО) в других хромосомах набора и хромосомные поломки, приводящие к образованию новых маркеров. Данные изменения носили каскадный характер и были связаны с определенным этапом селекции. Объект настоящего исследования — клетки CHL V-79 RJK-БЭ, первая ступень селекции, ранний пассаж. Основной кариотипический маркер клеток — варьирующие по длине ГОО (ДОО) в 1q26 хромосомы Z6 с преобладанием вариантов (50 % от всех клеток с ГОО—ДОО), у которых длина ДГМ превышала длину р-плеча хромосомы-носителя в 2.3 раза. Целью работы было проанализировать структуру кариотипа устойчивых к БЭ клеток в связи с изменением температурного режима при их культивировании. Анализ окрашенных на G-диски метафазных хромосом показал, что культивирование клеток CHL V-79 RJK в течение 1 ч при 40 °С вместо 37 °С сопряжено с дополнительной дестабилизацией их кариотипа. В 30 % клеток длина ГОО (ДОО) возросла и превысила длину р-плеча хромосомы-носителя в 3.3 раза. Число клеток с ГОО (ДОО) меньшей длины уменьшилось. В некоторых клетках возникли как специфические, характерные для устойчивых к бромиду вариантов поломки хромосомного материала, так и не типичные для резистентных клеток хроматидные разрывы. В клетках исходной, чувствительной к БЭ линии, использованной в качестве контроля, при повышении температурного режима структура хромосом кариотипического набора оставалась стабильной. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что кратковременное повышение температуры при культивировании клеток CHL V-79 RJK с МЛУ приводит к ускорению процесса дестабилизации клеточного генома. Предполагается, что индуцированная повышением температуры кариотипическая нестабильность клеток CHL V-79 RJK причинно связана с усилением функциональной активности гена *mdr* в связи с приобретением клетками устойчивости к БЭ — агенту, вызывающему МЛУ.

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОНОЦИТОВ/МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА. © С. В. Гуськова,¹ Е. В. Грачева,¹ Д. С. Зайцева-Зотова,² И. И. Селезнева,³ Н. Н. Самовилова.¹ ¹ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий, samovilova@cardio.ru, ² Институт биоорганической химии РАН и ³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Москва.

Культивируемые моноцитпроизводные макрофаги являются наиболее адекватной моделью клеточных элементов, формирующих атеросклеротические поражения у человека *in vivo*. Разработка технологий поддержания дифференцированного состояния и биологической активности макрофагов в процессе культивирования, которая позволяет последующее атравматичное открепление клеток от подложки, является актуальным и перспектив-

ным направлением современной биологии и медицины. Широкие возможности для создания таких технологий открывает использование подложек из термочувствительных полимеров, которые растворяются при незначительных изменениях температуры, что позволяет получить суспензию неповрежденных дифференцированных субстратзависимых клеток. Мононуклеары из периферической крови здоровых доноров выделяли в градиенте плотности 1.077 и культивировали в течение 7 сут для получения моноцитпроизводных макрофагов согласно стандартному протоколу. Клетки культивировали на обычном культуральном пластике (П) или пластике, покрытом термочувствительной пленкой (П-ТП). В работе использовали сополимер N-изопропилакриламид/N-третбутилакриламид в соотношении 65 : 35, который испытывает фазовый переход из нерастворимого в растворимое состояние при температуре около 16 °С. Для формирования пленки использовали 5%-ный раствор сополимера в абсолютном этиловом спирте. Толщина получаемой пленки составляла 5 мкм. После 7 сут культивирования получали суспензии клеток, выращенных на П и П-ТП, и сравнивали жизнеспособность клеток и экспрессию ими дифференцировочных антигенов моноцитов/макрофагов (CD14, CD206 и CD163) с помощью проточной цитометрии. Через 7 сут культивирования клетки, высаженные на П и П-ТП (П-клетки и П-ТП-клетки), приобретали морфологию типичных макрофагов. П-клетки снимали с подложки с помощью скрайбера. Суспензию П-ТП-клеток получали, растворяя термочувствительные пленки снижением температуры культивирования до 4 °С. Жизнеспособность клеток, определенная в тесте с трипановым синим и проточной цитометрией с использованием 7-AAD, составляла для П- и П-ТП-клеток 40 и 80 % соответственно. Количество моноцитпроизводных макрофагов (CD14+ -клеток), экспрессирующих CD206-антиген, было сходно в П- и П-ТП-клетках (около 65 %). Доля клеток, несущих CD163-антиген, составляла среди П- и П-ТП-клеток 27 и 15 % соответственно. Использование термочувствительных пленок для культивирования клеток позволяет получить суспензии дифференцированных макрофагов со значительно более высокой жизнеспособностью, чем при культивировании на стандартном пластике, пригодных для анализа проточной цитометрией и для применения в клеточной терапии. Различия в экспрессии CD163-антигена свидетельствуют о том, что типы активации макрофагов, культивируемых на П- и П-ТП, различны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48277-а).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА GD-2-СИНТЕТАЗЫ В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЛИНИЙ SK-N-MC И IMR-32 © А. Е. Друй,¹ Г. А. Цаур,^{2,3} А. С. Иванова,^{2,3} Ю. А. Яковлева,^{2,3} Е. В. Шориков,^{2,3} Л. И. Савельев,¹⁻³ Л. Г. Фечина.^{2,3} ¹ Уральская государственная медицинская академия, ² Областная детская клиническая больница № 1 и ³ Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург.

Нейробластома — наиболее распространенная экстракраниальная злокачественная солидная опухоль у детей. Клинические проявления заболевания варьируют в

широких пределах от локализованных форм с относительно благоприятным прогнозом до диссеминированных, часто с фатальным исходом. Полиморфизм клинических проявлений связан с различными биологическими особенностями опухоли. Выявление клеток нейробластомы в костном мозге важно для корректного определения клинической стадии, степени риска и мониторинга терапевтического ответа в течение лечения. Для определения опухолевых клеток применяется определение экспрессии специфических маркеров: тирозин-гидроксилазы, GAGE, MAGE (1—4), GD-2-синтетаза, дофаминдекарбоксилаза и др. Фермент GD-2-синтетаза (1,4-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза) катализирует переход 1,4-N-галактозамина в GD-3-ганглиозид и является ключевым в процессе биосинтеза дисиалоганглиозида GD-2. Транскрипт гена GD-2-синтетазы активно экспрессируется в клетках нейроэктодермальной природы и поэтому может использоваться для выявления опухолевых клеток в костном мозге и в диагностике минимальной остаточной болезни при нейробластоме. Целью исследований явилось определение активности экспрессии гена GD-2-синтетазы в клетках нейробластомы линий SK-N-MC и IMR-32 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Клеточные линии SK-N-MC и IMR-32, полученные из Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), культивировали в среде DMEM («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург) и гентамицина (50 мкг/мл) во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Клетки снимали с использованием смеси 0.5%-ного раствора трипсина и Версена (1 : 3). Оценку жизнеспособности осуществляли при помощи трипанового синего. Из полученной клеточной суспензии (около 4 · 10⁶ клеток) выделяли РНК с помощью препарата TriReagent (Sigma-Aldrich, Германия). Сразу же после выделения РНК была поставлена реакция обратной транскрипции. Относительную экспрессию гена, кодирующего GD-2-синтетазу, оценивали в ходе мультиплексной ПЦР в реальном времени с использованием TaqF-полимеразы (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). В качестве контрольного гена был использован ген *ABL*. Для исключения случайной ошибки все пробы тестировали в двух повторах. В состав реакционной смеси (конечный объем 25 мкл) входили следующие праймеры и зонды: для гена *GD-2* — 5'-AGC CGA AGC TAC CAG ACC AA-3', 5'-GGA TAG TGA AAG CAG CCT CAT GT-3' и ROX-ACA GCA GAC ACA GTC CGG TTC TCC ACC-BHQ2; для гена *ABL* — 5'-TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T-3', 5'-GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA-3' и FAM-CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T-BHQ1. Конечная концентрация праймеров — 300 ммоль/мкл, зондов — 200 ммоль/мкл, хлорида магния — 3.5 ммоль/мкл. Диапазон допустимых значений порогового цикла гена *ABL* взят исходя из рекомендаций организации Europe against Cancer (Gabert et al., 2003). Образцы, в которых уровень порогового цикла превышал 30, расценивали как сомнительные и результаты измерения экспрессии GD-2-синтетазы не анализировали из-за низкого качества или малого количества исходной РНК. Экспрессия генов *ABL* и *GD-2* выявлена во всех образцах клеточных линий нейробластомы. Величина порогового цикла гена *ABL* для клеток SK-N-MC составила 20.48 ± 0.29, для клеток IMR-32 — 21.41 ± 0.29 (*P* = 0.049). Экспрессия гена *GD-2* в двух клеточ-

ных линиях различалась: SK-N-MC — 21.83 ± 0.26 , IMR-32 — 19.94 ± 0.37 ($P = 0.002$). Данный феномен, вероятно, связан с отсутствием амплификации онкогена N-мус в клетках SK-N-MC и ее наличием в клетках IMR-32 (25 копий). Определение экспрессии гена *GD-2* в линейных клетках нейробластомы методом ПЦР в реальном времени позволяет использовать эти клетки в качестве стандартов для последующего выявления поражения костного мозга у пациентов с нейробластомой.

ПОЛУЧЕНИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА. © Ю. Б. Дьякова, А. В. Шуклин, А. М. Самарина, М. А. Александрова. Институт биологии развития РАН, Москва, center65@list.ru.

Нейральные стволовые и прогениторные клетки (НСПК) присутствуют при развитии и сохраняются во взрослом мозге, где они сосредоточены в специальных нишах. Экспрессия кислого глиального фибриллярного белка (GFAP) этими клетками ставит вопрос об их онтогенетической связи с астроцитами. В настоящее время показано, что наличие S100B в GFAP-экспрессирующих клетках свидетельствует о фенотипе относительно дифференцированного астроцита, а наличие маркера LeX/CD15, напротив, говорит о способности к пролиферации и дифференцировке в различные типы нейральных клеток. Целью нашей работы явился анализ типов клеток, высеваемых из аутопсийного материала человека, и получение нейральных прогениторных/GFAP-экспрессирующих клеток из того же источника. В работе было использовано 12 образцов мозга человека спустя 12—26 ч после смерти. Полученные культуры были проанализированы на наличие маркеров нейральных клеток (GFAP, S100B, LeX/CD15, β III-tubulin, Nestin, O4, N-Cadh, TH, Calb, NF и Vimentin), мезенхимных клеток (α -actin, smooth muscle α -actin, CD34, CD49, CD105, hSTRO1, CD45 и CD11b), пролиферативной активности (Ki67), клеточных контактов (Cx43) и внеклеточного матрикса (Collagen I, Fibronectin). Клетки выделяли с использованием 0.05%-ного раствора трипсина или аккутазы (Sigma). Для отделения фракции живых клеток суспензию центрифугировали в градиенте сахарозы. В процессе выбора наиболее подходящих условий культивирования мы использовали следующие среды: среда DMEM:F12 (1 : 1) с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка (FBS), среда DMEM:F12 с добавлением ростовых факторов EGF и bFGF (Sigma) и нейральными добавками N2 и B27 (Invitrogen) (бессывороточная среда) и среда для культивирования эмбриональных стволовых клеток (DMEM:F12, 6 % FBS, 6 % Serum Replacement (Invitrogen), EGF, bFGF и LIF). Первичные культуры сажали на среду с сывороткой и среду для культивирования эмбриональных стволовых клеток, для получения суспензионной культуры клетки постепенно переводили на бессывороточную среду и пассировали с использованием аккутазы. Для иммуногистохимического анализа клетки фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 15 мин. Использовали двойное окрашивание клеток, первичные антитела визуализировали при помощи вторичных anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen, 1 : 200) и anti-rabbit Texas Red (Jackson, 1 : 100). Ядра окрашивали при помощи Hoechst 33342. В полученных культурах методами морфологического и иммуногисто-

химического анализа были выявлены следующие типы клеток: фиброзные и протоплазматические астроциты, лежащие одиночно или группами и экспрессирующие GFAP, Vimentin, в некоторых случаях — S100B; мелкие (30—40 мкм) отростчатые клетки, иммунопозитивные к LeX/CD15; олигодендроциты — округлые сидячие клетки, иногда с небольшими отростками, экспрессирующие O4; фибробласты — активно пролиферирующие клетки, экспрессирующие Ki67, Collagen I и fibronectin; мезенхимные клетки, вставшие на путь миогенной дифференцировки с экспрессией α -actin. При культивировании на эмбриональной среде относительное содержание астроцитов и CD15-позитивных клеток было выше, чем на среде просто с 10 % сыворотки. Высокой пролиферативной активностью во всех культурах обладали преимущественно фибробласты, которые через несколько недель культивирования становились преобладающим типом клеток. При культивировании на бессывороточной среде были получены свободноплавающие агрегаты клеток, в которых отсутствовала пролиферация. Таким образом, в культурах аутопсийного мозга человека помимо фибробластов и мезенхимных клеток содержатся GFAP-экспрессирующие клетки обоих типов, но содержание их в культурах невелико.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00081).

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ИЗУЧЕНИИ СВОЙСТВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ. © В. А. Емельяненко. ФГУП С.-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов ФМБП России.

Пробиотические бактерии, главным образом представители родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, являются основными компонентами нормальной микрофлоры организма человека и многих животных, а также входят в состав терапевтических пробиотических препаратов, биологически активных добавок и продуктов функционального питания. Одним из условий успешной работы этих бактерий является их способность прикрепляться к поверхности слизистых оболочек кишечника и размножаться там, вытесняя таким образом нежелательные микроорганизмы за счет выделения антагонистически активных продуктов метаболизма и конкурентных взаимоотношений. В связи с этим изучение адгезивных свойств бифидобактерий и лактобацилл необходимо при установлении их специфической активности. Оценку адгезивной активности целесообразно проводить у новых штаммов пробиотических микроорганизмов, выступающих в качестве кандидатов для производства новых препаратов, у вновь выделенных изолятов, у селекционных вариантов уже известных штаммов. Кроме того, необходимо вести параллельные испытания антагонистической активности, кислотообразования, состава продуктов метаболизма, технологически этих штаммов и их клинической эффективности. Сопоставив полученные результаты и установив их коррелятивные связи, можно делать вывод о вкладе каждого процесса в механизмы действия изучаемых пробиотиков. Дело в том, что до сих пор ведутся споры об адекватности наших представлений о

пробиотиках и их реальном действии в составе препаратов и в составе микробиоты. Большие надежды в разрешении этого спора возлагаются именно на изучение адгезивных свойств бифидо- и лактобактерий. Существует несколько методов определения адгезивной активности бактерий. Это делают путем прямого наблюдения с помощью фазово-контрастной, растровой и сканирующей электронной микроскопии. Опосредованный способ изучения адгезии может быть основан на установленной аргентинскими исследователями (Pérez et al., 1998) корреляции между прикреплением штаммов *Bifidobacterium*, выделенных из фекалий детей и коммерческих молочнокислых продуктов, к энтероцитоподобным клеткам и ауто- и гемагглютинацией этих организмов. Прикрепление к стеклу оказалось неспецифичным и отбрасывалось как критерий селекции прикрепленных клеток. Авторы сделали вывод о том, что данные результаты обеспечивают метод для предварительной селекции бактерий, которые потенциально могут прикрепляться к эпителиальным клеткам с помощью аутоагглютинации. Эти же авторы описывают опыты на монослойной культуре клеток Caco-2 (Bibiloni et al., 1999). Использование клеточных культур сопряжено с большими методическими трудностями, требующими специальных условий, но они позволяют наилучшим образом оценить вклад адгезивных свойств пробиотических бактерий в механизмы их действия. Клеточные культуры также позволяют определить цитотоксичность малоизученных штаммов бактерий при создании новых пробиотиков.

ФУНКЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК И ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМАЛЬНО-ЭПИДЕРМАЛЬНОГО СЛОЯ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА КОЛЛАГЕН-ХИТОЗАНОВЫХ ПОКРЫТИЯХ.
© А. В. Еремеев,^{1,2} А. С. Замай,¹ Н. В. Зотова,¹ А. А. Власов,² С. Ж. Езекян,² В. А. Арапова.² ¹ Центр репродуктивной медицины, Красноярск, krasivf@kcrm.ru, и ² Красноярская государственная медицинская академия bolin@siberianet.ru.

Восстановление кожных покровов является одной из важнейших проблем лечения больных с обширными и глубокими ожогами, трофическими язвами, другими травматическими повреждениями кожи. Мы предположили, что разработанные ранее коллаген-хитозановые матрицы, содержащие гликозаминогликаны и факторы роста, и применение их с мультипотентными клетками позволят создать дермально-эпидермальный эквивалент кожи. В частности, были поставлены задачи сравнить функциональную активность эмбриональных фибробластов и плюрипотентных (эмбриональных стволовых) клеток (ЭСК) в различных условиях культивирования на раневом коллаген-хитозановом покрытии «Коллахит-Бол» (патент РФ № 2252787 от 27.05.2005). В работе использовали первичную культуру эмбриональных фибробластов крысы 3-го пассажа, полученную из 7—10-суточных фетусов, и стромальные клетки крысы из подкожной жировой ткани после ее диспергирования. В ряде экспериментов использовали культуры ЭСК и фибробластов человека. Получение первичной культуры эмбриональных фибробластов и последующую процедуру получения метафазных пластинок для карiotипирования проводили по модифицированной методике Назаренко и Васильева (2003). Использовали раневые покры-

тия «Коллахит-Бол» в качестве клеточных матриц. В клетках определяли признаки апоптоза, уровень ионов Ca^{2+} и pH. Апоптоз определяли с помощью красителя Hoechst 33342 и иодида пропидия. Использование рекомбинантных факторов роста при добавлении в матрицу не только значительно увеличивает ее стоимость, но также увеличивает возможность иммунного ответа на чужеродный белок. Добавление к матрице среды, кондиционированной клетками, может помочь избежать вышеуказанных проблем и получить подложки для культивирования клеток разных типов, в том числе стволовых. Для проверки этого предположения при культивировании фибробластов каждые 3-и сут отбирали культуральную среду, которую фильтровали и вносили во флакон с «Коллахит-Болом». В эту систему кроме фибробластов добавляли среду для плюрипотентных клеток в соотношении 1 : 1, затем высевали плюрипотентные клетки. Была показана возможность таких клеток дифференцироваться в кератиноциты в присутствии культивируемых на покрытии фибробластов. Посев на матрицы вызывал апоптоз фибробластов в культуре через 24 ч (52 % апоптозных клеток). В дальнейшем число апоптозных клеток уменьшалось. В течение последующих 9 сут инкубации такие клетки в культуре практически не обнаруживались. Известно, что внутриклеточный кальций и pH являются одними из факторов, регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза. До культивирования клеток концентрация Ca^{2+} в фибробластах была 12.4 нМ, а через 24 ч инкубации увеличивалась до 67 нМ, возможно вследствие интенсификации апоптотических процессов. При дальнейшей инкубации фибробластов на матрицах содержание Ca^{2+} в клетках не менялось. Аналогичная картина наблюдалась и для значений pH. Исследование морфологии дифференциально окрашенных хромосом показало, что в клетках, культивируемых на коллаген-хитозановых матрицах до 5 сут, число хромосом и их морфология не изменялись. Исследование морфологии ЭСК показало, что культивирование на указанных подложках может поддерживать в течение 7 сут нормальное морфологическое состояние дифференцирующихся колоний плюрипотентных клеток. Таким образом, использование коллаген-хитозанового комплекса «Коллахит-Бол» приводило к обратимым изменениям физико-химических свойств клеток. Это свидетельствует об отсутствии цитотоксической реакции при контакте с матрицами. Совместное культивирование на раневых покрытиях эмбриональных фибробластов и стволовых клеток подкожно-жировой клетчатки формирует признаки дермально-эпидермального эквивалента кожи, что может иметь прикладное значение для реконструкции пораженной или отсутствующей кожи при глубокой и обширной ожоговой травме.

МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ БТШ70 ПРИРОДНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ. © Е. М. Еременко,¹ Н. А. Рыжов,² А. А. Пименова.³ ¹ Биолого-почвенный факультет и ² Химический факультет С.-Петербургского государственного университета, ekerm@mail.ru, и ³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Клеточные линии человека и животных используют для изучения действия различных природных соединений и тестирования фармакологических препаратов.

Известно, что белки теплового шока (БТШ) играют важную роль в защите клеток от разнообразных повреждающих факторов, поэтому поиск факторов, способных повысить уровень данного белка в клетках и тканях организма, имеет большое значение для конструирования терапевтических средств нового поколения. Нами было изучено влияние препаратов различной химической природы, выделенных из морских беспозвоночных, на модуляцию уровня БТШ70 в различных клеточных линиях. Было установлено, что вещества, относящиеся к тригерпеноидной группе, такие как эхиноцистовая кислота, вызывают увеличение уровня БТШ70 в клетках эритробласты человека К-562. Варацинацетат, выделенный из асцидии, приводит к накоплению БТШ70 в клетках Т-98 и инициирует процесс апоптоза в клеточной популяции сходным образом с куркумином — препаратом, испытания которого проходят в настоящее время в различных моделях онкопатологии. Соединения алкалоидной природы макалувамина Ж и С по-разному действуют на клетки-модели; обработка клеток миелоидной лейкемии человека U-937 первой приводит к снижению уровня БТШ70 и стимулирует апоптоз, а макалувамин С, напротив, способен увеличивать содержание БТШ70 в клетках глиобласты человека Т-98 и вызывать развитие в них устойчивости к действию цитотоксических факторов. Сходным протективным действием и способностью индуцировать синтез и накопление БТШ70 в клетках Т-98 обладает алкалоид аптамин, известный своей нейропротекторной активностью.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЛАНТАТОВ СПИННОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ ЭМБРИОНА ЦЫПЛЕНКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ. © Л. В. Ефремова,¹ С. И. Шрам,¹ Н. И. Чалисова.² ¹ Институт молекулярной генетики РАН, Москва, 1e2003@list.ru, и ² Институт физиологии РАН, Санкт-Петербург.

Органотипичные культуры нервных тканей позволяют сохранить вне организма характерную цитоархитектонику, функциональные межклеточные взаимодействия и исключить нервные, гормональные и другие влияния. Для исследования нейротрофических факторов часто используют модель дифференцировки спинномозговых ганглиев (СМГ). Важную роль в культивировании клеток играет биоспецифическая адгезия, так как субстрат роста является определяющим для получения дифференцированной культуры. Целью данной работы был подбор оптимальных условий для культивирования органотипичной культуры клеток СМГ эмбрионов цыпленка. Проводили сравнительный анализ роста культуры на различных субстратах (полиорнитин-ламинин, желатин, поли-L-лизин, полиэтиленгликоль или коллаген) и в различных средах (Ham's F-14, Ham's F-12, DMEM). Жизнеспособность культур оценивали по интенсивности формирования зоны роста, которая представляет собой растущие нейриты, мигрирующие и пролиферирующие глиальные клетки. Было показано, что наибольшую жизнеспособность культура сохраняла при выращивании в среде Ham's F-14, при использовании в качестве субстрата полиорнитин-ламинина, желатина или коллагена. На других протестированных в работе субстратах и средах СМГ не формировали зону роста. Кроме того, исследовали влияние различных ростовых факторов на мор-

фофункциональные характеристики. В результате работы были подобраны условия культивирования СМГ эмбрионов цыпленка, позволяющие использовать данную культуру для исследования биологических свойств веществ, обладающих нейротропным действием.

ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОЙ ОБРАБОТКИ РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ НА ИНДУКЦИЮ ПЫЛЬЦЕВОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ГИБРИДОВ ЯРОВОГО ТРИТИКАЛЕ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ IN VITRO. © О. И. Зайцева. ГРУ Институт генетики и цитологии НАН Республики Беларусь, Минск, E.Antonenko@igc.bas-net.by.

Получение дигамплоидных линий злаков является одним из способов ускорения селекционного процесса, так как позволяет сократить минимум вдвое сроки получения новых сортов. Для злаковых культур оптимальным способом реализации данного подхода является применение культуры пыльников или микроспор *in vitro*. Для повышения эффективности индукции пыльцевого эмбриогенеза используются различные способы стрессового воздействия на растения *in situ* и *in vitro*. Одной из наиболее эффективных и часто используемых для злаков является обработка колосьев донорных растений низкими положительными температурами (от 3 до 5 °С) в течение 2—28 сут. Данная обработка повышает выход новообразований и зеленых растений-регенерантов. Важным является вопрос о продолжительности холодной обработки. Так, для пшеницы наиболее эффективно воздействие пониженных температур в течение 7 сут. При культивировании пыльников ржи и тритикале чаще всего используется обработка в течение 21—28 сут. В связи с этим целью нашей работы было исследование влияния длительности холодной предобработки на эффективность индукции андрогенеза у гибридов ярового тритикале. Материалом для исследований служили 3 гибрида тритикале × трикале (пшеница) и 1 беккроссный гибрид ярового тритикале. Культивирование пыльников проводили согласно общепринятой методике. При проведении исследования использовали два режима холодной предобработки — в течение 7 и 21 сут. Результаты исследований показали, что существуют различия по способности растений изученных генотипов формировать эмбриогенные структуры в зависимости от типа предобработки. В случае применения холодной предобработки в течение 21 сут выход эмбрионов был достоверно выше у 3 из исследованных гибридов (при $P < 0.01$). Только гибрид Лана × Ульяна не показал достоверных различий по частоте индукции эмбриогенеза в зависимости от продолжительности холодной обработки. Наибольшим выходом эмбрионов в расчете на 100 пыльников характеризовался гибрид Узор × Матейко (42.1) при предобработке в течение 21 сут, наименьшим — гибрид Kargo × Ростань (5.0) при холодной обработке в течение 7 сут. При анализе генотипов по признаку «выход растений-регенерантов» практически не было выявлено достоверных различий между гибридами и типами предобработки. Вместе с тем показано положительное влияние холодной обработки в течение 21 сут на выход зеленых растений регенерантов, так как только при данном условии гибриды проявляли способность к генерации зеленых растений. Таким образом, использование холодной предобработки колосьев ярового тритикале перед

введением в культуру пыльников в течение 21 сут может повысить эффективность индукции пыльцевого эмбриогенеза и таким образом способствовать расширению применения данного биотехнологического метода в селекции ярового тритикале. В то же время должны учитываться генотипические особенности используемых форм.

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ МУЛЬТИКЛЕТОЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ХЛОРИНА Е6. © Д. С. Зайцева-Зотова, А. М. Цой, Е. А. Марквичева.¹ ¹ Институт биоорганической химии РАН, Москва. dariaz.z@gmail.com.

Поиск эффективных методов лечения рака ведется в различных направлениях, одним из которых является фотодинамическая терапия (ФДТ). Основным преимуществом ФДТ перед большинством способов, используемых в онкологии, является необходимость одновременного сочетания химиотерапевтических и физических методов воздействия, а именно сочетания фотосенсибилизатора (ФС) с низкоэнергетическим лазерным облучением, в то время как отдельно взятые ФС и облучение практически не оказывают должного влияния. В данной работе в качестве модельного ФС был выбран хлорин е6 (Porphyrin Products; Logan, UT, США). Оценку эффектов фотодинамического воздействия проводили на микрокапсулированных опухолевых сфероидов на основе клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7). Спектр моделей экспериментальной онкологии включает в себя спонтанные, перевиваемые и индуцированные опухоли животных, культуры опухолей человека и животных, опухоли человека, перевитые животным, и молекулярно-генетические модели. В связи с жесточением требований при использовании моделей на животных особое значение приобретают модели на основе клеточных культур, в том числе и мультиклеточные опухолевые сфероиды. Показано, что такие сфероиды могут имитировать малые солидные опухоли и потому могут быть использованы в качестве моделей *in vitro* для изучения механизмов действия противораковой терапии. Тем не менее формирование сфероидов — достаточно сложная задача. В частности, известно, что некоторые клетки не образуют сфероидов при культивировании в суспензии. Микрокапсулирование открывает новые возможности для генерирования мультиклеточных сфероидов. В работе сфероиды были сформированы методом микрокапсулирования внутри биосовместимых полиэлектролитных микрокапсул среднего диаметра 600 ± 50 мкм. Цитотоксичность и фоточитотоксичность хлорина е6 были изучены на полученных сфероидов, а также на клетках MCF-7, растущих в монослое. Облучение проводили на диодном лазере (Coherent, France) при длине волны 650 нм и разных интенсивностях света от 0.5 до 7.0 Дж/см². Жизнеспособность клеток определяли в аликвоте сфероидов МТТ-тестом. Концентрация хлорина е6, при которой жизнеспособность клеток была более 80 %, составила 1.7 и 8.4 мкМ для клеточного монослоя и микрокапсулированных сфероидов соответственно. Именно эти концентрации были выбраны для исследования фоточитотоксичности ФС. Через 24 ч после облучения снижение жизнеспособности наблюдали в обоих случаях. Однако микрокапсулированные сфероиды были значительно более устойчивы даже при концен-

трации хлорина е6, в 5 раз превышающей концентрацию ФС, подобранную для монослойной культуры. Так, при интенсивности света 10 Дж/см² доля жизнеспособных клеток в сфероидов более чем в 3 раза превышала количество живых клеток в монослойной культуре. Далее был проведен гистологический анализ полученных образцов сфероидов как до, так и после фотодинамического воздействия. Таким образом, с использованием метода микрокапсулирования раковых клеток открывается возможность создания в будущем новой модели *in vitro* для исследования эффектов фотодинамического воздействия на малых солидных опухолях и для скрининга новых форм цитостатических лекарственных средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерации европейских биохимических обществ (FEBS).

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК ЭКТОДЕРМЫ РАННЕЙ ГАСТРУЛЫ *XENOPUS LAEVIS*. © В. Н. Земчихина, Е. В. Гусева. Институт биологии гена РАН, Москва.

Шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* считается наиболее удобной моделью для изучения таких явлений, как эмбриональная индукция, клеточная подвижность и дифференцировка. Во-первых, зародыши амфибий удобны для микрохирургических операций, в том числе для опытов с пересадкой тканей. Во-вторых, из зародышей можно легко изолировать и культивировать в солевых растворах эксплантаты компетентной ткани, в том числе для экспериментов по рекомбинации тканей и в качестве тест-систем на предполагаемые индукторы. В-третьих, в изолированных эктодермальных эксплантатах можно изучать действие генов, для чего в бластомеры зародышей амфибий на ранних стадиях дробления инъецируют синтетическую мРНК или ДНК под различными промоторами. Наши исследования индукционной активности белков тканей глаз методически опираются на постулат: клетки эктодермы ранней гастролы *X. laevis* являются полипотентными. С одной стороны, это много раз доказано ранними работами по эмбриональной индукции; с другой стороны, необходим более глубокий и современный взгляд на явление полипотентности клеток эктодермы ранней гастролы в культуре. Действительно, в клетках эктодермы ранней гастролы *X. laevis* уже на стадии поздней эпителиальной бластулы экспрессируются гены нейральной дифференцировки, т. е. клетки ЭРГ уже преддетерминированы к развитию в нервную ткань. Однако после выделения участка анимальной шапочки из целого эмбриона в культуру все процессы нейрогенеза останавливаются. Возможно, это является результатом отсутствия минимальной массы запущенных в нейрогенез клеток; как мы знаем, их должно быть не менее 100 либо работа генов, экспрессирующихся на столь ранней стадии эмбриогенеза, должна поддерживаться специфическими факторами извне. Целью данной работы является иммуногистохимическая характеристика клеток эктодермы ранней гастролы как полипотентных клеток. В исследовании использовали антитела к белкам SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Oct-4, nestin и vimentin.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МИКРО-РНК С ПОМОЩЬЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ РЕПОРТЕРНЫХ КОН-

СТРУКЦИЙ. © Д. В. Исламгулов,^{1,2} А. П. Григоренко,² Е. И. Розачев.² ¹ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН и ² Нейропсихиатрический исследовательский институт, Массачусетский медицинский университет, США.

Микро-РНК — новый класс малых некодирующих молекул РНК, негативно регулирующих экспрессию генов у различных организмов. Микро-РНК, разрушая мРНК-мишени или подавляя их трансляцию, играет важную роль в различных биологических процессах. Для изучения влияния микро-РНК в клетке на ее гены-мишени используются векторы, экспрессирующие экзогенную микро-РНК. С целью подтверждения эффективности конструкций, экспрессирующих микро-РНК, использованы GFP-векторы, содержащие в 3'-области идеальный сайт связывания микро-РНК и идеальный сайт связывания с введенной мутацией, нарушающей взаимодействие РНК—РНК. Котрансфекцию с RFP использовали для визуализации трансфицированных клеток. На первичных крысиных кортикальных нейронах показано отсутствие GFP-положительных клеток при котрансфекции конструкции, экспрессирующей микро-РНК, с GFP-вектором с идеальным сайтом связывания данной микро-РНК. При котрансфекции GFP-конструкции с мутантным сайтом связывания микро-РНК на фоне увеличения экспрессии микро-РНК наблюдались GFP-положительные клетки. Полученный результат свидетельствует об эффективности использования микро-РНК-чувствительных репортерных конструкций для обнаружения изменения уровня экспрессии микро-РНК и ее тканеспецифичной локализации.

МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ ФОСФОЛИПАЗЫ D БЕЛКИ RALA И ARF6: ВЛИЯНИЕ НА РАЗЛИЧНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК. © А. В. Книжник, В. А. Рыбко, Я. А. Каинов, А. В. Комельков, Е. М. Чевкина. НИИ канцерогенеза, ГУ Российский научный онкологический центр РАМН, Москва.

В работе исследовали характеристики трансформированных фибробластов, ассоциированные с экспрессией экзогенных последовательностей малых ГТФаз Ral и Arf6, *in vitro* и *in vivo* на экспериментальных животных. В настоящее время предполагается, что белки RalA и Arf6 совместно модулируют активность фосфолипазы D (PLD), которая в свою очередь участвует в метаболизме фосфолипидов и синтезе вторичных мессенджеров, влияя на состав мембран, реорганизацию актинового цитоскелета и подвижность, а также опосредованно активирует некоторые транскрипционные факторы. В данной работе использовали линию HET-SR (эмбриональные фибробласты сирийского хомячка, трансформированные вирусом саркомы Рауса) и ее производные, полученные при помощи инфекции с использованием ретровирусного вектора pLXSN. Линия HET-SRRalAV23 стабильно экспрессировала конститутивно активную форму RalA (белок постоянно связан с ГТФ), HET-SRArf6Q67L и HET-SRArf6T27N экспрессировали конститутивно активную и доминантно-негативную (белок постоянно связан с ГДФ) формы Arf6 соответственно. Сравнительный анализ ферментативной активности PLD в лизатах исследуемых линий показал значительное ее повышение в

линиях HET-SRArf6Q67L и HET-SRRalA6AV23 по сравнению как с контрольной линией HET-SRpLXSN, так и с HET-SRArf6T27N. Таким образом, было показано, что экспрессия активированных форм RalA и Arf6 приводит к стимуляции активности PLD. Следующим этапом было исследование ряда клеточных характеристик полученных культур, потенциально ассоциированных с повышением активности PLD. Анализ скорости пролиферации показал, что клеточная культура HET-SRRalA6AV23 характеризуется повышенной скоростью пролиферации по сравнению с остальными исследованными клеточными линиями. При изучении подвижности клеток в культуре методом «зараствания раны *in vitro*» было обнаружено, что экспрессия экзогенного RalA приводит к усилению миграционной активности клеток в отличие от Arf6, экспрессия которого не влияет на данную характеристику. Исследование способности к колониеобразованию показало, что ни RalA, ни Arf6 не влияют на число колоний. При этом в отличие от Arf6 экспрессия экзогенного RalA приводит к увеличению размера колоний, что может быть следствием увеличения скорости роста. Сравнение туморогенности *in vivo* при подкожном введении клеток сингенным животным выявило различия между исследуемыми культурами: данная характеристика не изменилась у линии HET-SRRalA6AV23 по сравнению с контрольной, в то время как туморогенность линии HET-SRArf6Q67L повысилась (минимальная прививочная доза снизилась, размеры опухолей увеличились). Таким образом, мы показали, что экспрессия активных форм как RalA, так и Arf6 приводит к активации PLD. При этом изменение важнейших клеточных характеристик, таких как скорость пролиферации, подвижность, колониеобразование и туморогенность *in vivo*, не связано непосредственно с активацией PLD, а является результатом модуляции других RalA- либо Arf6-зависимых сигнальных каскадов.

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ А-549 ПОД ВЛИЯНИЕМ ИНТЕРФЕРОНА *IN VITRO*. © О. А. Ковалева, Н. С. Степаненко, Н. А. Безденежных, Ю. И. Кудрявец. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины, Киев.

Противоопухолевая активность интерферона (ИФН) реализуется, как известно, как на уровне организма через активацию ряда компонентов иммунной системы и подавление ангиогенеза, так и на уровне опухолевой клетки путем прямого влияния цитокина на экспрессию множества клеточных генов. Интерферон, обладающий антиканцерогенным и антимутагенным действием, может ингибировать опухолевую прогрессию, препятствуя возникновению генетических и фенотипических отклонений и подавляя тем самым клональную диверсификацию опухоли. Известно, что сходный механизм лежит в основе цитогенетической ремиссии при терапии ИФН хронического миелолейкоза. Целью работы была оценка возможности влияния интерферона на морфофункциональные и цитогенетические свойства, а также клеточный состав опухолевой популяции немелкоклеточного рака легкого человека. Исследования проводили на модели клеточной линии аденокарциномы легкого человека

(А-549) и ее сублинии, адаптированной к высоким концентрациям интерферона (А-549ИФН, 10^4 МЕ/мл, 360 сут). В работе использовали методы культивирования и клонирования клеточных культур, морфологические и цитогенетические методики. В процессе длительной экспозиции с ИФН клетки приобретали более выраженную эпителиоидную морфологию, время удвоения в культуре и количество покоящихся клеток увеличивались, снижалась плотность роста, усложнялась ультраструктурная организация клеток. Клетки А-549ИФН практически утратили способность к колониеобразованию в среде с полужидким агаром, а также способность к росту в среде с недостатком ростовых факторов (в частности, в бессывороточной среде). Под влиянием ИФН произошли также резкие изменения в реакции клеток на проапоптотические воздействия, в том числе на гипертермию. Так, при незначительном повышении температуры (до 42°C) жизнеспособность модифицированных клеток резко падает, при этом контрольные клетки остаются без изменений, а при повышении температуры до 45°C наблюдается полная гибель модифицированных ИФН клеток в отличие от контрольных, жизнеспособность которых падает незначительно. Клетки А-549ИФН отличаются от клеток исходной культуры и по цитогенетическим характеристикам. Так, для контрольных клеток А-549 модальный класс составляет 54—59 хромосом, наибольшее число клеток (28 %) содержит 56 хромосом. Модальный класс модифицированных цитокином клеток — 58—62 хромосомы, наибольшее число клеток с 62 хромосомами (19 %). При цитогенетическом анализе в 60 % метафаз клеток исходной популяции А-549 были обнаружены большие субметацентрические перестроенные хромосомы. Среди них наблюдали $\text{der}(6)t(6;1)$, $\text{der}(11)t(8;11)$, $\text{der}(2)t(2;1)$, причем перестроенная хромосома $\text{der}(6)t(6;1)$ встречается с относительно низкой частотой (6—25 %). Линия А-549ИФН отличается от исходной увеличением (до 80 %) количества клеток с хромосомной перестройкой $\text{der}(6)t(6;1)$ и значительным снижением числа клеток с перестройкой $\text{der}(2)t(2;1)$. Кроме того, у клеток линии А-549ИФН наблюдаются снижение частоты клеточных делений и возрастание количества клеток с микроядрами ($P < 0.05$ для обеих характеристик), что может быть следствием большого количества ДНК-разрывов. Таким образом, клеточная популяция линии А-549ИФН вследствие длительной экспозиции с ИФН приобретает стойкие биологические и цитогенетические особенности, которые существенно отличают ее от клеточной популяции исходной линии. Появление этих особенностей свидетельствует о том, что ИФН способствует глубоким изменениям структуры популяции клеток таким образом, что преобладающий опухолевый клон утрачивает свои преимущества и доминирующим становится другой, менее злокачественный, клон.

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ VIII В СТАБИЛЬНОЙ ЛИНИИ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК-ПРОДУЦЕНТОВ. © С. В. Ковнир, И. И. Воробьев. Гематологический научный центр РАМН, Москва, kovnir.serge@mail.com.

Фактор свертываемости крови VIII (фVIII) имеет большое медицинское значение, поскольку его дефицит

или отсутствие в кровотоке является основной причиной гемофилии. В работе была проведена конститутивная трансфекция эукариотических клеток линии DG44 (производной от линии СНО-К1), лишенных дигидрофолатредуктазной активности ($dhfr^-$), экспрессионным плазмидным вектором, кодирующим последовательность фVIII под контролем конститутивного эукариотического промотора CMV и последовательность фактора устойчивости трансфицированных клеток к воздействию метотрексата — дигидрофолатредуктазы (DHFR). В результате отбора под действием метотрексата, в условиях, обеспечивающих амплифицирование трансфектных признаков, были получены стабильный клон-производитель рекомбинантного фVIII и методика культивирования созданной клеточной линии, приводящей к наиболее высокому уровню биосинтеза рекомбинантного фVIII. Масштабированная система биосинтеза рекомбинантного фVIII свертываемости крови в культивируемой линии животных клеток использована для наработки препаративных количеств и концентрирования кондиционированной культуральной среды. Из полученного концентрата произведены выделение и очистка рекомбинантного фVIII свертываемости крови. Анализ опытных образцов рекомбинантного фVIII произведен методами масс-спектрометрии и иммунохимии. Получена коллекция рабочих мастер-клонов клеточных линий производителей рекомбинантного фVIII.

Работа выполнена в рамках исполнения госзаказа № 15019.7705587227.07.1.002.7.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ИЗ ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННЫХ БЛАСТОЦИСТ. © А. М. Кольцова, Т. А. Крылова, Г. Г. Полянская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) являются уникальными клеточными популяциями, обладающими такими свойствами, как неограниченная пролиферация и плюрипотентность (способность клеток дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и в линии половых клеток). Благодаря этим свойствам получение и характеристики постоянных линий человека являются одним из приоритетных направлений современной клеточной биологии. Клеточные линии ЭСК перспективно использовать для фундаментальных исследований в разных областях клеточной и молекулярной биологии. Эти клетки также перспективны для использования их в прикладных исследованиях, к которым, в частности, относится медицинская трансплантология, лекарственное и тератогенное тестирование. Каждая из получаемых линий ЭСК является уникальной, имеющей свои свойства, определяемые ее геномом. В то же время любая постоянная линия ЭСК должна отвечать определенному набору характеристик, маркеров, доказывающих ее способность к неограниченной пролиферации и сохранению плюрипотентности. В настоящей работе представлены результаты по получению и характеристике двух постоянных клеточных линий ЭСК человека. Для получения ЭСК из предимплантационных бластоцист были использованы метод механического выделения внутренней клеточной массы и последующее ее культивирование на слое митотически инактивированных фидерных клеток. С целью

приближения к требованиям, предъявляемым к ЭСК человека в связи с биомедицинской клеточной трансплантологией, в качестве фидера при культивировании ЭСК были использованы разные фибробласты только человеческого происхождения (постнатальные фибробласты крайней плоти и мезенхимные клетки эмбриона). Культивируемые ЭСК прошли около 120 удвоений клеточной популяции, значительно преодолев лимит Хейфлика. Время удвоения клеточной популяции этих линий составляет 37.5 ± 4.2 и 28.0 ± 2.5 ч (ежедневное измерение площадей колоний проводили с помощью программы «WCIF imageJ»). С помощью предварительного кариологического анализа, гистохимического и иммунофлуоресцентного анализа полученные линии охарактеризованы по ряду свойств, подтверждающих статус постоянной линии ЭСК человека. Они сохраняют стабильную пролиферативную активность, имеют в кариотипе 46 хромосом. Эти линии характеризуются высоким уровнем активности щелочной фосфатазы и экспрессией транскрипционного фактора Oct-4, что подтверждает статус линий ЭСК разного видового происхождения, а наличие экспрессии поверхностных антигенов (SSEA-4, TRA-1-60 и TRA-1-81) подтверждает статус ЭСК именно человека. Результаты иммунофлуоресцентного анализа экспрессии антигенов, характеризующих производные эктодермы, энтодермы и мезодермы, подтвердили наличие плюрипотентности в этих линиях ЭСК.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПОВЕРХНОСТНО-СЕЛЕКТИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СПЕКАНИЯ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ МАТРИЧНЫХ СТРУКТУР НА ОСНОВЕ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ С ВКЛЮЧЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ. © А. Н. Коновалов,¹ И. И. Селезнева,¹ А. В. Попова,² Е. Н. Антонов.² ¹ Институт теоретической и экспериментальной биологии РАН, Пушкино, и ² Институт лазерных и информационных технологий РАН, Троицк.

Биодеградируемые полимеры широко используются для создания новых композиционных материалов, предназначенных для восстановления костной ткани, утраченной в результате травмы или болезни. Особый интерес вызывают трехмерные матричные структуры, пористая структура которых создает каркас для мигрирующих клеток. Высокопористые трехмерные матричные структуры, главным образом керамические и полимерные, являются базовым элементом современной инженерии костных и хрящевых тканей. Для получения материалов с высокой пористостью применяют разнообразные методы, в частности газовое вспенивание полимеров, введение в материал солей с их последующим растворением, и методы быстрого прототипирования. Данные методы имеют серьезные ограничения при введении в состав материала биологически активных компонентов, необходимых для решения задач в области реконструктивной хирургии. Для создания биологически активного материала, стимулирующего миграцию клеток и их дифференцировку в остеогенном направлении, применяют различные типы биомиметических покрытий, формирование которых в случае трехмерных матричных структур имеет ряд ограничений. Для включения биологически активных компонентов непосредственно в объем трехмерной матрицы широкие возможности открывает метод по-

верхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС). При использовании данного метода инициирование процесса плавления полимера осуществляется путем поглощения лазерного излучения добавленными в порошок полимера частицами сенсибилизатора и спекание может происходить при плавлении только поверхностных слоев частиц полимера без изменения состояния их внутренних областей. Для реализации метода ПСЛС в исходный полимерный порошок в качестве сенсибилизатора вводят частицы углерода, добавки которого нетоксичны и не оказывают отрицательного влияния на рост клеток соединительной и костной тканей (Popov et al. *Materials processing for properties and performance*. 2005, 4: 152—154). Схема ПСЛС позволяет существенно уменьшить температурные градиенты внутри материала и позволяет снять имеющиеся ограничения на применение лазерного спекания при формировании биоактивных полимерных матриц для тканевой инженерии. В данной работе метод ПСЛС был применен для создания на основе полимолочной кислоты (PLA) трехмерных матричных структур, предназначенных для замены и регенерации костных и хрящевых тканей. Целью исследования было определение возможности применения метода ПСЛС для создания композитных материалов на основе PLA с включением гидроксиапатита, желатина и хитозана как факторов, повышающих биологическую активность, и исследование взаимодействия полученных материалов с культурой мезенхимных стволовых клеток человека. Для проведения исследований была использована первичная культура клеток, выделенных из эмбриона человека на сроке 6 нед. Культура клеток на 11-м пассаже была использована для тестирования материалов. Оценку жизнеспособности, адгезионной и пролиферативной активности клеток проводили на микроскопе ЛЮАМ-И2 с использованием метода окрашивания клеток 0.0002%-ным раствором акридинового оранжевого. На основании выполненных исследований была проведена оптимизация состава неорганических и органических компонентов минерал-полимерных композитов и параметров лазерного воздействия и показано, что метод ПСЛС может применяться для создания на основе PLA трехмерных матричных структур, обладающих повышенной биологической активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-02-00789).

ВЛИЯНИЕ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ НА НЕЙРОНАЛЬНУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ ЛИНИИ R1. © Н. А. Константинова,¹ Е. С. Мануилова,¹ Е. Л. Арсеньева,¹ И. А. Гривенников,¹ Л. Б. Буравкова.¹ ¹ ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, nataly_kon@mail.ru, и ² Институт молекулярной генетики РАН, Москва.

Влиянию измененной силы тяжести на дифференцированные и низкодифференцированные клетки, такие как фибробласты, эндотелиальные, лимфоциты, мезенхимные стволовые клетки, клетки-предшественники остеобластов и др., посвящено большое количество работ. Известно, что под действием реальной или моделируемой микрогравитации снижается пролиферация клеток,

в них реорганизуется активный цитоскелет, увеличивается уровень стрессового цитокина ИЛ-6 и изменяются уровни экспрессии некоторых генов (Cogoli et al., 1993; Таирбеков, 2000; Романов и др., 2001; Buravkova et al., 2004; Faser, 2005). В настоящее время работы, в которых показано подобное влияние на эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), отсутствуют. Ранее нами было показано, что 3-суточное клиностамирование не оказывает влияния на пролиферацию ЭСК, однако клиностамированное эмбрионидных тел (ЭТ) приводило к замедлению спонтанной дифференцировки клеток в кардиомиоциты (Константинова и др., 2006). В настоящей работе мы изучали влияние клиностамирования на спонтанную дифференцировку в нейрональном направлении. Для этого ЭСК на начальной стадии дифференцировки подвергали клиностамированию в течение 48 ч с последующим пересевом образовавшихся ЭТ на 4-луночные планшеты. Для выявления нейрональных клеток использовали специфические антитела к MAP2 и β_3 -тубулину. Окраску проводили на 13-е и 18-е сут культивирования ЭСК, что соответствует наиболее оптимальным срокам обнаружения данных антигенов в дифференцированных клетках. Было показано, что клиностамирование ЭТ существенно увеличивало количество β_3 -тубулин-положительных клеток, однако снижало число MAP2-положительных клеток в ходе дальнейшей спонтанной дифференцировки. По-видимому, обнаружение в культурах после клиностамирования большего числа клеток, окрашенных на β_3 -тубулин, по сравнению с MAP2-положительными клетками (как на 13-е, так и на 18-е сут) может быть связано с тем, что дифференцировка существенной части ЭСК останавливалась на стадии нейробластов, а терминальной стадии дифференцировки достигали значительно меньшие их числа. Предполагается, что клиностамирование создает условия для определенной задержке дифференцировки ЭСК в нейрональном направлении применительно к поздним стадиям этого процесса.

ВЛИЯНИЕ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО ТИПА НА РЕДОКС-СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА.
© С. В. Корень,¹ З. Б. Квачева,¹ Т. А. Кулагова,² Г. Н. Семенкова,² Л. А. Хватова.¹ ¹ ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии МЗ Республики Беларусь, korensv@tut.by, kvachzb@tut.by, и ² Белорусский государственный университет, Минск.

В функционирующих клетках протекает большое количество окислительно-восстановительных реакций, при этом поддерживаются определенный набор и соотношения окислителей и восстановителей, или так называемое редокс-состояние клетки. Изменение величины данного параметра может происходить при стимуляции функциональной активности клеток, отражая при этом их редокс-свойства, т. е. способность образовывать или утилизировать редокс-молекулы, к которым относят и активные формы кислорода (АФК). Редокс-системы клеток являются чувствительной мишенью при действии вирусов, и изменение редокс-свойств может отражать специфический ответ клеток на патоген на ранних этапах инфекции. Целью работы явилось изучение влияния вируса простого герпеса первого типа (ВПГ-1) на ранней стадии инфекции (4 ч) на генерацию АФК мезенхимными стволовыми клетками (МСК) костного мозга. Исследования

проводили на монослойных культурах МСК костного мозга мыши 1—2-го пассажа, выращенных в питательной среде ДМЕМ с 20 % сыворотки эмбрионов коров и с добавленным фактором роста фибробластов. После достижения монослоя культуры инфицировали ВПГ-1 в разведении 10^{-2} (титр $5.5 \lg$ ТЦД). Контролем служили неинфицированные клетки и питательная среда ДМЕМ. Образование АФК регистрировали методом хемилюминесценции (ХЛ). В качестве усилителей ХЛ использовали люминол и люцигенин. Для поиска систем генерации АФК в МСК использовали стимуляторы функциональной активности клеток, применяемые для исследования кислородоактивирующих свойств иммунных клеток, такие как липополисахарид клеточных стенок бактерий (ЛПС), форболовый эфир миристатацетата (ФМА) — активатор протеинкиназы С, фермента, участвующего в активации сигнальных путей в клетках. Однако генерация АФК при действии этих препаратов на МСК не выявлялась. При инфицировании культур МСК ВПГ-1 повышалась интенсивность люцигенинопосредованной ХЛ, но не люминолопосредованной. Для индуцирования окислительно-восстановительных процессов к МСК добавляли менадион — редокс-активный хинон, индуктор образования супероксидных анион-радикалов. Отмечено, что при добавлении к МСК менадиона регистрируется люцигенинопосредованная ХЛ, что свидетельствует о продукции АФК, в частности супероксидных анион-радикалов. При внесении менадиона к клеткам в течение 2 ч после инфицирования ВПГ-1 интенсивность менадионзависимой люцигенинопосредованной ХЛ также повышается, что свидетельствует об активации редокс-процессов в МСК. Далее, после развития инфекционного процесса в течение 2 ч, интенсивность ХЛ снижается. Полученные данные позволяют заключить, что при инфицировании МСК вирусом простого герпеса первого типа происходит модификация редокс-свойств этих клеток, что характеризуется повышением уровня образования свободно-радикальных продуктов.

АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ ТРОГОЦИТОЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУС-РЕАКТИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ. © Д. А. Кореньков, Г. Д. Петухова, Т. В. Чиркова. Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург.

Трогоценитоз — процесс переноса компонентов плазматической мембраны между клетками, вступившими в контактное взаимодействие. Данный феномен наиболее ясно охарактеризован для клеток иммунной системы. В частности, для Т-лимфоцитов определено, что процесс троггоценитоза возникает при образовании синаптического комплекса, формирование которого зависит от когнатного взаимодействия через ТКР и ряда коstimуляционных взаимодействий с клеткой-мишенью. Показано, что показатели троггоценитоза имеют прямую зависимость с уровнями МНС-пептид тетрамер-позитивными популяциями, а также с показателями активационных тестов к заданным антигенам клеток-мишеней. Целью нашей работы являлась оценка возможности применения теста выявления троггоценитоза для обнаружения Т-клеток иммунологической памяти участвующих в ответе в гриппозной инфекции. В модельной инфекции и иммунизации вирусом гриппа А/PR/8/34 на мышях было показано увеличение доли троггоценитоз-реактивных популяций лимфо-

цитов, уровни которых коррелировали с показателями теста на антиген-специфическую пролиферацию и ЦТЛ-теста.

Работа выполнена при финансовой поддержке Биодием Лтд, Мельбурн, Австралия.

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ. © М. В. Коротецкая, Е. В. Мостовенко, Д. С. Изюмов. НИИ физико-химической биологии Московского государственного университета.

Дыхательная цепь митохондрий является основным источником активных форм кислорода (АФК), повышенная продукция которых может привести к развитию окислительного стресса и программированной гибели клеток (апоптозу). В наших исследованиях было показано, что добавление в среду инкубации пероксида водорода (H_2O_2) индуцирует продолжительный окислительный стресс, хотя добавленный H_2O_2 разлагается в культуральной среде в течение 0.5—1.0 ч. Предполагалось, что добавленный H_2O_2 вызывает образование эндогенных АФК в митохондриях, что и приводит к развитию окислительного стресса. Для проверки этой гипотезы в данной работе были использованы митохондриально-направленные антиоксиданты (МНА) MitoQ и SkQ1, представляющий собой конъюгат убихинона или пластинхинона (соответственно), соединенного с остатком трифенилфосфония с помощью деканового линкера. В качестве объекта были выбраны подкожные фибробласты человека и клетки карциномы человека линии HeLa. Было обнаружено, что SkQ1 эффективно подавляет продукцию АФК и гибель клеток, индуцированную H_2O_2 . При длительных преинкубациях (6—7 сут) эффект достигался в чрезвычайно низких концентрациях (0.02—2.00 нМ). В случае MitoQ защитное действие проявлялось при более высоких концентрациях. Другие антиоксиданты, такие как тролокс и N-ацетилцистеин, проявляли свое защитное действие в концентрациях, превышающих указанные в 10^5 — 10^7 раз. Эти данные подтвердили справедливость гипотезы о митохондриальной природе АФК, возникающих после обработки клеток H_2O_2 . С помощью флуоресцентного аналога SkQ1, в котором катионный остаток был заменен на родамин-19 (SkQR1), было показано, что его накопление в клетках происходит в течение 1—2 ч и локализован он исключительно в митохондриях. SkQ1 (2—20 нМ) при кратковременной преинкубации (2—3 ч) защищал клетки от окислительного стресса (окисления эндогенного глутатиона) и связанного с этим дробления митохондрий, но не влиял на гибель клеток. В более высоких концентрациях (0.1—1.0 мкМ) как SkQ1, так и MitoQ стимулировали окислительный стресс и гибель клеток в присутствии субтоксических концентраций H_2O_2 . В случае фибробластов инкубация с SkQ 1 (0.2—2.0 нМ) в течение 1 сут защищала клетки от гибели. При отмывке SkQ1 защитный эффект сохранялся еще в течение 1 сут и падал лишь через 2 сут. В клетках HeLa инкубация с SkQ1 в течение 1—2 сут не вызывала защитного эффекта. Можно предположить, что за 2—3 ч SkQ1 накапливается в основной части популяции митохондрий, имеющих высокий мембранный потенциал и нитевидную форму, а в небольшой фракции мелких митохондрий с низким потенциалом накопления не проис-

ходит. При индукции окислительного стресса малая фракция митохондрий остается незащищенной и запускает программу апоптоза. Инкубация фибробластов с SkQ1 (0.2—2.0 нМ) в течение 1 сут вызывает слияние митохондрий в единую сеть, что должно вести к равномерному распределению МНА и проявлению его защитного действия. В случае клеток HeLa слияние митохондрий, возможно, происходит медленнее, чем в фибробластах, и соответственно медленнее развивается защитный эффект. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что выход SkQR1 из фибробластов происходил значительно медленнее, чем из клеток HeLa. В обоих типах клеток при увеличении времени предварительной инкубации с SkQR1 скорость его выхода снижалась и совпадала со скоростью исчезновения защитного эффекта. Таким образом, можно предполагать, что изменение динамической структуры митохондриальной сети определяет медленное развитие защитного эффекта МНА.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ КЛЕТОК ИГЛОКОЖИХ. © И. В. Кудрявцев,¹ А. Н. Сухачев,^{1,2} А. В. Полевщиков.¹ ¹ ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, и ² Биолого-почвенный факультет С.-Петербургского государственного университета.

Попытки разделения циркулирующих клеток иглокожих на отдельные фракции предпринимались и ранее, однако основным объектом подобного рода исследований являлись морские ежи. Для фракционирования клеток применялись градиенты плотности сахарозы (Edds, 1993), смеси фикола и тризола (Messer, Wardlaw, 1979) или перколла (Smith et al., 1992), а полученные фракции клеток использовались для молекулярно-биологических и биохимических работ. Функциональных исследований полученных фракций не проводилось, что объясняется небольшим объемом целомической жидкости с клетками, которые можно получить от отдельных особей морских ежей. Использованием морских звезд в качестве объектов исследования, в целомической жидкости которой концентрация клеток составляет от 3 до 8 млн/мл, а объем получаемого материала в среднем составляет 20 мл и более, позволило решить эти проблемы и провести исследование функциональных особенностей полученных фракций. Результатом центрифугирования целомцитов морской звезды *Asterias rubens* в градиенте плотности диатризоата натрия стало получение трех фракций целомцитов. Первая фракция целомцитов формировалась на интерфейсе целомическая жидкость—10%-ный раствор диатризоата натрия, вторая была обнаружена на границе градиентов 10.0 и 12.5 %, а третья — на границе 12.5—15.0 % диатризоата натрия. Морфологический анализ проводили при помощи методов световой микроскопии. Показано, что основным типом клеток первой фракции (до 95 %) были амeboциты с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, во второй фракции преобладали амeboциты с небольшими гранулами (73—80 %), равномерно распределенными по цитоплазме, а в третьей — крупные амeboциты с высоким содержанием крупных гранул и вакуолей (75—85 %). Полученные образцы фракций анализировали на проточном цитометре COULTER EPICS ALTRA (Beckman Coulter, Inc., США). Для исследования клеточ-

ных фракций использовали цитометрические параметры FS (прямое светорассеивание), PMT1 (боковое светорассеивание), PMT2 (ФИТЦ, 520 нм) и PMT3 (иодистый пропидий, 575 нм), которые оценивали по 30 000 событиям для каждой из проб. Число поврежденных клеток (содержащих иодистый пропидий) в первой фракции не превышает 10 %, а во второй и третьей — 5—7 %. Исследование фагоцитарной активности выявило, что наиболее активными фагоцитами являлись амебоциты второй клеточной фракции (до 50 % клеток включают меченых бактерий), тогда как в остальных фракциях ФИТЦ-меченные бактерии обнаруживались не более чем в 35—38 % клеток. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что клетками всех фракций грамотрицательные бактерии (*E. coli*) и поглощались достоверно интенсивнее, чем грамположительные (*St. aureus*). Для первой фракции эти значения составили 37.01 ± 0.01 и 28.41 ± 0.79 % ($P < 0.01$), для второй — 47.91 ± 1.42 и 39.71 ± 1.78 % ($P < 0.01$), а для третьей фракции — 36.08 ± 2.82 и 23.43 ± 3.17 % ($P < 0.001$) соответственно. Спонтанное накопление нейтрального красного в лизосомах и цитоплазме целомоцитов достоверно возрастало от первой фракции к третьей, аналогичная тенденция сохранялась при внесении в лунки планшета стимулятора. При этом достоверные различия были зарегистрированы только между первой и третьей фракциями ($P < 0.01$). Исследование гемолитической активности показало, что способностью к лизису эритроцитов человека обладают все полученные фракции клеток, но данная активность была более выражена у третьей фракции, обогащенной гранулярными клетками, что указывает на преимущественную локализацию гемолитических факторов в крупных окооядерных гранулах целомоцитов. Итак, различия между фракциями составляют не более 15—25 % по результатам нескольких функциональных тестов. Полученные данные позволяют предполагать наличие у морских звезд одного типа полифункциональных циркулирующих клеток, которые, по-видимому, находятся на разных стадиях дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00083 и 08-04-00111).

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР. © К. В. Кулешов. ВНИИ экспериментальной ветеринарии РАСХН, Москва.

Видовая идентификация является одной из основных процедур сертификации и паспортизации культур клеток. Тот факт, что в последнее время участились случаи выявления межвидовой контаминации и подмены культур клеток, заставляет разрабатывать наиболее эффективные методы определения видовой принадлежности клеток в культуре (Drexler et al., 2003; Buehring et al., 2004). Наиболее распространенным критерием видовой соответствия в коллекциях клеточных культур России является кариологический анализ. Но высокая кариотипическая изменчивость, которая отражается в изменении модального класса, появление деревиатов и маркерных хромосом усложняют оценку кариотипа. Также стоит заметить, что анализ кариологических препаратов требует длительного времени и высокой профессиональной под-

готовки исследователя. Цель нашего исследования — применить молекулярно-генетические методы для видовой идентификации культур клеток, депонированных в специализированной Коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных; адаптировать ранее предложенные методики, основанные на ПЦР с применением видоспецифических праймеров (Cooper et al., 2007) и секвенировании участка митохондриальной ДНК цитохром *c*-оксидазы субъединицы I; апробировать данные методы для идентификации клеточных линий Коллекции. Объектами исследования послужили 35 клеточных линий, полученных от 15 видов млекопитающих и рыб, депонированных в Специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных. В опытах исследовали по 3 закладки каждой клеточной культуры. В качестве скринингового метода для видовой идентификации культур клеток нами использована ПЦР с применением видоспецифических праймеров к участкам митохондриального гена цитохром *c*-оксидазы субъединицы I. Данный подход был апробирован нами в моноплексном и мультиплексном форматах. Оценен аналитический предел чувствительности метода, который в моноплексной реакции составил от 0.05 до 0.10 пкг ДНК на реакцию, в мультиплексном же формате (три пары праймеров в одной реакции) чувствительность снизилась до 0.5—1.0 пкг ДНК на реакцию. ПЦР со смесью ДНК из 12 видов животных и определенными видоспецифическими праймерами показала высокую специфичность реакции, которая составила порядка 0.0010—0.0001 % анализируемой ДНК в смеси. Для секвенирования участка мтДНК использовали праймеры, фланкирующие 650-нуклеотидную последовательность гена цитохром *c*-оксидазы (Ivanova et al., 2007). Для сравнения с референтными последовательностями использовали программу BOLD (Ratnasingham, Herbert, 2007). Полученные результаты указывают на то, что описанные выше подходы пригодны для видовой идентификации культур клеток. Адаптированный мультиплексный формат ПЦР позволяет определить 12 видов в 4 реакциях, что существенно снижает время и количество реагентов. Результаты секвенирования фрагмента мтДНК с использованием комбинаций праймеров VR_t1, VF1_t1, VR1d_t1 и VF1d_t1 полностью совпадают с апробированной нами мультиплексной видоспецифической ПЦР; также данный метод дает возможность с высокой степенью точности определить видовую принадлежность клеток, полученных от экзотических видов млекопитающих и рыб, а также клеточных линий.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ПОДОБНЫХ ЭПИДЕРМАЛЬНЫМ СТЕЛОВЫМ КЛЕТКАМ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ТКАНИ КОЖИ ПОСЛЕ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ. © Е. Кулешева, С. З. Шарифуллина, Н. И. Чурикова, С. В. Коржинова, А. С. Тепляшин. ООО Институт стволовой клетки, Москва, ego-ekaterina@yandex.ru.

Целью наших исследований было получение и сравнительный анализ популяций эпидермальных стволовых клеток (ЭпСК), выделенных из нативной кожи человека и из ткани кожи после замораживания и хранения при -70 °С, а также оценка способности полученных популяций к сохранению свойств при длительном культивиро-

вании. Материал для работы получали с информированного согласия пациентов после операций по абдоминопластике или контурного лифтинга лица с применением эндотрахеального наркоза от 3 пациентов. Часть нативного материала была заморожена при -70°C и хранилась в течение 3 мес; из другой части выделение проводилось сразу после операции. Клетки эпидермального слоя кожи выделяли с применением раствора диспазы (0.4 %) и коллагеназы типа IV (0.075 %). Культивирование проводили в стандартной среде для кератиноцитов с использованием различных подложек: фибронектин, коллаген типа IV, желатин, митотически заблокированные мультипонентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) дермального слоя кожи. Морфологический анализ проводили визуально с помощью фазово-контрастной микроскопии; для иммуноцитохимического анализа использовали антитела к следующим антигенам: CD49f, бета-1-интегрин, цитокератин 19 и Ki-67. Визуализацию окраски антителами проводили с помощью DAB-хромогена. Известно, что ЭпСК характеризуются асимметричным делением и низким пролиферативным потенциалом. Кроме того, эти клетки характеризуются способностью образовывать в культуре несколько типов колоний. Клетки, выделенные нами из ткани, подверженной глубокому замораживанию, имели сходную с ЭпСК морфологию и сохраняли свои свойства при длительном культивировании. Количество выделенных клеток соотносилось с количеством ЭпСК, полученных из нативной кожи, и составило $1 \cdot 10^6$ клеток на 1 см^2 ткани. Иммуноцитохимический анализ полученных клеток выявил положительную окраску антителами к антигенам CD49f, бета-1-интегрину, цитокератину 19 и Ki-67, что соответствует иммунофенотипу ЭпСК. При культивировании на митотически заблокированных ММСК и коллагене IV выделенные клетки формировали характерные для ЭпСК три типа колоний. Использование в качестве подложки коллагена IV типа способствует дифференцировке выделенных клеток в кератиноциты уже на 4-й нед культивирования. Подложка из фибронектина и желатина не способствует сохранению клеток в недифференцированном состоянии. Согласно полученным данным, клетки, выделенные из замороженной ткани, имеют морфологию и свойства, подобные ЭпСК. Использование в качестве подложки митотически заблокированных ММСК поддерживает ЭпСК в недифференцированном состоянии в течение длительного культивирования и способствует образованию базальной мембраны. Таким образом, ткань кожи взрослого человека может служить источником ЭпСК и после длительного хранения при -70°C .

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ РОСТА И НАКОПЛЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ, СТИМУЛИРОВАННЫХ ФАКТОРОМ РОСТА КЕРАТИНОЦИТОВ. М. В. Левченя,¹ З. Б. Квачева,¹ И. Е. Гурманчук,² Ю. А. Кабанова,² О. В. Петракова,² Е. Н. Романюк.¹ ¹ ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ Республики Беларусь и ² Белорусский государственный медицинский университет, Минск.

В настоящее время для закрытия раневых поверхностей все шире используются клеточные технологии. Для заживления глубоких ожогов собственных ресурсов стволовых и малодифференцированных эпидермальных клеток организма бывает недостаточно. Поэтому выде-

ление и стимулирование к делению стволовых клеток и клеток-предшественников кератиноцитов (транзисторных клеток) кожи в условиях культуры — необходимое условие накопления клеточной биомассы. Целью исследований явилось изучение пролиферативной активности и фенотипического состава культур эпидермиса кожи ожоговых больных в возрасте 9—72 года с использованием в качестве стимулятора их роста фактора роста кератиноцитов (KGF). Эпидермис отделяли от базальной мембраны с помощью 0.5%-ного раствора диспазы, затем диссоциировали протеолитическими ферментами на отдельные клетки (коллагеназа 0.1 % и трипсин 0.25 %). После их осаждения центрифугированием доводили концентрацию клеток до $500 \cdot 10^3$ в 1 мл питательной среды ДМЕМ с добавлением 10 % сыворотки эмбрионов коров и KGF (20 нг/мл) в среду роста. Суспензия клеток была рассеяна в пластиковые флаконы. В результате проведенных исследований установлено, что используемый фактор роста стимулирует пролиферацию клеток как при их росте в суспензии, так и при адгезии на субстрате в виде колоний. Через 10—12 сут роста клеток в культуре осуществляли их пересев. Индекс пролиферации клеток составил к 10-м сут 2.8. При наблюдении за культурами в течение 3 пересевов их пролиферативная активность сохранялась на том же уровне. Проведен фенотипический состав культивируемых клеток с использованием моноклональных антител к маркерам клеточных поверхностных белков — интегринов (CD49F, FITC). Жизнеспособность, а также иммунофенотип культивированных клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии и прямым методом флуоресцирующих антител. Известно, что с помощью интегринов клетки взаимодействуют с белками внеклеточного матрикса базальной мембраны. Нами была выявлена различная степень экспрессии данного маркера клетками, находящимися в суспензии и адгезированными на поверхности флакона, что свидетельствует о наличии в культуре пролиферирующих клеток-предшественников кератиноцитов и, возможно, стволовых клеток кожи. При удалении из среды фактора роста кератиноцитов наблюдались адгезия клеток к поверхности флакона и их дифференцировка. Полученные результаты внесут вклад в изучение биологии развития клеток кожи в культуре, а также лягут в основу метода накопления пула пролиферирующих клеток-предшественников для трансплантации их больным.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ И ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК НА НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ IN VITRO ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ, ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГЕРМИНАТИВНЫХ И ТЕРАТОКАРИНОМНЫХ КЛЕТОК. © Н. В. Лифанцева, О. Ф. Гордеева. Институт биологии развития РАН, Москва, olgagordecva@yandex.ru.

Плюрипотентные клеточные линии эмбриональных стволовых, эмбриональных герминативных клеток (ЭСК и ЭГК) и клеток тератокарциномы представляют собой уникальные клеточные модели для изучения закономерностей раннего развития млекопитающих. Основной задачей нашей работы являлось изучение механизмов детерминации плюрипотентных клеток в линии половых клеток в данных экспериментальных системах, имеющих различное происхождение. В качестве объектов ис-

следования были использованы мышинные линии ЭСК (ESR1), ЭГК (EGC10), а также клетки тератокарциномы (ECF9). На начальных этапах дифференцировки *in vitro* плюрипотентных и тератокарциномных клеток происходило формирование эмбрионидных тел, являющихся аналогами эмбрионов предгастрюляционных стадий развития, на которых впервые появляются предшественники первичных половых клеток. В недифференцированных ЭСК, ЭГК, клетках тератокарциномы, а также в эмбрионидных телах, формируемых этими клетками, была исследована экспрессия генов, которые специфически экспрессируются в первичных половых клетках (*Oct-4*, *Nanog*, *Stella*, *Dazl*, *Vasa*, *Fragilis* и *C-kit*), протоонкогенов *E-ras*, *Her/Neu*, *Bmi* и гена-супрессора опухолевого роста *Pten*. Результаты исследования показали, что в изученных клеточных системах экспрессируются все гены, специфические для плюрипотентных и первичных половых клеток, а также онкогены *Her/Neu*, *Bmi* и *Pten*, причем профили экспрессии сохраняются без изменений на всех стадиях дифференцировки. Было установлено, что уровень экспрессии гена *E-ras* постепенно снижался в процессе дифференцировки ЭСК и ЭГК, однако сохранялся стабильный уровень его экспрессии в клетках тератокарциномы. Сравнительный анализ экспрессии изучаемых генов в клетках предгастрюляционных эмбрионов (E7.5), эмбриональных семенников (E14.5) и гонад взрослых животных продемонстрировал значительное сходство их транскрипционных профилей и выявленных в ЭСК, ЭГК и тератокарциномных клетках. Вместе с тем экспрессия гена *E-ras* не была выявлена в клетках эпибласта (E7.5) и половых клетках. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в процессе дифференцировки плюрипотентных клеток в линию половых клеток *in vitro* и *in vivo* происходит снижение экспрессии гена *E-ras*, в то время как в клетках тератокарциномы экспрессия этого гена не изменяется.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01307).

ОСОБЕННОСТИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В КЛЕТКАХ ЛИНИЙ A2780 И MCF-7, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПРЕПАРАТАМ. © Н. Ю. Лукьянова, Д. А. Микитенко, Н. В. Русецкая, В. Ф. Чехун. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины, Киев.

Известно, что терапевтические неудачи в лечении злокачественных заболеваний обусловлены резистентностью опухолевых клеток к цитостатическим препаратам. Выявление механизмов формирования лекарственной резистентности является возможным при детальном, всестороннем изучении биологических особенностей чувствительных клеток и их резистентных аналогов, что позволит не только прогнозировать чувствительность к химиопрепаратам, но и разработать подходы к повышению чувствительности злокачественных клеток. Поэтому целью нашей работы было изучение молекулярных особенностей чувствительных и резистентных к действию противоопухолевых препаратов клеток линий A2780 и MCF-7. Объектом исследования служили клетки рака яичника человека линии A2780 и рака молочной

железы человека линии MCF-7, исходные и с индуцированной *in vitro* резистентностью к противоопухолевым препаратам. В работе использованы следующие методы: культивирование клеток *in vitro*, МТТ-колориметрия, иммуноцитохимия и полимеразная цепная реакция. В нашем исследовании клетки линии MCF-7, резистентные к цисплатину и доксорубину, характеризовались гипометилированием промоторов генов *mdr1* и *GSTp*, что сопровождалось повышением уровня экспрессии Р-gp в клетках, резистентных к доксорубину, а в клетках, резистентных к цисплатину, — глутатион-S-трансферазы. Повышение ее экспрессии сопровождалось снижением экспрессии металлотioneинов. Клетки, устойчивые к цисплатину и доксорубину, характеризовались гиперметилированием генов *p53*, *p73* и *bcl-2*. Изменения в статусе метилирования не влияли на уровень экспрессии белка p53 в клетках обеих линий, резистентных к цитостатикам. При этом гиперметилирование *bcl-2* сопровождалось незначительным снижением экспрессии *bcl-2* в клетках MCF-7/Dox и более выраженным в клетках MCF-7/DDP. В клетках линии A2780 отмечалось увеличение количества *bcl-2*-положительных клеток при формировании резистентности к действию цисплатина. Развитие устойчивости клеток MCF-7 к действию противоопухолевых препаратов сопровождалось гиперметилированием промотора гена *CDH1*, что обуславливало снижение экспрессии E-кадгерина. Для клеток A2780 характерным было снижение уровня метилирования гена *CDH1* и повышение его экспрессии. Таким образом, важной составляющей механизма формирования фенотипа лекарственной резистентности являются нарушения метилирования промоторов генов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью. Они сопровождаются изменением экспрессии белков, характеризующих активность защитных антиапоптотических, детоксикационных и АТФ-зависимых транспортных систем клетки.

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКА S100A11 И НЕМЫШЕЧНОЙ ФОРМЫ КОФИЛИНА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ И ЗРЕЛОЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА. © А. А. Макаров,¹ Л. И. Ковалев,¹ М. А. Ковалева,¹ И. Ю. Торопыгин,² С. С. Шишкин.¹ ¹ Институт биохимии РАН, amkrv@mail.ru, и ² НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва.

Кальцийсвязывающий белок S100A11 участвует в реализации подавляющего пролиферацию действия трансформирующего фактора роста-бета (ТФРБ) (Miya-zaki et al., 2004). Нарушения данного сигнального пути могут приводить к снижению чувствительности клеток к подавляющим пролиферацию сигналам и как следствие приводить к излишней пролиферации (Sonogawa et al., 2007). В связи с этим представляет интерес сравнение уровня данного белка в нормальных и опухолевых мышечных культивируемых клетках человека и в скелетно-мышечной ткани. Скелетно-мышечные миобласты человека культивировали в среде F-12, содержащей пирuvat натрия, гентамицин и 12.5 % эмбриональной телячьей сыворотки. Дифференцировку миобластов индуцировали культивированием в среде, содержащей 2 % лошадиной сыворотки, в течение 2—8 сут со сменой среды каждые 2 сут. Клетки рабдомиосаркомы человека линий RD и A-204 культивировали в среде DMEM. Белки, выделенные из культивируемых клеток и скелетно-мышеч-

ной ткани, фракционировали методом двухмерного электрофореза в полиакриламидном геле по О'Фарреллу. Детекцию белков проводили с помощью красителя Кумасси R-250 и азотнокислого серебра, что позволяло выявлять до нескольких сотен белковых фракций на одной электрофореграмме. Идентификацию белков проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием пакета программ Mascot и базы данных NCBI Protein. Было обнаружено, что белок S100A11 присутствует в пролиферирующих миобластах, причем его количество увеличивается по мере роста клеток в культуре. Дифференцировка миобластов сопровождается выраженным уменьшением количества данного белка. В пролиферирующих клетках рабдомиосаркомы и в ткани скелетных мышц белок S100A11 указанным методом выявить не удалось. Немышечная форма кофилина присутствовала как в нормальных, так и в опухолевых пролиферирующих мышечных клетках, но не в дифференцированных миобластах и скелетно-мышечной ткани. Эти наблюдения могут позволить предположить, что клетки рабдомиосаркомы являются частично дифференцированными, поскольку на фоне активной пролиферации и наличия немышечной формы кофилина (характерной для пролиферирующих мышечных клеток) отмечается отсутствие характерного для пролиферирующих клеток белка S100A11. Интересно, что миостатин — ростовый фактор семейства ТФРБ — активно секретируется клетками рабдомиосаркомы. Данный ростовой фактор способен подавлять пролиферацию клеток рабдомиосаркомы. Однако в отсутствие миостатина (при подавлении его экспрессии в клетках или добавлении в культуральную среду соответствующих антител) клетки рабдомиосаркомы способны выходить из клеточного цикла и вступать в терминальную дифференцировку (Ricaud et al., 2003). Возможная роль сигнального пути, опосредованного белком S100A11, в регуляции пролиферации мышечных клеток требует дальнейшего изучения.

ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ШАПЕРОНА БТШ70 КАК КАНДИДАТЫ НА РОЛЬ ПРОНИКАЮЩИХ ПЕПТИДОВ. © *Е. С. Мартынова*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, elemartynova@gmail.com.

К настоящему времени создание безопасных транспортных средств для доставки биологически активных веществ в клетки стало одной из актуальнейших проблем в онкологии и терапии сердечно-сосудистых заболеваний. В этом плане одними из удачных средств являются проникающие пептиды, так как они нетоксичны, не приводят к повреждению плазматических мембран, не вызывают иммунного ответа и воспаления. В настоящее время проникающие пептиды используются в процессах регуляции клеточного цикла и передачи сигналов в клетку, поэтому они в будущем могут быть важным инструментом в фармацевтических исследованиях и в клинике. В нашей лаборатории были получены данные о том, что пептидные фрагменты белка-шаперона БТШ70, которые получили название KRN- и KST-пептид, успешно пересекают мембраны клеток и осуществляют направленный транспорт в цитоплазму клеток нековалентно связанных с ними молекул белков. Такие данные позволяют нам рассматривать эти пептиды в качестве кандидатов на роль проникающих пептидов. В дальнейшем предполагается изучение биологической активности доставляемых таким образом в клетки человека молекул белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия предприятиям малых форм в научно-технической сфере (программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса (У. М. Н. И. К.)» и «Новые технологии в биологии и медицине», проект 7967).

КУЛЬТУРА КЛЕТОК PC12 КАК ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ. © *К. В. Мартынова, Л. В. Ефремова, С. И. Шрам, Н. Ф. Мясоедов*. Институт молекулярной генетики РАН, Москва, satera1@rambler.ru.

Клеточная линия феохромоцитомы крысы PC12 нашла широкое применение в качестве модели *in vitro* для изучения повреждений нейронов при ряде патологий мозга. При помощи культуры PC12 могут исследоваться факторы, определяющие устойчивость нейронов к действию повреждающих стимулов и проводиться поиск потенциальных нейропротекторов. Целью данной работы было исследовать влияние ряда новых пептидов на выживаемость клеток PC12 в условиях окислительного стресса, вызывающего некротические повреждения. С помощью культуры PC12 моделировали процессы, характерные для ишемического инсульта: снижение уровня ростовых факторов и окислительный стресс в центре ишемического поражения. Некротические повреждения вызывали кратковременной обработкой клеток высокими концентрациями перекиси водорода (1—2 мМ) в условиях депривации ростовых факторов. В этих условиях изучали цитопротективную активность фрагментов пептида семакса и глицин- и пролинсодержащих пептидов со структурами (GP)_n, (PG)_n и (PGP)_n ($n = 1—3$). Было показано, что пептиды (PG)_n-типа и PGP увеличивают выживаемость клеток PC12, а пептиды PGPG и PGPPGP снижают ее. В диапазоне концентраций 0.2—100.0 мкМ наибольшую активность проявляли пептиды GP и PGP. Среди основных метаболитов семакса наибольшую активность проявлял пептид PGP. Таким образом, культура клеток PC12 является удобным объектом для моделирования некротического повреждения нейронов при ишемии и может использоваться для оценки цитопротективной активности потенциальных нейропротекторов.

НОВЫЙ МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO ТКАНЕЙ ГЛАЗА ВЗРОСЛЫХ АМФИБИЙ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ. © *Ю. П. Новикова*. Институт биологии развития РАН, Москва.

Многие заболевания глаза позвоночных, в том числе человека, связаны с повреждением сетчатки и ее пигментного эпителия. Для изучения поведения клеток этих тканей в условиях повреждения, а также для поиска факторов, поддерживающих жизнеспособность, структуру тканей и межклеточные взаимодействия, нужны адекватные «*in vivo-like in vitro*» модели. Такого рода модели культивирования необходимы также для проведения поиска и характеристики клеточных источников регенерации сетчатки, а также факторов, способных стимулировать эти источники у низших и высших позвоночных животных. Нам удалось разработать способ 3D-роллерного культивирования отдельных тканей глаза, а также их комплексов, обеспечивающий не только длительное выживание клеток, но и индуцирующий ряд изменений, на-

правленных на восстановление и реконструкцию тканей. Благодаря постоянной ротации образцы тканей глаза взрослых животных находятся в обновляемой среде, не взаимодействуют с субстратом и образуют замкнутые структуры, внутри которых сохраняются организация и межклеточные взаимодействия. Это в свою очередь дает возможность наблюдения за изменениями клеточного поведения *ex vivo* на протяжении более 30 сут. К настоящему времени таким способом удалось культивировать нейральную сетчатку и комплекс «пигментный эпителий + сосудистая оболочка (хороид) + склеральная оболочка» половозрелых тритонов *Pl. walhi* и 2-месячных крыс-альбиносов Wistar. При органотипическом культивировании *in vitro* сетчатки тритона и крысы образовывали замкнутые шаровидные структуры (сфероиды), внутри которых наблюдалась высокая ДНК-синтезирующая и митотическая активность всех способных к этому клеток. В случае амфибий БДУ- и PCNA-позитивные клетки и митозы выявлялись как в ростовой зоне сетчатки (*ora serrata*), так и в ее ядерных слоях. Это приводило к образованию внутри сфероида большого пула недифференцированных клеток, способных к делениям, миграции и замещению погибших клеток, в том числе фоторецепторов. Сетчатка крыс демонстрировала активную миграцию клеток наружного ядерного слоя вовнутрь и митотическую активность глиальных клеток Мюллера и резидентных макрофагов, однако случаев дифференцировки и изменений фенотипа клеток в сетчатке крыс пока не зарегистрировано. Данный разработанный нами впервые подход оказался хорошим инструментом для активации клеток — возможных источников регенерации сетчатки у взрослых низших и высших позвоночных. Метод является также хорошей альтернативой экспериментам *in vivo* с применением разрушения сетчатки или введением цитокинов в качестве индукторов пролиферации. При культивировании комплекса «пигментный эпителий + хороид + склера» глаз тритонов пигментный эпителий не претерпевал существенных морфологических изменений, быстро закрывался наползающими клетками склеры, но в открытых участках проявлял способность экспрессировать нейральный белок (НФ-200). При культивировании без склеральной оболочки клетки пигментного эпителия активно включали предшественник ДНК бромдезоксигидин, однако при этом часть клеток превращалась в меланофаги, другая формировала структуру, напоминающую лентоид — аналог хрусталика *in vitro*. Клетки пигментного эпителия крыс, культивированного в составе задней стенки глаза, в редких случаях также входили в фазу М, вымещались из слоя и претерпевали фенотипические изменения — экспрессировали макрофагальный антиген. В отсутствие взаимодействия с сетчаткой, вымещаясь или сохраняясь в слое, они проявляли свойства чистильщиков — фагоцитов. Эти события, происходящие с клетками пигментного эпителия крысы в условиях роллерного культивирования *in vitro*, сходны с теми, что наблюдаются при различных патологиях сетчатки *in vivo* у животных и человека. В настоящее время разрабатываются подходы к направленному изменению поведения клеток сетчатки и пигментного эпителия глаза с помощью манипулирования со средой культивирования. Таким образом, полученные данные позволяют надеяться на успешное применение разработанного метода ротационного органотипического культивирования *in vitro* для решения вопросов, связанных как с развитием и лечением клеточ-

ной патологии, так и с индукцией регенерационных ответов клеток глаза взрослых позвоночных животных и человека.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ДВУХ ИЗОФОРМ ГЕНА *Ost-4 (POU5F1)* В КЛЕТКАХ ТЕРАТОКАРЦИНОМЫ РА-1. © Д. Перминов,¹ Э. Яценко.² ¹ Латвийский центр биомедицины и ² Латвийский институт биорганической химии, Рига.

Ввиду большого интереса к индуцированным эмбриональным стволовым клеткам актуален вопрос положительного контроля на маркеры этих клеток. Тераокарцинома РА-1, полученная нами из коллекции Института цитологии РАН, происходит из яичника и сохраняет экспрессию генов-маркеров полового пути. Одним из них является транскрипционный фактор *Ost-4 (POU5F1)*, который имеет две изоформы: А-форма поддерживает самообновление и тотипотентность, функция В-формы неизвестна. Локализация А-формы ядерная. Цитоплазматическая локализация В-формы предполагает отсутствие у нее функции транскрипционного фактора. Поэтому важна дискриминация между двумя изоформами, которая до сих пор не учитывалась. Целью настоящей работы было провести дифференциацию между двумя формами, используя РТ-PCR и непрямую иммунофлуоресценцию, на клетках РА-1. Были подобраны и апробированы на хромосомной ДНК праймеры на обе изоформы. С использованием этих праймеров выявлена и подтверждена секвенированием транскрипционная экспрессия обеих изоформ гена в и-РНК клеток РА-1 при отсутствии таковой в лимфоцитах периферической крови. Использование поликлональных антител АВ19857 (Abcam), не различающих изоформы *Ost-4*, позволило выявить иммунофлуоресценцией в клетках РА-1 как фокусную ядерную, так и диффузно-цитоплазматическую реакцию. Чрезвычайно ярко окрашена ядерная сеть в полиплоидных клетках и в небольшом проценте диплоидных клеток. Цитоплазматическая реакция усилена в стареющих клетках, содержащих аутофагические вакуоли. Проверяется экспрессия А-формы специфическим антителом. Таким образом, тераокарцинома РА-1 экспрессирует и транслирует обе формы *Ost-4*. Разработана молекулярная методика их дифференциации.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОИСКА МОДУЛЯТОРОВ ШАПЕРОННОЙ ФУНКЦИИ HSP70. © А. А. Пименова, Б. А. Маргулис, И. В. Гужова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, apimenova@yan-dex.ru.

Накопление в нейронах или вблизи их мембраны мутантных белков и их токсических агрегатов происходит в процессе практически всех нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона, хорею Гентингтона и др. Большинство известных лекарственных средств направлено на лечение последствий этих патологий, но не на предупреждение агрегации на начальной стадии. В то же время наиболее эффективными средствами борьбы с агрегацией мутантных белков являются шапероны, уровень которых можно повышать с помощью специальных препаратов. Идеальной системой для испытания активности таких препаратов являются культуры клеток. Целью данного исследования

было определить эффективность препаратов, выбранных на основе молекулярного скрининга и направленных на модуляцию активности шаперонного аппарата клетки. Поиск веществ, способных активировать накопление Hsp70 и других белков шаперонного аппарата, был проведен среди низкомолекулярных соединений, способных связывать молекулу шаперона и частично подавлять его активность; предполагается что такое действие может вызвать дополнительный синтез БТШ70 клеткой. С помощью виртуального скрининга библиотеки химических соединений, поставляемых компанией VitasM-Laboratory, было отобрано 18 веществ, которые далее были протестированы на способность вызывать накопление БТШ70 в клетках глиобластома человека T98G. Для этого нами был модифицирован метод клеточного ИФА, что позволило оценить уровень содержания белка в интактных клетках и клетках, подвергнутых воздействию. Последующая окраска клеток генциан-фиолетовым позволила провести анализ результатов в пересчете на общий белок, что делает возможным проведение скрининга большого количества веществ и получение при этом универсальных данных для сравнения. В ходе экспериментов были отобраны 3 вещества, повышающие количество Hsp70 в клетках, что также было подтверждено с помощью метода иммуноблоттинга. Способность этих веществ модулировать функцию шаперонного механизма была показана на клеточной модели *in vitro* и в тесте шаперонного ИФА. При предварительной инкубации клеток с одним из веществ была обнаружена протективная активность накопленного Hsp70 от имитирующего гипоксию действия хлорида кобальта в клеточной культуре. Таким образом, в работе были использованы две модифицированные клеточные тест-системы, что позволило выявить регуляторы функций клеточного шаперонного механизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по Федеральной целевой программе «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2012 годы» по теме «Шапероны в терапии нейродегенеративных заболеваний» (лот 3, шифр 2007-2-1.2-05-01).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СТВОЛОВЫХ И ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ. © *Е. Ю. Плотников,¹ Т. Г. Хряпенкова,¹ М. В. Марей,² Г. Т. Сухих,² Д. Б. Зоров.¹* ¹ НИИ физико-химической биологии Московского государственного университета и ² ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи, Москва, plotnikov@genebee.msu.ru.

Исследование фундаментальных механизмов клеточного взаимодействия является залогом успешной разработки методов клеточной терапии. Множество исследований, в том числе и клинических, демонстрирует эффективность различных типов стволовых и прогениторных клеток в восстановлении функций поврежденных органов и тканей. Однако, несмотря на значительный прогресс в исследованиях возможностей клеточной терапии, остается невыясненным ряд вопросов: какие типы стволовых и прогениторных клеток наиболее эффектив-

ны для терапии, каковы механизмы положительного влияния введения этих клеток, насколько пролонгированный эффект может иметь такая терапия? В частности, большой интерес представляет степень интеграции чужеродных стволовых клеток в ткань органа реципиента, а также механизмы влияния клеток друг на друга, определяющие дифференцировку донорских клеток или стимуляцию клеток поврежденной ткани. В данной работе нами была исследована возможность транспорта цитоплазмы и органелл между мезенхимными стволовыми клетками (МСК) и культивируемыми кардиомиоцитами и почечным эпителием крысы в условиях совместного культивирования, что является моделью клеточной терапии при сердечных и нефрологических патологиях. Обнаружено, что между МСК и кардиомиоцитами крысы происходит образование различных типов межклеточных контактов, с помощью которых клетки могут обмениваться внутриклеточным содержанием. При этом транспорт низкомолекулярного цитоплазматического содержимого не имеет специфичного направления. Процесс транспорта цитоплазматического содержимого может идти как через щелевые контакты, так и через туннельные нанотрубочки — ультратонкие межклеточные структуры, соединяющие соседние клетки. Кроме того, между клетками происходит обмен митохондриями. Возможность такого же обмена цитоплазматическим содержанием показана нами и при контакте МСК с клетками канальцевого эпителия почки, что говорит об универсальности данного механизма. Причем если в случае кардиомиоцитов транспорт между клетками выявляли с помощью флуоресцентных химических зондов, то в случае почечного эпителия использовали культуры, трансфицированные флуоресцентными белками, в том числе со специфичным митохондриальным адресом. Кроме того, было показано, что во время совместного культивирования МСК и кардиомиоцитов в стволовых клетках запускается синтез миозина. Возможно, именно образование межклеточных контактов и передача цитоплазматического материала направляют МСК по пути дифференцировки в миоциты. В случае контактирования МСК с клетками почки подобные исследования еще не проведены, однако показана интеграция трансплантированных стволовых клеток в интерстиций почки. При этом клетки оставались в паренхиме длительное время, сохраняя жизнеспособность. Обнаруженные явления транспорта внутриклеточных компарментов могут служить одним из путей, обеспечивающих терапевтический эффект при пересадке МСК в ткань миокарда или почки. В частности, МСК могут служить донорами цитоплазматических сигнальных молекул, стимулирующих регенерацию клеток органа и предотвращающих их программированную гибель в условиях ишемии или иных стрессорных воздействий. С другой стороны, возможным последствием транспорта цитоплазматического материала из клеток сердца (или почки) в МСК может быть направление дифференцировки МСК в соответствующие специализированные клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01667).

ПРИМЕНЕНИЕ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ АЛЛОФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ БАРАБАННОЙ ПЕРЕПОНКИ. © *Д. И. Пономарева,^{1,2}*

Н. Л. Стародубцева,^{1,2} В. П. Туманов,^{1,3} А. А. Поматилов.⁴ ¹ООО «Центр биологических методов лечения», Москва, ²Московский физико-технический институт, ³Российский государственный медицинский университет и ⁴Первая городская больница, Москва, darena_mipt@list.ru.

В данной работе было изучено действие культивированных аллофибробластов человека при терапии травм барабанной перепонки. Главной целью было выявление преимуществ терапии с использованием культивированных фибробластов по сравнению со стандартными методиками лечения повреждения барабанной перепонки. Исследовали больных различных возрастов с различной степенью тугоухости, возникшей в результате травмы барабанной перепонки при минно-взрывных действиях. Фибробласты кожи человека культивировали до 5—7-го пассажа на среде Игла с 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и 2 % глутамина в CO₂-инкубаторе. Затем культуру фибробластов наносили на синтетическую пленку, с обеих сторон покрытую коллагеном, которую затем накладывали на поврежденную барабанную перепонку. Используемый метод обеспечил стойкие динамические результаты по восстановлению барабанной перепонки до ее полного восстановления у всех исследованных больных в течение длительного времени, что позволяет сделать выводы о пригодности и высокой эффективности данного метода.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА СОСТОЯНИЕ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ПРИ ОЧАГОВЫХ ТРАВМАТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА. © И. В. Пыко,¹ А. С. Федулов,¹ З. Б. Квачева.² ¹Белорусский государственный медицинский университет и ²ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Минск.

Одним из путей совершенствования способов восстановления функций центральной нервной системы при очаговых травматических повреждениях головного мозга (ОТПГМ) может стать использование культур створых клеток человека как одной из технологий лечения. В работе изучали когнитивные функции в эксперименте по созданию модели ОТПГМ при трансплантации мезенхимных створых клеток (МСК) и оценивали возможность хоуминга и интеграции МСК в тканевых структурах реципиента. В исследовании использовали самцов белых рандомбредных мышей и самцов мышей линий C57BL и CBA массой 18 г. МСК выделяли, используя их высокую адгезивность, когда среду первый раз меняли спустя 1 сут после выделения, тем самым обеспечивая удаление неприкрепившихся клеток. Приготовленную клеточную суспензию в ростовой среде помещали в культуральные пластиковые флаконы, обработанные для оптимальной клеточной адгезии полиаминокислотами, коллагеном. В течение 5—14 сут культивирования в термостате при 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂ наблюдали рост клеток в виде колоний с последующим формированием монослоя клеток, характеризующихся гетерогенностью популяции: округлые, полигональные, фибробластоподобные клетки. На долю последних приходи-

лось 30—80 %. Содержание МСК в полученных культурах определяли проточной цитофлуориметрией с использованием маркеров Cd 34, 44, 45 и 90. МСК 3-го пассажа использовали для аллогенной трансплантации самцам белых рандомбредных мышей и самцам мышей линий C57BL и CBA (масса 18 г) с ОТПГМ. Трансплантацию МСК выполняли однократно под эфирным наркозом методом внутривенного введения или введения клеточной суспензии в очаг травматического повреждения на 2-е сут после создания модели ОТПГМ. Влияние аллогенной трансплантации МСК на когнитивные функции оценивали в условиях высадки животных в открытое поле. Хоуминг и интеграцию МСК, меченных люминесцентными маркерами, в составе тканевых структур реципиента изучали на гистологических препаратах головного мозга. Трансплантация МСК при ОТПГМ увеличивает ориентировочно-исследовательскую активность, снижает латентный период выхода в центр открытого поля, повышает относительную частоту прохода мышей в центр открытого поля. Не выявлено различий показателей, характеризующих когнитивные функции, при внутривенном введении МСК или введении клеточной суспензии в очаг травматического повреждения. На гистологических препаратах головного мозга животных, получавших МСК, меченные люминесцентными маркерами, выявлены признаки хоуминга трансплантированных клеток. Обсуждаются пути дальнейшего изучения возможностей применения трансплантации МСК в качестве метода регенеративной терапии при ОТПГМ.

ВЛИЯНИЕ СТРЕПТОКИНАЗЫ НА РАЗВИТИЕ СПИНОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ КРЫСЫ В КУЛЬТУРЕ. © А. А. Романовская, Е. Ф. Полукошко, В. Н. Никандров. Институт физиологии НАН Республики Беларусь, Минск, a_romanovskaya@mail.ru.

Белок стрептокиназа (СК) синтезируется β-гемолитическими стрептококками серологических групп А, С и G. Одним из свойств СК является способность активировать плазминоген по непротеиназному пути. В ряде исследований сообщается о наличии митогенного эффекта у плазминогена, а также у его протеиназных активаторов (uPA и tPA) в отношении клеток нервной ткани. Оказалось, что добавка СК в среду культивирования поддерживает пролиферацию клеток глиомы C6 и нейроblastомы IMR-32 на протяжении 3 сут наблюдения даже в условиях отсутствия эмбриональной телячьей сыворотки. Целью настоящей работы явилось исследование влияния СК на нетрансформированные клетки нервной ткани в органотипической культуре. Работа выполнена на 30 эксплантатах спинномозговых ганглиев новорожденных крыс. Непосредственно перед началом культивирования в опытные чашки добавляли 100 МЕ/мл СК. Морфометрический анализ изображений, полученных на 1-е и 4-е сут от начала культивирования, проводили в программе Image J. В ходе исследования установлено, что добавка СК в среду культивирования спинномозговых ганглиев способствует интенсивному развитию культуры. Площадь зоны роста была на 80 % больше, чем в контроле, на протяжении всего времени наблюдения. Параллельно регистрировали увеличение плотности зоны роста на 40 % по отношению к контролю. Полученные данные указывают на то, что СК обладает свойством усиливать рост нервной ткани *in vitro*, и позволяют отне-

сти данный белок к факторам, обладающим митогенной активностью.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЕВНОГО И РАБОЧЕГО БАНКОВ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ СНО-Еро-2. © И. Н. Савинова, В. В. Ильина, Л. В. Белова, Т. Б. Крохина. ООО «ФАРМАПАРК», Москва.

Культура клеток СНО Еро-2 была получена как продукт рекомбинантного эритропоэтина человека (РЭЧ) М. Г. Зелениным с соавторами в 1988 г. (Патент РФ № 2089611 С1 от 07.12.97) путем введения рекомбинантной плазмиды pSVdEpoLMo в геном клеток СНО tk. Эритропоэтин — один из гормонов почек, гликопротеин, физиологический стимулятор эритропоэза. Он активирует митоз и созревание эритроцитов из клеток-предшественников эритроцитарного ряда. В клинической практике препараты эритропоэтина используются для лечения анемий различной этиологии, для стимуляции эритропоэза в онкологической практике, особенно после проведения химио- и радиотерапии. РЭЧ получают из культуральной жидкости путем серии последовательных хроматографических очисток. Для промышленного производства лекарственных препаратов обычно используют только линии-продуценты со стабильной морфологией и скоростью роста, имеющие стабильный кариотип, онкогенно безопасные, не содержащие контаминантов и сохраняющие высокий уровень продуктивности на протяжении установленного уровня пассажей (РД 42-28-10-89). Для того чтобы работать с клетками, имеющими стабильные характеристики на протяжении всего цикла производства РЭЧ, были созданы и охарактеризованы Посевной и Рабочий банки линии клеток СНО-Еро-2. Запас клеток для Посевного банка создан 10.04.06 на 50-м пассаже в количестве 254 ампул с содержанием живых клеток не менее 4 млн, для Рабочего банка — 24.04.06 на 9-м пассаже в количестве 233 ампул с содержанием живых клеток также не менее 4 млн. Культура СНО-Еро-2 представляет собой клеточный монослой с очагами многослойного роста эпителио- и фибробластоподобных клеток с овальными ядрами, содержащими мелкие ядрышки. По мере увеличения плотности слоя клетки уменьшаются в размерах и приобретают сферическую форму. Штамм СНО Еро-2 культивируется на отечественных средах DMEM/F-12 (в соотношении 1 : 1) с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота при 37 °С, посевная доза составляет $2 \cdot 10^4$ — $8 \cdot 10^4$ клеток на 1 см². Кратность посева составляет 1 : 3—1 : 4 к 3—4-м сут после пассажа. Отделение клеток от подложки проводят раствором Версена и 0.25%-ным раствором трипсина. Штамм хранится при температуре –196 °С. Условия криоконсервации: среда DMEM/F-12 (в соотношении 1 : 1) с добавлением 20 % сыворотки крупного рогатого скота и 7 % диметилсульфоксида, концентрация клеток $2 \cdot 10^6$ — $4 \cdot 10^6$ в 1 мл. Жизнеспособность после восстановления составляет 75 ± 5 %. Кариотип исследовали на 10, 20 и 30-м пассажах. Модальное число хромосом — 32. Стабильность кариотипа, культуральных, морфологических и продуктивных свойств сохраняется до 30-го пассажа. Контаминация бактериями, грибами, дрожжами, микоплазмами и вирусами не обнаружено. Подтверждено отсутствие активности обратной транскриптазы в данном клеточном штамме и отсутствие его туморогенного эффекта на ли-

нии мышей СВА. На основании этих исследований Посевной и Рабочий банки СНО-Еро-2 были одобрены ФГУН ГИСК и разрешены к использованию в производстве РЭЧ.

ЭНУКЛЕАЦИЯ ООЦИТОВ СВИНЬИ, СОЗРЕВШИХ IN VITRO, ОПОСРЕДОВАННАЯ ДЕМЕКОЛЬЦИНОМ. © И. П. Савченкова. Всероссийский государственный научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии РАСХН, Москва, s-ip@mail.ru.

На сегодняшний день достоверно установлено, что при индукции к дифференцировке эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) способны *in vitro* формировать половые гаметы. Это открывает новые возможности в сохранении биоразнообразия нашей природы и ее генетических ресурсов. Перенос ядер соматических клеток взрослого организма одного животного в энуклеированный ооцит другого животного представляет собой перспективный методический прием для получения ЭСК редких и исчезающих видов животных. Одним из ключевых моментов в методологии переноса ядер является удаление хромосом (энуклеация) из ооцита на стадии метафазы второго мейотического деления (МII) (цитопласт). У многих видов животных (кролик, овца, свинья, коза, крупный рогатый скот и т. д.) в неоплодотворенных яйцеклетках визуализируются в микроскопе только полярные тельца, а хроматин ядер не виден. Энуклеацию ооцитов у таких видов животных выполняют отсасыванием или выдавливанием вместе с полярным тельцем большого количества ооплазмы, что сильно снижает качество цитопласта и эффективность реконструирования клеточных комплексов. Предпринимаются попытки разработать эффективный способ визуализации всего ядерного материала посредством химической обработки веществами, дестабилизирующими микротрубочки, среди которых известны нокодазол и демекольцин (колхамин). Целью наших исследований было изучить влияние краткосрочной химической обработки демекольцином на эффективность энуклеации созревших *in vitro* ооцитов свиньи. Ооциты аспирировали из средних фолликулов размером не менее 5—6 мк (яичники получали от убитых самок на мяскокомбинате) и инкубировали *in vitro* до стадии МII. Средой для созревания была M-199, дополненная 0.57 мМ цистеином, 10 % фолликулярной жидкости свиньи, антибиотиками и 0.5 мЕД хорионического гонадотропина лошади (eCG). Кумулюс-ооцитные комплексы (20—40) культивировали в 500 мкл среды в одной лунке 4-луночного планшета в течение 18—20 ч. Затем их отмывали от гормонов и культивировали дополнительно 20—22 ч в среде без гормонов при 39 °С в атмосфере с 5 % CO₂. Созревшие ооциты отбирали, удаляли кумулюсные клетки, переносили в среду, дополненную 0.4 мкг/мл демелькоцином и 0.05 М сукрозой, и инкубировали в течение 30 мин. Ооциты, у которых наблюдали выпячивание мембраны, переносили в среду, дополненную цитохалазином Б (5 мкг/мл), и инкубировали в течение 10—20 мин. Энуклеацию проводили методом выдавливания. Для этого делали разрез в прозрачной оболочке (со стороны расположения полярного тельца) посредством соприкосновения прозрачной оболочки с поверхностью присасывающей пипетки, при этом не допуская внедрения энуклеационной микропипетки в перивителлиновое пространство. Эту же микропипетку поднимали

и слегка придавливали ооцит, что позволяло наблюдать свободный выход в сделанный разрез ядерного материала. Оценку полного отсутствия метафазной пластинки у энуклеированных ооцитов проводили с помощью окраски цитопластов Хёхстом 33342 (конечная концентрация 5 мкг/мл). Результаты проведенных исследований показали, что незрелые ооциты свиньи способны достигать *in vitro* стадии МП в течение 38—44 ч в среде для созревания. Из 980 ооцитов 705 (72 %) достигли стадии МП. Когда созревшие ооциты с первым полярным тельцем были обработаны демекольцином, более чем 78 % из них имели выпячивание мембраны и миграцию хромосомной массы в перивителлиновое пространство. В результате было установлено, что энуклеация ооцитов с выдавливанием минимального количества цитоплазмы проще и эффективность энуклеации высока (245 из 273, 90 %) по сравнению с не обработанными демекольцином ооцитами (171 из 350, 49 %). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что краткосрочная обработка интактных ооцитов свиньи демекольцином позволяет четко выявлять расположение в них ядерного материала и тем самым способствовать полному его извлечению и повышению эффективности энуклеации.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И БЕЛКОВ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ BDNF И NGF В РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ НООПЕПТА. © С. В. Садовников,¹ М. Х. Салимгареева,¹ Р. С. Ямиданов,¹ Р. У. Островская.² ¹ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, juvv@anrb.ru, и ² ГУ НИИ фармакологии РАМН, Москва.

Ноопепт — препарат, созданный в результате оригинального подхода — дизайна коротких пептидов на основании имитации структуры непептидного нейротропного средства, в частности дизайна дипептидных ноотропов, имитирующих структуру пирацетама. Он обладает широким спектром когнитивных и нейропротективных эффектов и проявляет свой терапевтический эффект в условиях его введения на фоне развившейся патологии. Молекулярные механизмы действия ноопепта практически не исследованы. В связи с этим представляет большой интерес изучение регуляции экспрессии нейротрофинов в клетках мозга как основного фактора нейропротективного действия ноопепта. Методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени и иммуноблотинга нами изучены экспрессия мРНК и уровень белков-нейротрофинов BDNF (нейротрофический фактор, выделенный из мозга) и NGF (фактор роста нервов) в гиппокампе, гипоталамусе и префронтальной коре мозга крыс при хроническом введении ноопепта (21 сут, 10 мкг/кг, при моделировании когнитивной патологии введением токсина стрептозоцина в обонятельную луковицу головного мозга). Установлено, что в клетках гиппокампа при когнитивной патологии терапия ноопептом повышает уровень NGF почти в 2 раза по сравнению с контрольными животными, в то время как в группе ложнооперированных животных (без введения токсина) уровень NGF понижен и терапия ноопептом не приводит к повышению содержания нейротрофина. Экспрессия гена *NGF* в гиппокампе незначительно повышается (на 20 %) в группе крыс с когнитивной патологией и остается на уровне контрольных значений в группе ложнооперированных крыс. От-

сутствие изменений в уровне белка NGF наблюдается в коре мозга, в то же время экспрессия гена понижается незначительно при когнитивной патологии и на 50 % при ложной операции и терапии ноопептом. При исследовании влияния ноопепта на содержание мРНК BDNF в гиппокампе установлено, что в группе ложнооперированных крыс данный показатель увеличивается в 2 раза по сравнению с таковыми в группе крыс с когнитивной патологией. Таким образом, можно предположить, что одним из возможных механизмов проявления ноопептом нейропротекторных и ноотропных активностей является увеличение уровня экспрессии генов нейротрофинов в отдельных структурах мозга, в особенности в клетках гиппокампа — важнейшем отделе мозга, принимающем участие в процессах переработки информации и формирования памяти.

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА К ВОЗДЕЙСТВИЮ α -ИНТЕРФЕРОНА. © В. М. Семенова, Л. Д. Любич, Л. П. Стайно. ГУ Институт нейрохирургии АМН Украины, Киев.

Одним из перспективных путей повышения эффективности комплексного лечения опухолей головного мозга является разработка методик использования интерферонов, широко применяющихся в общей онкологии в связи с многосторонними механизмами противоопухолевого действия (прямой цитолитический эффект, подавление их миграции, угнетение ангиогенеза и экспрессии онкогенов, активация генов-супрессоров опухолевого роста, активация генов проапоптотического действия). Данные о применении интерферонотерапии в нейроонкологии малочисленны и неоднозначны. В суспензионных и тканевых культурах изучено действие лаферона — человеческого рекомбинантного α -2 β -интерферона (α -ИФН) на клетки 62 глиальных опухолей мозга (II, III и IV степеней злокачественности). Суспензионные культуры инкубировали 24 ч с α -ИФН («Биофарм», Киев) в возрастающих концентрациях (10^2 , 10^3 , 10^4 и 10^5 МЕ/мл). Цитотоксическую активность препарата оценивали в стандартном тесте с трипановым синим. Чувствительность глиомы к α -ИФН считали отрицательной при снижении доли живых клеток менее чем на 20 %, считали ее низкой при снижении таких клеток на 21—40 %, умеренной — при снижении на 41—60 % и высокой — при снижении более чем на 60 %. Для уточнения одного из возможных механизмов реализации цитотоксического эффекта α -ИФН определяли долю апоптотических клеток в пробах ($n = 6$) с использованием специфического ДНК-тропного красителя Hoechst 33342. Эффект влияния α -ИФН на морфологию опухолевых клеток прослежен в первичных культурах глиом в сравнении с контрольными. Проведенные исследования показали широкий спектр противоопухолевого действия α -ИФН на клетки глиом как в цитотоксическом тесте, так и в эксплантационных культурах. Согласно принятой градации ответа тестируемых опухолей обнаружено, что 70—75 % астроцитом II и III степеней злокачественности проявили высокую и умеренную чувствительность к воздействию α -ИФН в отличие от глиобластом (IV степень злокачественности), среди которых доля таких опухолей составила всего 27.3 %, а доля глиобластом с низкой чувствительностью к α -ИФН оказалась наибольшей

(36.3 %). Следует предположить, что процесс озлокачествления опухолевых клеток глиом сопровождается частичной утратой их рецепторов к α -ИФН и, следовательно, снижением их чувствительности к этому цитокину. В эксплантационных культурах глиом после инкубации с α -ИФН определяли элиминацию митотически делящихся клеток, появление признаков дистрофии, некробиоза и фигур апоптоза в части клеток, разрежение зоны роста культур в связи с десквамацией поврежденных клеток. Устойчивость к прямому воздействию даже высоких концентраций α -ИФН обнаруживают клетки с сохраненной цитотипической глиальной дифференцировкой. Однако пропорциональная дозозависимость цитотоксического эффекта наблюдалась не постоянно и не зависела от степени анаплазии исходной опухоли. Сравнительная оценка динамики нарастания апоптотических клеток и цитотоксического эффекта указывает на параллелизм между этими показателями. Предполагается, что α -ИФН может оказывать проапоптотический эффект на клетки глиом, достигающий 30 % нарастания доли апоптотических клеток при воздействии 10^4 — 10^5 МЕ/мл α -ИФН. Полученные результаты обосновывают целесообразность предварительного тестирования биоптатов глиом на их индивидуальную чувствительность к воздействию α -ИФН с целью последующей выработки рациональных схем антибластической терапии для каждого конкретного больного.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ КЛЕТОК СТРОМЫ КОСТНОГО МОЗГА И ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА ПРИ ИНЪЕКЦИИ В ОРГАНОТИПИЧЕСКИЕ КУЛЬТУРЫ СЕТЧАТКИ. © С. А. Сергеев,¹ Н. В. Кошелева,^{1,2} И. Н. Сабурова,² А. В. Ревущин,³ М. Л. Семенова.¹ ¹ Московский государственный университет, emb-yossa@gmail.com, ² НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН и ³ Институт биологии гена РАН, Москва.

В последние годы накоплен значительный теоретический материал в области биологии стволовых клеток и проведено большое число клинических работ. Однако все еще остаются открытыми вопросы о взаимодействии трансплантированных клеток с новым микроокружением реципиента и их выживаемости. Для решения этих вопросов представляются перспективными модели с использованием органотипического эксплантационного культивирования, сохраняющего цитоархитектонику ткани и взаимосвязь клеток друг с другом. В данной работе мы использовали прикрепленные органотипические культуры сетчатки новорожденных крыс Wistar, служившие моделью развивающейся нейросетчатки. Культивирование эксплантатов сетчатки проводили в стандартных условиях в модифицированной среде DMEM/F12 с добавлением ростовых факторов (FGF и EGF, 10 нг/мл), 7 % Fetal clone I (ПанЭко K049-1) и антибиотиков. На 10-е сут в культуры сетчаток инъецировали ксеногенные клетки стромы костного мозга мышей линии C57BL/6-Tg(CTB-EGFp)/Osb/J (МСК) или пигментного эпителия (ПЭ) глаза человека на 3—5-м пассажах, предварительно окрашенные липотрейсером DiI (Molecular Probes V-22889). Микроинъекцию клеток проводили стеклянным капилляром диаметром 30 мкм при помощи микроинъекционной приставки. Для иммуногистохимического анализа образцы фиксировали в 4%-ном пара-

формальдегиде и использовали антитела к FGFP (Sigma, G9269) и к β -III-тубулину (Chemicon, MAB1637). После введения небольшого количества МСК (20—40 клеток) в эксплантат сетчатки большинство меченых клеток в области трансплантации не обнаруживалось уже на 2-е сут культивирования, однако единичные клетки сохранялись на протяжении длительного времени (до 1.5 мес). После введения большого количества МСК (500—700 клеток) наблюдалась их миграция из зоны трансплантации в течение первых 2 сут после инъекции. МСК частично мигрировали, увеличивая зону распространения трансплантированных клеток, а частично оставались в месте инъекции. Начиная с 3-х сут культивирования в эксплантате сетчатки часть трансплантированных МСК меняла морфологию, образуя длинные разветвленные тонкие отростки. В контрольных образцах клеток МСК (культивирование в монослое на кондиционированной сетчаткой среде) подобных изменений морфологии не наблюдалось. Иммуногистохимический анализ на нейральные (β -III-тубулин) и глиальные (GFAP) маркеры показал их отсутствие в трансплантированных клетках даже после долгосрочного (до 1.5 мес) культивирования. Поведение после инъекции высокодифференцированных клеток ПЭ взрослого человека значительно отличалось от поведения стволовых клеток с широкими дифференцировочными способностями (МСК). Хотя после трансплантации также наблюдалась хорошая выживаемость клеток (негативное окрашивание иодидом пропидия), изменения морфологии клеток ПЭ отсутствовали даже после длительного (до 1.5 мес) культивирования в эксплантатах сетчаток. Также для клеток ПЭ в отличие от МСК была характерна небольшая миграционная способность, сравнимая с таковой самих клеток эксплантата. Вместе с краем разрастания клетки ПЭ выселялись за пределы эксплантата, в некоторых случаях распластывались по дну культуральной чашки. Колебание численности введенных клеток пигментного эпителия практически отсутствовало (в противоположность инъецированным МСК). Таким образом, была разработана адекватная модель поведения трансплантированных клеток различных типов в нейросетчатке, что дает возможность лучшего понимания миграционной и дифференцировочной способности инъецированных клеток в реципиентной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по программе «Развитие научного потенциала высшей школы (2006—2008 гг.)» (грант РНП.2.1.1.7842).

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ β -КАТЕНИНА НИЗКА В ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ И ПОВЫШАЕТСЯ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ. © Г. С. Синева, М. С. Лянгузова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, galsin2209@gmail.com.

Wnt-сигнальный путь, его центральный эффектор β -катенин и негативный регулятор GSK3 β участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки многих типов клеток. Мы изучили внутриклеточную локализацию и транскрипционную активность β -катенина в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) мыши линии IOUD3 методом иммунофлуоресценции и временной

трансфекции клеток люциферазной репортерной конструкцией TopFlash. Мы показали, что β -катенин не является в ядрах недифференцированных активно пролиферирующих ЭСК, что согласуется с его низкой транскрипционной активностью. После обработки специфическим ингибитором GSK3 β ВЮ β -катенин накапливается и выявляется в ядре, а его транскрипционная активность повышается. Наблюдаемые изменения сопровождаются снижением скорости роста клеточной популяции, что вызвано легким накоплением клеток в фазе G₁ без индукции апоптотической гибели. Кроме того, обработанные ВЮ клетки образуют более компактные колонии, что указывает на возможное влияние обработки на клеточные контакты. Ингибитор GSK3 β также не препятствует вызванной ретиноевой кислотой дифференцировке ЭСК мыши. При обработке дифференцирующихся клеток ВЮ дополнительно снижается степень экспрессии Oct-4, маркера недифференцированных ЭСК. Более того, ВЮ способен ослаблять экспрессию Oct-4 даже в отсутствие дифференцировочных стимулов и в присутствии LIF, а также изменять уровень мРНК некоторых маркеров дифференцировки (коллагена 4 и виментина). В дифференцировочных клетках β -катенин обнаруживается в ядре, соответственно повышается его транскрипционная активность. Таким образом, высокая транскрипционная активность β -катенина не нужна для пролиферации ЭСК мыши, однако, по-видимому, приобретает значение при дифференцировке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49058).

ЭКСПАНСИЯ И НАПРАВЛЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА IN VITRO КЛОНОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА. © Н. Г. Скоробогатова, Н. А. Горохова, А. Ю. Петренко. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, skorng@mail.ru.

Мезенхимные клоногенные клетки костного мозга (КМ) представляют собой уникальный резервный пул стволовых/прогениторных клеток взрослого организма. В условиях монослойного культивирования выделены одиночные колонии фибробластоподобных клеток КМ взрослых доноров. При последующем субкультивировании определены условия экспансии мезенхимных стволовых/прогениторных клеток, полученных от одиночной колонии. В экспериментальных условиях *in vitro* проведены индуцированные дифференцировки исследуемых клеток в остеогенном и адипогенном направлениях. Дифференцирующиеся клетки были выявлены по экспрессии щелочной фосфатазы и минерализации внеклеточного матрикса в случае остеогенеза, по внутриклеточному накоплению нейтральных жиров в случае адипогенеза. Применение смеси остеогенной и адипогенной индуктивных сред приводило к сдвигу дифференцировочных процессов в направлении остеогенной дифференцировки мезенхимных предшественников. После криоконсервирования субкультивированных мезенхимных стволовых/прогениторных клеток КМ человека под защитой диметилсульфоксида дифференцировочные потенциалы исследуемых клеток сохранялись.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта «Биорегуляторы стволовых клеток» (0104U006440).

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ НА РАЗВИТИЕ ПСОРИАТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА В КЛЕТКАХ КОЖИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ. © А. Г. Соболева,¹ С. А. Брускин,¹ Р. М. Авдеев.² ¹ Институт общей генетики РАН и ² Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии, Москва, anna-sobo@mail.ru.

Основной клинической симптоматикой псориаза являются гиперпролиферация кератиноцитов и нарушение процессов их дифференцировки, что приводит к формированию дефектного рогового слоя на фоне воспалительного характера изменений в коже. Транскрипционная система AP-1 обеспечивает ответ клеток на действие различных сигнальных молекул (цитокинов, пептидных гормонов, нейротрансмиттеров и др.). Активация AP-1 происходит в экстремальных для клеток условиях (например, при тепловом шоке и под действием УФ-облучения). AP-1 контролирует многие десятки генов, вовлеченных в процессы пролиферации, морфогенеза, апоптоза и дифференцировки. Белки AP-1 играют важную роль в терминальной дифференцировке эпидермальных кератиноцитов. Проведенный нами биоинформационный анализ сетевых взаимодействий генов позволил отобрать гены, кодирующие белки-компоненты транскрипционного фактора AP-1, как гены-кандидаты, влияющие на развитие патологического процесса при псориазе. Проведенное количественное измерение экспрессии генов *JUNB*, *JUN* и *ATF* с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени позволило экспериментально показать изменение экспрессии данных генов в пораженной псориазом коже. С помощью протеомного анализа образцов псориазической кожи установлено 10 маркерных белков, присутствующих только в пораженной псориазом коже. Данные белки могут рассматриваться как потенциальные мишени действия фармакологических препаратов при лечении псориаза. Культивирование псориазических кератиноцитов *in vitro* позволит более детально рассмотреть механизмы нарушений клеточной пролиферации и дифференцировки при развитии псориазического поражения, а также послужит удобной моделью для оценки эффективности тестируемых препаратов.

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО МНОГОКРАТНОГО КРИОГЕННОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ—ОТТАИВАНИЯ НА ПРОРАСТАНИЕ СУХИХ СЕМЯН МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ. © А. И. Соловьев. Институт физиологии растений РАН, slvjova.aleksandra@rambler.ru.

Изучали влияние на прорастание семян пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Энита множественных циклов замораживания в жидком азоте и оттаивания на воздухе. Сухие семена пшеницы (9 % влажности) помещали в криоампулы и погружали в жидкий азот на 30 мин. После оттаивания на воздухе сравнивали темпы прорастания семян из разных вариантов. Опыт состоял из двух частей. В первую часть были включены следующие варианты: контроль без замораживания; контроль с одним замораживанием и оттаиванием; два замораживания в

жидком азоте и одно извлечение ампул на воздух (на 5 и 1 мин, 5 и 1 с) с последующим оттаиванием. Во второй части эксперимента образцы замораживали 4, 5 или 6 раз и соответственно извлекали из жидкого азота 3, 4 или 5 раз на 1 или 5 с. После оттаивания семена помещали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и проращивали при 20 °С и дневном освещении. Учет проросших семян проводили через 3 и 7 сут после оттаивания. Существенных различий между вариантами эксперимента после 3 сут проращивания семян выявлено не было. Однако незначительное стимулирование прорастания отмечали у семян в контроле с одним замораживанием (35.6 %) и ингибирование прорастания в вариантах 5 мин, 1 с и 1 с 4 раза (21.1 %). Через 1 нед после оттаивания наблюдали максимум гибели семян в вариантах 5 мин и 1 с 4 раза (81.1 % и 80.0 % соответственно). В варианте 1 с 3 раза количество выживших семян составляло 41.1 %. Показано, что максимальное снижение прорастания семян пшеницы вызывали однократное изъятие образцов из жидкого азота на 5 мин и четырехкратное извлечение ампул из жидкого азота на 1 с с последующим их замораживанием и оттаиванием.

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В КОЖЕ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ. © Н. Л. Стародубцева,^{1,2} Д. И. Пономарева,^{1,2} В. П. Туманов.^{2,3} ¹ Центр биологических методов лечения, Москва, ² Московский физико-технический институт и ³ Российский государственный медицинский университет, Москва, augum19@mail.ru.

В работе было исследовано влияние введения культивированных фибробластов на состояние кожи человека. Основной целью было изучение изменения количества коллагена III типа и тропоэластина, поскольку они являются показателями состояния кожи. Коллаген III типа характерен для молодой кожи, его количество уменьшается с возрастом, а тропоэластин определяет эластичность кожи и также уменьшается с возрастом. Проводили исследование при участии 5 добровольцев в возрасте от 41 до 45 лет. Фибробласты выделяли из небольшого кусочка кожи за ухом, затем культивировали в течение 1 мес и клетки на 4—5-м пассажах вводили подкожно методом мультиинъекций в концентрации около 1 млн фибробластов в 1 мл физиологического раствора. У добровольцев брали биопсии кожи до и после введения фибробластов. Проводили сравнительный анализ биопсий до и после введения фибробластов на общее содержание коллагена, коллагена III типа, а также тропоэластина. Было показано, что относительное содержание коллагена III типа и содержание тропоэластина возрастают после введения культивированных аутофибробластов.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СТАБИЛЬНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ. © Б. Т. Стегний, М. Ю. Стегний, А. А. Лаврик. Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», Харьков, Украина, a_lavrik@rambler.ru.

В работах многих авторов было показано, что одним из основных критериев, с помощью которых можно

давать оценку биологических свойств культуры, являются кариотипические параметры клеток. В то же время, оценивая митотический режим исследуемых клеток с выявлением патологий их деления, можно дать подробную характеристику стабильности биологических параметров перевиваемых культур, используемых в вирусологических исследованиях и биотехнологическом производстве (Алов, 1966; Стегний, 1995; Белоконов, 2003). Были исследованы митотический режим и цитогенетические параметры 17 перевиваемых линий клеток, имеющих различное видовое происхождение: свиньи — SPEV, PK-15-IECVM и PTP; крупного рогатого скота — LEK, MDBK и PT; собаки — MDCK; сирийского хомячка — BHK-21/2-17 и BHK clone 13/04; африканской зеленой мартышки — Vero и CV; крысы — NGUK; кошки — F-81; овцы — PO-2 и PO-2/04; кролика — RK-13; сайгака — PS-FGM. Препараты метафазных хромосом получали общепринятым методом в модификации Мамаевой (1988). Учитывали не менее 100 метафазных пластинок. Митотический режим определяли по числу делящихся клеток, отнесенных к общему количеству посчитанных, из расчета на 1000 клеток. Патологические митозы учитывали в процентах по отношению к среднему количеству выявленных митозов. Согласно полученным результатам исследований цитогенетических параметров клеток, были определены линии, которые имеют нестабильный кариотип, характеризующийся большой вариабельностью числа хромосом в клетках (наблюдалось наличие более чем 15 наборов кариотипа) с отсутствием их модального класса (группы). К таким линиям отнесены культуры CV, PO-2 и RK-13. Другие линии клеток имели стабильный кариотип с меньшей в сравнении с вышеуказанными культурами кариотипической гетерогенностью, с выраженным модальным классом (группой) хромосом. По результатам исследования митотического режима культур клеток установлена прямая корреляция между отсутствием модального класса хромосом в клетках и долей патологий митоза от числа клеток, которые делятся. При этом коэффициент корреляции r_s равен +0.88, что свидетельствует о высокой степени зависимости между этими признаками. В 3 вышеуказанных культурах (CV, PO-2 и RK-13) доля патологических митозов превышала 20 % от числа клеток, которые делятся. Большую часть патологий в этом случае составляли нарушения митоза, связанные с повреждением как митотического аппарата, так и хромосом. Указанные нарушения приводили к неравномерному распределению хромосом между дочерними клетками, или к полиплоидии (колхициноподобный митоз). Поэтому перевиваемые культуры CV, PO-2 и RK-13 были отнесены к группе клеточных линий с несбалансированным кариотипом, применение которых в биотехнологии можно поставить под сомнение. Данные линии требуют продолжительной работы с использованием стандартных условий культивирования и отбором стабильных клонов клеток со следующей паспортизацией полученной сублинии. Из 17 исследованных линий в особую группу были выделены еще 3 культуры (PTP, MDCK и NGUK), которые согласно цитогенетическим признакам имеют стабильный кариотип с большим количеством (более 20 %) патологических митозов. Работа с данными культурами должна проводиться также до стабилизации их митотического режима. 11 культур из 17 (SPEV, PK-15-IECVM, LEK, BHK-21/2-17, BHK clone 13/04, MDBK, Vero, F-81, PO-2/04, PS-FGM и TR) характеризовались высокой цитогенетической стабиль-

ностью, которая проявлялась в наличии модального класса хромосом и в небольшой доле патологических митозов (менее 20 %).

ИЗМЕНЕНИЯ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ИЕС-6 КЛОН 13 ПРИ ДЕЙСТВИИ АВЕРСЕКТИНА С. © М. Ю. Стегний, Н. Д. Пшеничная. Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», Харьков, Украина.

Аверсектин С (смесь 8 авермектинов — А1а, А2а, В1а, В2а, А1в, А2в, В1в и В2в) относится к группе инсектоакарономатоцидных препаратов и является продуктом метаболизма микромицета штамма *Streptomyces avermitilis* ВНИИСГМ-54. В Украине аверсектин С используют в составе препаратов для борьбы с вредителями растений («Фитоверм») и в борьбе с эктопаразитами сельскохозяйственных животных («Фармацин» и др.). Вследствие широкого использования вышеуказанных препаратов в сельском хозяйстве не исключен их длительный контакт с животными, что обуславливает необходимость тестирования препарата на токсичность и мутагенность. В современной научной практике подобные эффекты химических веществ (в том числе и фармакологических препаратов) выявляются с использованием культур клеток (ISO 10993—5A Practical Guide to Cytotoxicity). Для оценки токсичного влияния аверсектина С на клетки использовали перевиваемую линию ИЕС-6 клон 13 из Коллекции клеточных культур ННЦ «ИЭКВМ». Клетки культивировали в смеси питательных сред DMEM и 199 (1 : 1) с добавлением 10 % сыворотки крови КРС при 37 °С, pH 7.0. Определение митотической активности (МА) и патологических форм митозов (ПФМ) проводили в культуре клеток, выращенных на покровных стеклах (1/2 24 × 24 мм) во флаконах объемом 10 см³. Каждые 24 ч образцы с клеточной культурой фиксировали в спирт-уксусном растворе (1 : 3), окрашивали гематоксилином Караччи и проводили дальнейшую оценку согласно методическим указаниям Белоконь и соавторов (1993). Цитогенетические изменения клеток ИЕС-6 клон 13 под влиянием аверсектина С изучали в монослое, сформированном через 24 ч после посева. При этом концентрация аверсектина С составляла 2 · 10⁻⁵ г/дм³ (вариант 1) и 2 · 10⁻⁷ г/дм³ (вариант 2). В концентрации С 2 · 10⁻⁵ г/дм³ аверсектин С в предыдущих исследованиях незначительно повреждал исследуемые клетки, эта концентрация в 100 раз ниже, чем рабочая концентрация, которую используют для обработки растений. В концентрации 2 · 10⁻⁷ г/дм³ аверсектин С не вызывает видимого цитотоксического эффекта и является остаточной концентрацией в тканях животных. В 1-е сут наблюдения не отмечено изменения МА клеток, которая составляла 14.25 ± 1.50 % (действующая концентрация 2 · 10⁻⁵ г/дм³) и 16.75 ± 1.50 % (действующая концентрация 2 · 10⁻⁷ г/дм³) в сравнении с интактной культурой клеток, в которой она составила 16.50 ± 4.65 %. Однако при этом достоверно ($P < 0.005$) возрастало количество ПФМ до 46.52 ± 11.33 % (вариант 1) и 32.54 ± 5.07 % (вариант 2), в контроле количество ПФМ составило 5.68 ± 8.60 %. В последующие 2 сут действия препарата МА в варианте 1 культивирования возросла до 35.00 ± 2.58 % (на 3-е сут действия препарата), что достоверно ($P < 0.005$) ниже, чем при контрольном

варианте культивирования (44.75 ± 2.50 %) и снизилась на 6-е сут роста клеток до 12.50 ± 1.73 %, что достоверно ($P < 0.005$) ниже этого показателя в контроле (19.50 ± 3.42 %), доля ПФМ возросла до 49.42 ± 14.16 % на 6-е сут роста клеток в варианте 1 и до 78.00 ± 2.88 % в варианте 2, тогда как в контроле этот показатель был только 19.15 ± 2.50 %, ниже ($P < 0.005$) показателей в вариантах 1 и 2. Во 2-м варианте культивирования на 2—3-и сут действия аверсектина С МА варьировала от 41.00 ± 2.58 до 30.50 ± 1.29 % и к 6-м сут культивирования составила 22.75 ± 2.50 %, что выше ($P < 0.005$) МА в контроле. ПФМ в 1—3-и сут воздействия препарата в варианте 2 культивирования изменилась от 21.95 ± 1.51 до 78.00 ± 2.88 %. Таким образом, установлено, что аверсектин С проявляет мутагенные свойства. Показано, что при действии аверсектина С в концентрациях, которые не дают явного цитотоксического эффекта, наблюдаются снижение митотической активности и значительное уменьшение количества патологических форм митозов. Среди патологий митоза преобладали повреждения митотического аппарата, которые выражались в появлении «колхициноподобных» митозов, кольцевых метафаз и трехполюсных митозов.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ГЕМОЦИТОВ АСЦИДИИ HALOCYNTHIA PURPUREAE. © А. Н. Сухачев,^{1,2} И. В. Кудрявцев,¹ А. В. Полевщиков.¹ ¹ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, и ²Биолого-почвенный факультет С.-Петербургского государственного университета.

Гемоциты асцидий обычно принято разделять на три основных типа — гранулоциты, макрофагоподобные и лимфоцитоподобные клетки. При этом в каждом типе можно выделить несколько групп клеток. Так, на основании окраски гранул гранулоциты подразделяются на азурофильные, базофильные и эозинофильные, причем среди последних выделяют морулярные клетки и эозинофильные гранулоциты. Объектом данного исследования были розовые асцидии *Halocynthia purpurea* (*H. aurant-hum*; Urochordata, Ascidiacea: Pyuridae), собранные в августе 2007 г. на базе «Восток» Института биологии моря ДВО РАН. Гемолимфу с циркулирующими клетками получали путем пункции субэпидермального синуса, для предотвращения коагуляции к суспензии гемоцитов добавляли раствор ЭДТА, получая финальную концентрацию ЭДТА 30 мМ. Полученные образцы гемолимфы мягко центрифугировали при 100 g в течение 10 мин при 4 °С, отмывали раствором Дальбекко без Ca²⁺ и Mg²⁺, содержащим 34 г/л NaCl. Осадок использовали для фракционирования клеток при помощи ступенчатого градиента диатризоата натрия и раствора Ficoll-Paque с плотностью 1.077 г/мл. Для получения фракций гемоцитов первым способом клеточную суспензию в объеме 1 мл наносили на охлажденные до 0 °С фазы диатризоата натрия (MP Biochemicals Inc., США). Градиент формировали в центрифужной пробирке объемом 10 мл (Sarstedt, США) путем последовательного наслаивания растворов диатризоата натрия с концентрациями 10, 20, 25 и 30 % на искусственной морской воде (3.4 г NaCl в 100 мл дистиллированной воды). Центрифугирование осуществляли при 100 g в течение 10 мин при 4 °С. На интерфазе гемолимфа—10%-ный раствор диатризоата натрия оседа-

ли разрушенные клетки, первая фракция гемоцитов обнаруживалась на границе 10—20 % диатризоата натрия, вторая — на границе 20—25 %, а третья фракция — на границе 25—30 %. Клетки полученных фракций снимали с интерфаз, отмывали охлажденным раствором Дальбекко без Ca^{2+} и Mg^{2+} в течение 5 мин при 100 g и анализировали при помощи методов световой микроскопии. Для окраски клеток использовали раствор Романовского—Гимзы, а также азур II и эозин. Первая, или верхняя, фракция клеток, формировавшаяся на интерфазе 10—20 % диатризоата натрия, была обогащена макрофагоподобными клетками, также встречались отдельные лимфоцитоподобные клетки. Основным клеточным типом второй фракции (20—25 % диатризоата) были гранулярные амебоциты с невысоким содержанием мелких гранул в области ядра. Клетки этой фракции при контакте со стеклом быстро распластывались и приобретали дискоидальную форму. В третью фракцию входили амебоциты с высоким содержанием гранул, которые были равномерно распределены по цитоплазме, и многочисленные морулярные клетки. Центрифугирование клеток с помощью раствора Ficoll-Raque производили при аналогичных условиях, однако клеточную суспензию наносили на Ficoll-Raque в объеме 5 мл. Результатом центрифугирования гемоцитов асидии *H. purpurea* стало получение двух фракций клеток, причем верхняя фракция содержала все типы гранулоцитов и макрофагоподобные клетки, тогда как нижняя фракция была представлена исключительно морулярными клетками. Таким образом, ступенчатый градиент диатризоата натрия может быть использован для разделения макрофагоподобных клеток и гранулоцитов, а раствора Ficoll-Raque — для получения чистой фракции морулярных клеток асидий. В ходе дальнейших исследований планируется провести функциональную характеристику всех полученных клеточных фракций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-00083 и 08-04-00111).

СРАВНЕНИЕ СПОСОБНОСТИ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА К ИНТЕГРАЦИИ В ОРГАНИЗМЕ У МЫШЕЙ. © С. В. Тазеев,¹ А. М. Полстяной,² У. В. Зыкова,³ А. В. Еремеев.^{4,2} ¹ Красноярский научный центр СО РАН, tazeeff@mail.ru, ² Красноярская государственная медицинская академия МЗ РФ, ³ Институт фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета и ⁴ ООО Центр репродуктивной медицины, Красноярск.

Механизмы миграции и хоуминга клеток различного генеза, вводимых в организм в целях терапии органов и тканей (стволовых, фетальных и т. п.), остаются малоизученными, несмотря на большое количество исследований. Исследована эффективность хоуминга и миграции в организме различных типов трансплантированных клеток. Оценивали эффективность хоуминга эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), фетальных фибробластов и фетальных фибробластов, инкубированных с ингибиторами метилаз. Исследовали способность клеток к миграции, выживаемость и приживаемость трансплантата при различных способах введения. Оценивали также способность трансплантированных клеток к дифферен-

цировке и их вклад в репарацию различных тканей. Проведена сравнительная оценка уровня иммунного ответа у интактных мышей, мышей с индуцированным иммунодефицитом, мышей с моделированной травмой, мышей с моделированной травмой и индуцированным иммунодефицитом. Для выявления роли раневого процесса в индукции миграции и интеграции трансплантированных клеток мышам производили частичную гепатэктомию (ЧГЭ). Интеграцию трансплантированных клеток оценивали по наличию SR γ (Sex Region of Y chromosome) маркерного гена половой Y-хромосомы в клетках. Культуры получали только от абортусов мужского пола для последующей трансплантации самкам. Визуализацию осуществляли методом геле-электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Уровень интеграции трансплантированных клеток оценивали на основании гистологического исследования предполагаемых органов-мишеней. Показано, что использование ингибитора метилазы приводит к реактивации экспрессии генов *oct-4* и *nanog* до уровней, сравнимых с их экспрессией в стволовых клетках. Выявлено, что при индуцированном иммунодефиците условия для трансплантации оптимальны вне зависимости от наличия травмы. Длительность циркуляции трансплантированных клеток в кровяном русле зависела от их типа. Наиболее длительно сохраняющимися и обладающими максимальной способностью к миграции из кровяного русла в органы оказались ЭСК. При местном введении способность к миграции в кровяное русло и химеризации всего организма обладали только ЭСК. При анализе гистологических срезов из органов исследуемых животных были выявлены ЭСК, мигрировавшие в орган из кровяного русла и интегрированные в структуру ткани с последующей дифференцировкой в функционально компетентные клетки.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ БЕЛКА CagA HELICOBACTER PYLORI: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ. © Л. А. Терехина, И. В. Грязева, М. П. Самойлович, В. Б. Климович. ФГУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург.

Инфекция *H. pylori* занимает одно из первых мест в мире по распространенности: инфицированность составляет приблизительно 60—70 % населения земного шара. Однако только у небольшого числа инфицированных людей (менее 10 %) развиваются ассоциированные с *H. pylori* заболевания: хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, предраковые изменения (атрофия и кишечная метаплазия) гастродуоденальной зоны, аденокарцинома (*H. pylori* признан канцерогеном 1-й степени) и возникновение MALT-лимфомы желудка. Это объясняется значительной гетерогенностью популяции патогена по вирулентности. Ген *CagA*, ассоциированный с цитотоксином, обнаруживается в геноме некоторых штаммов *H. pylori* и является маркером семейства генов, так называемого островка патогенности. Этот ген кодирует белок CagA, который является иммунодоминантным антигеном и основным фактором патогенности штамма. Целью работы было получение и исследование иммунохимических свойств моноклональных антител (МКАТ), предназначенных для выявления белка CagA, наличие которого коррелирует с тяжестью патологии слизистой желудка. Антигеном для

иммунизации служил рекомбинантный фрагмент цитотоксинассоциированного белка вирулентных (ульцерогенных) штаммов *H. pylori*. Мышей F1 (SJL × BALB/c) иммунизировали сначала в полном, затем в неполном адьюванте Фрейнда внутрибрюшинно. За 4 сут до гибридизации донору лимфоцитов трижды с интервалом в 24 ч внутрибрюшинно вводили антиген. Слияние спленоцитов мыши и клеток миеломной линии 553А проводили с помощью ПЭГ по стандартной методике. Культуры, продуцирующие антитела, клонировали методом лимитирующих разведений на фидерном слое из перитонеальных макрофагов и наращивали в массовой культуре в среде ДМЕМ, содержащей 10 % сыворотки крупного рогатого скота. После первичного тестирования надсадков с меченым антигеном и по результатам оценки ростовых характеристик гибридом было отобрано 6 антителопродуцирующих культур, которые были клонированы, а затем привиты мышам для получения МКАТ-содержащих асцитов. Подтверждение специфичности МКАТ проводили в непрямом ИФА с адсорбированными и мечеными молекулами белка CagA. Было установлено, что четыре МКАТ распознают эпитопы белка CagA, как находящегося в растворе, так и иммобилизованного на твердой фазе. Можно заключить, что распознаваемые этими МКАТ эпитопы устойчивы к изменениям конформации, происходящей при адсорбции антигена на твердой фазе и присоединении к антигену ферментной метки. Одно МКАТ связывает эпитоп, имеющийся только на растворенной молекуле антигена. Возможно, это указывает на конформационные изменения узнаваемой им детерминанты при иммобилизации белка CagA. И одно МКАТ связывает преимущественно адсорбированную молекулу CagA и не взаимодействует с меченым антигеном в растворе. Вероятно, эпитоп, распознаваемый этим МКАТ, изменяет свою пространственную конфигурацию при растворении антигена или после присоединения к нему ферментной метки. Среди полученных МКАТ выявлены реагенты, которые после адсорбции на твердой фазе с высоким аффинитетом связывают рекомбинантный белок CagA. Эпитопную направленность МКАТ исследовали в тесте конкурентного ИФА, когда предварительно сформированный комплекс меченого пероксидазой CagA и немеченых МКАТ инкубировали с МКАТ, адсорбированными на твердой фазе. Ингибирование реакции рассматривали как доказательство пространственной сближенности или идентичности эпитопов. Выделили не менее 5 изолированных детерминант на антигене, распознаваемых МКАТ. Были подобраны пары комплементарных МКАТ для двухдетерминантного ИФА. Минимально детектируемая концентрация CagA при этом составила 0,8 нг/мл. Таким образом, описанные МКАТ являются перспективными для использования в качестве реагентов в различных вариантах иммуноанализа для выявления CagA-положительных штаммов *H. pylori* и для контроля качества антигена, адсорбированного на твердой фазе.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН. © *Е. О. Тумофеева, Г. С. Шитикова.* С.-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и Предприятие по производству бактериальных препаратов, Санкт-Петербург.

Использование клеточных культур в производстве противовирусных вакцин сохраняет актуальность до на-

стоящего времени. На предприятии должны быть созданы гарантированные банки, которые необходимо охарактеризовать и отконтролировать в соответствии с требованиями, предъявляемыми к производству противовирусных вакцин. Основными требованиями, предъявляемыми к клеточным линиям, применяемым в производстве вакцин, является гарантия их высокой чувствительности к репродукции вирусных антигенов, безопасности, генетической стабильности, отсутствия посторонних контаминантов, постоянство основных показателей в процессе многолетнего производства. Первичные клеточные культуры (ПКК) используются для приготовления вакцин уже в течение нескольких десятилетий. Применяются куриные эмбрионы (для вакцин против гриппа, бешенства, клещевого энцефалита и желтой лихорадки), эмбрионы японских перепелов (для вакцин против кори и паротита), клетки VERO (вакцина полиомиелитная), культуры клеток почек сирийских хомячков (вакцина антирабическая) и диплоидные клетки человека (вакцина для профилактики краснухи). Диплоидные культуры клеток человека (ДКЧ) воспроизведены из одной клетки — клона клеток здорового донора. ДКЧ обладают способностью поддерживаться в пассажах определенное время. Их можно пересевать в течение полугода (50—55 пассажей), накапливая значительное количество клеток, превосходящее исходное число. Перевиваясь, ДКЧ характеризуются ограниченным сроком жизни, поэтому называются еще полуперевиваемой культурой клеток. Ограниченный срок жизни лимитирует и количество клеток, что не очень удобно и выгодно для изготовления вакцин. В настоящее время наиболее перспективными считают перевиваемые линии клеток (ПЛК), которые обладают рядом существенных преимуществ перед ПКК и ДКЧ. Прежде всего они обладают неограниченным сроком жизни, что позволяет создавать банки таких клеток — посевной-маточной и производственной культур клеток, характеризующихся еще и продолжительными сроками хранения их в жидком азоте. Грипп — массовая эпидемия, поэтому чрезвычайно актуальным является разработка нового поколения гриппозных вакцин с использованием тканевых клеточных культур. В настоящее время на предприятиях-производителях вакцинные штаммы для производства гриппозных вакцин готовятся в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Перевод производства вакцин с РКЭ на тканевые культуры является чрезвычайно своевременным, особенно в случае пандемической ситуации, когда в короткие сроки нужно приготовить большие объемы вакцины для иммунизации всех возрастных групп населения. В связи с вышеизложенным важной становится проблема разработки технологии производства таких культуральных гриппозных вакцин в России. Предпосылкой к решению такой проблемы можно считать создание российскими авторами отечественной клеточной линии VERO-B, аттестованной в соответствии с требованиями ВОЗ и разрешенной для производства вакцинных препаратов (Подчерняева и др., 2000). В случае адаптации вакцинных гриппозных штаммов к репродукции на клетках VERO-B ставится вопрос об использовании ее как субстрата для производства и разработки технологии культуральной гриппозной вакцины. С целью обеспечения производства противовирусных вакцин в СПбНИИВС создаются рабочий банк диплоидных клеток кожи и мышц эмбриона человека (штамм М-22), полученных из коллекции Института полиомиелита и вирусных энце-

фалитов РАМН, и рабочий банк перевиваемых клеток почек обезьян, среди которых высокочувствительные к репродукции вирусов культура обезьяньих клеток VERO-B, полученная из коллекции Института вирусологии им. Д. И. Ивановского. В настоящее время нами получены предварительные данные об адаптации и достоверно высокой чувствительности гриппозных вакцинных штаммов к размножению на культуре клеток VERO-B, что делает перспективной разработку производства вакцины на основе этой клеточной линии.

СУСЛИКИ *SPERMOPHILIS UNDULATUS* И МЫШИ, СКОРЕЕ ВСЕГО, ИМЕЮТ РАЗНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ ГИПЕРПЛАЗИИ БУРОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ. © *Е. А. Туровский*,^{1,2} *М. В. Конаков*.¹ ¹ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, turovsky.84@mail.ru, и ² Пущинский государственный университет.

Бурая жировая ткань (БЖТ) является важнейшим термогенным органом при пробуждении животных от зимней спячки, а также защищает от переохлаждения новорожденных млекопитающих, в том числе и человека. Долгое время принято было считать, что развитие БЖТ у сусликов происходит вследствие акклимации к холоду, так как периоды развития и инволюции БЖТ совпадают с сезонными периодами похолодания и потепления. Тем не менее анализ данных по этому вопросу указывает на то, что развитие БЖТ у сусликов ближе к типу развития БЖТ у новорожденных млекопитающих, происходящего в утробе матери при постоянной температуре. Ранее мы показали, что гиперплазия БЖТ регулируется как норадреналином, так и некоторыми нейропептидами; вторичными мессенжерами в этой регуляции выступают сАМР и ионы Ca^{2+} . Вскоре оказалось, что Ca^{2+} -сигнализация также зависит от сАМР. Чтобы понять разницу и сходство в функционировании сигнализаций в бурых преадипоцитах мышей и сусликов, эксперименты были сделаны параллельно с предшественниками адипоцитов обоих видов. Форсколин инициирует синтез сАМР в результате непосредственной активации аденилатциклазы. Добавление форсколина в суспензии преадипоцитов БЖТ мышей и сусликов показало следующее. 1. Скорость поступления ионов Ca^{2+} в преадипоциты мыши достигала максимума при 10—15 мкМ, а затем резко уменьшалась в 2—3 раза и оставалась постоянной вплоть до 100 мкМ. Такая отрицательная обратная связь (колоколообразная кривая) наблюдалась нами ранее при использовании практически всех адренергических агонистов (Dolgacheva et al., 2003). 2. Скорость входа ионов Ca^{2+} в преадипоциты сусликов достигала первого максимума под действием 10 мкМ форсколина, второй максимум наблюдался при 20 мкМ; отрицательной обратной связи не наблюдалось даже при 100 мкМ агониста. Эти процессы, ингибирование входа ионов Ca^{2+} в клетках мышей и обе последовательные ступени роста скорости входа ионов в клетках сусликов, являются высококооперативными (коэффициент Хилла равен 5), тогда как кинетика входа ионов Ca^{2+} в преадипоцитах мышей имеет кооперативность, равную двум. Второй этап нашей работы должен дать ответ на вопрос о том, изменяется ли профиль зависимости Ca^{2+} -сигнализации от концентрации форсколина в клетках обоих видов в зависимости от уровня дифференцировки адипоцитов, плотности клеточной культуры, присутствия ростовых факторов сыворотки или это полностью определяется видом животного.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48942).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТОВ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ. © *О. О. Ударцева*, *Е. Р. Андреева*, *О. С. Гринаковская*, *Л. Б. Буравкова*. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, olja_udartseva@rambler.ru.

Фотодинамическое воздействие (ФДВ) — это неинвазивный метод, компонентами которого являются лазерное облучение и фотосенсибилизатор (ФС). ФС под действием света определенной длины волны переходит в возбужденное состояние. Далее протекает ряд химических реакций, в результате которых образуются активные формы кислорода (АФК), токсичные для клеток. В основе метода лежит различная способность клеток разных типов накапливать ФС, что позволяет избирательно влиять на отдельные популяции клеток. В настоящее время ФДВ широко применяется в онкологической практике. Кроме того, ФДВ используется также и для лечения неонкологических заболеваний (акне, доброкачественные новообразования кожи, пролиферативные заболевания артерий). В связи с этим представляется важным исследование эффектов ФДВ на различные клетки, которые могут оказаться клетками-мишенями при проведении ФДВ. В настоящей работе мы исследовали влияние ФДВ на клетки трех типов: моноцит-производные макрофаги (Мн/Мф), эндотелиальные клетки (ЭК) и фибробласты человека. Мн/Мф из периферической крови человека и ЭК из пупочной вены выделяли и культивировали согласно стандартным протоколам. Фибробласты человека использовали на 5—10-м пассажах. ФС (сульфонированный фталоцианин алюминия (ГУП НИО-ПИК РФ)) в конечной концентрации 10 мкг/мл добавляли к среде культивирования на 24 ч и определяли его накопление в клетках (в пересчете на общий клеточный белок). Для проведения ФДВ клетки инкубировали с ФС 24 ч, отмывали от ФС и облучали с помощью лазерного аппарата АЗОР ($\lambda = 675$ нм) в дозе — 1—100 Дж/см². Определяли жизнеспособность клеток (МТТ-тест), апоптотически/некротические клетки (набор Аннексин V-FITC — PI) и АФК (H₂DCFDA). Наибольшей способностью накапливать ФС обладали Мн/Мф (Мн/Мф — 2.1, фибробласты — 0.57, ЭК — 0.27 нг ФС на 1 мг белка). Жизнеспособность клеток после ФДВ уменьшалась прямо пропорционально в зависимости от дозы облучения. При высоких дозах облучения погибало до 100 % клеток. При средних и высоких дозах облучения клетки погибали путем некроза. Низкие дозы (до 10 Дж/см²) лазерного облучения обладали меньшим повреждающим действием, гибель клеток в этом случае происходила по пути апоптоза. Высокие, средние и низкие дозы различались для разных типов клеток. При этом доза облучения LD₅₀ для Мн/Мф составляла 10—20, для фибробластов — 7—10, для ЭК — 0.5—1.0 Дж/см². ФДВ приводило к образованию АФК в клетках. Таким образом, на модели *in vitro* показано, что Мн/Мф, ЭК и фибробласты человека различаются по способности накапливать ФС и чувствительности к ФДВ, что необходимо учитывать при разработке протоколов применения ФДВ для лечения неонкологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-01504-а и МНТЦ 2579).

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНЫМИ ФОРМАМИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА ПО ТЕХНОЛОГИИ ВЫСОКОДОЗНОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ С ПОДДЕРЖКОЙ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. © А. С. Федулов, А. Л. Усс, В. А. Змачинский, Н. Ф. Миланович, А. В. Борисов, Л. С. Дражина, А. Г. Байда, М. Ф. Минзер, Е. Е. Черныш, И. В. Булаев, Л. Б. Мицкевич, В. В. Смольникова, Н. Д. Волковец, Е. В. Дзюба, М. М. Морозова, Н. С. Соловьева, Я. М. Мотузова. Белорусский государственный медицинский университет, Республиканский центр трансплантологии и клеточных биотехнологий и УЗ 9-я городская больница, Минск.

Рассеянный склероз (РС) — хроническое прогрессирующее мультифакториальное аутоиммунное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), которое поражает преимущественно молодых лиц в возрасте от 18 до 50 лет и при отсутствии адекватного лечения приводит к значимым нарушениям неврологических функций вплоть до невозможности самообслуживания. К сожалению, существующие в настоящее время методы лечения РС (например, применение интерферонов и глатирамера ацетата) являются лишь отчасти эффективными; кроме того, довольно значительная часть пациентов (до 50—60 %) остается резистентной к проводимой терапии. Исходя из существующих представлений о механизмах возникновения и развития РС недостаточность и кратковременность положительного эффекта от лечения при РС могут быть обусловлены прежде всего сохранением в организме патологического клона аутореактивных Т-лимфоцитов. Одним из перспективных патогенетических методов терапии РС является высокодозная полихимиотерапия с поддержкой аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (АуТГСК), которая позволяет осуществить функциональную переустановку иммунной системы больного. Целью работы была оценка эффективности высокодозной полихимиотерапии с поддержкой аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток у больных с фармакорезистентными формами РС. Исследовали влияние АуТГСК на динамику неврологического статуса; оценивали эволюцию патоморфологических изменений в мозге больных РС, которым была выполнена АуТГСК, по данным МРТ; устанавливали влияние АуТГСК на паттерны вызванных потенциалов мозга различных модальностей. Объектом исследования служили 15 больных с фармакорезистентными формами РС. Контрольная группа включала в себя 20 пациентов с РС, которые получали лечение кортикостероидными препаратами, а также проходили курсы плазмафереза. Диагноз РС был верифицирован согласно критериям Мак-Дональда. Период наблюдения после АуТГСК составил от 1 до 36 мес. Исследование проводили с помощью метода клинического наблюдения с оценкой степени выраженности неврологической симптоматики по шкале EDSS, клинико-иммунологических методов, метода нейровизуализации (МРТ) с контрастным усилением, метода вызванных потенциалов и методов медико-биологической статистики.

Технология высокодозной полихимиотерапии с поддержкой аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток состоит из следующих этапов: 1) мобилизация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) цитокинами в периферический кровоток; 2) коллекция ГСК (лейкаферез) на аппарате «COBE Spectra» (COBE Laboratories, Lakewood, CO); 3) замораживание и хранение ГСК; 4) высокодозная полихимиотерапия (иммуноабляция); 5) аутотрансплантация ГСК (репопуляция). При оценке динамики неврологического статуса и выраженности инвалидизации у 14 пациентов с РС, которым проводилась АуТГСК, в посттрансплантационном периоде отмечалась стабилизация либо некоторое снижение выраженности неврологического дефицита (на 0.5 балла по шкале EDSS). Среди больных РС, которым проводилось АуТГСК, за период наблюдения нарастание инвалидизации имело место у 1 пациента (на 0.5 балла по шкале EDSS). У 14 пациентов в сроки наблюдения от 1 до 36 мес наблюдалась стабилизация исходных МРТ-данных в T2-взвешенном режиме без признаков активности процесса. У 1 больного выявлены новые очаги, накапливающие контраст, на МРТ спустя 12 мес. Произведена оценка данных метода вызванных потенциалов (ВП) различных модальностей. После АуТГСК у 9 пациентов отмечалось улучшение по данным акустических ВП, у 6 пациентов — зрительных ВП и у 5 больных — соматосенсорных ВП верхних конечностей. Осложнения в посттрансплантационном периоде включали в себя гематологическую токсичность, тошноту, рвоту, диарею, гепатотоксичность, мукозит и субфебрилитет. В результате исследования показано следующее. 1. Применение АуТГСК у больных с фармакорезистентными формами РС приводит к снижению частоты эксацербаций в сроки наблюдения до 3 лет. 2. Применение АуТГСК у больных с фармакорезистентными формами РС способствует снижению темпов прогрессирования неврологической симптоматики в сроки наблюдения до 3 лет. 3. Терапевтический эффект АуТГСК подтверждается стабилизацией патоморфологических изменений в ЦНС больных РС, выявляемых при нейровизуализации (МРТ, МРТ в T2-взвешенном режиме и МРТ с контрастным усилением). 4. У больных РС, прошедших лечение с использованием технологии АуТГСК, отмечено улучшение показателей вызванных потенциалов мозга различных модальностей либо их устойчивая стабилизация в период наблюдения до 3 лет.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК СЕРДЦА ЭМБРИОНОВ КРЫСЫ И ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ КАРДИОМИОБЛАСТОВ И КАРДИОМИОЦИТОВ. © Т. Г. Хряпенкова, М. В. Коротецкая, Д. Б. Зоров, Е. Ю. Плотищев. Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета, tenella@list.ru.

Выделение истинных стволовых и прогениторных клеток является перспективным направлением в современной медицине в связи с развитием методов клеточной терапии. Одним из актуальных направлений является выделение чистых кардиомиобластов для лечения различных патологий сердечной ткани. В данной работе было показано, что первичная культура сердца содержит помимо кардиомиоцитов различные другие типы клеток,

не представляющие интереса для кардиомиопластики. Так, имеются различия в строении актинового цитоскелета: только около 50 % клеток имеют поперечную исчерченность актиновых волокон, т. е. обладают сформированным сократительным аппаратом. Именно эти клетки мы считаем истинными кардиомиобластами. Также эти клетки различаются по флуктуациям внутриклеточной концентрации кальция. Кроме того, нами обнаружено уникальное свойство кардиомиобластов — высокий уровень энергетики этих клеток, обеспечиваемый большим количеством митохондрий. Проанализировав все полученные данные, мы пришли к выводу о том, что культура клеток эмбрионального миокарда содержит минимум два типа клеток: 1) кардиомиобласты/кардиомиоциты, способные к самопроизвольному сокращению, обладающие более высоким трансмембранным потенциалом, имеющие поперечную исчерченность актиновых волокон, в которых наблюдаются флуктуации внутриклеточного кальция; 2) клетки, не обладающие всеми вышеперечисленными признаками. Это балластные клетки, прежде всего фибробласты и кардиофибробласты. Мы показали, что окрашивание смешанной первичной культуры эмбрионального миокарда высокоспецифичным флуоресцентным митохондриальным зондом дает четкое разделение смешанной популяции: популяция кардиомиоцитов и кардиомиобластов обладает высоким трансмембранным потенциалом, а балластные клетки — низким. В результате, применив проточную цитометрию, сопровождающуюся сортировкой клеток по этому признаку, мы можем получить популяцию, обогащенную именно кардиомиоцитами и кардиомиобластами. А поскольку краситель не оказывает токсического действия на клетки и достаточно быстро элиминируется, риск повреждения и гибели клеток в процессе сортировки значительно снижается по сравнению с традиционными методами. Таким образом, данное исследование открывает возможности для разработки нового специфического метода выделения культуры кардиомиоцитов из фетальных и эмбриональных источников для дальнейшего использования в клеточной терапии.

МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫЕ МУЛЬТИКЛЕТОЧНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ СФЕРОИДЫ КАК НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОНКОЛОГИИ IN VITRO. © А. М. Цой, Д. С. Зайцева-Зотова, Е. А. Марквичева. Институт биоорганической химии РАН, Москва, tsoyanna@gmail.com.

Мультиклеточные опухолевые сфероиды — это трехмерные (3D) модели на основе животных клеток, представляющие собой более адекватную модель малых солидных опухолей, чем суспензионные или адгезионные (2D) культуры. В ИБХ РАН для получения сфероидов был предложен метод микрокапсулирования. Для этого клетки помещают в биосовместимые полупроницаемые полимерные микрокапсулы и культивируют с целью получения мультиклеточных сфероидов для их дальнейшего использования в качестве моделей *in vitro*. Классические методы формирования сфероидов заключаются в том, что поверхностно-зависимые клетки культивируют в суспензии при перемешивании, где они вынужденно растут в агрегатах, образуя сфероиды. В отличие от классических методов метод инкапсулирования позволяет формировать сфероиды необходимого диа-

метра с узким распределением по размерам, генерировать сфероиды, состоящие из культур клеток, которые не образуют агрегатов в суспензионной культуре, а также осуществлять совместное культивирование раковых клеток с другими типами клеток (фибробласты, эпителиальные клетки, макрофаги и др.). Для получения микрокапсул в работе использовали прибор с коаксиальной подачей воздуха, позволяющий получать микрокапсулы со средним диаметром 800—1000 мкм. Однако для адекватной модели малой опухоли *in vivo* оптимальным размером считается 300—600 мкм. Разработка и использование нового электростатического генератора микрочастиц позволили снизить размер микрокапсул до 300 мкм. В данной работе изучена возможность генерирования микрокапсулированных опухолевых сфероидов, сформированных на основе различных монослойных и суспензионных клеточных линий животных и человека (Sp2/0, MCF-7, M3, P388, HeLa, THP1 и др.). Микрокапсулированные клетки культивировали в течение 14—28 сут. Пролиферацию клеток оценивали путем подсчета клеток в гемоцитометре с использованием трипанового синего. На основе полученных данных были построены кривые роста и показано, что характер роста клеток внутри микрокапсул зависит от типа клеточной линии. Таким образом, предложенный нами метод микрокапсулирования позволяет генерировать опухолевые сфероиды на основе целого спектра различных клеточных линий, а также получать сфероиды на основе нормальных линий клеток, в частности эмбриональных фибробластов человека и мезенхимных стромальных клеток. В дальнейшем полученные микрокапсулированные сфероиды планируется использовать в качестве новых моделей *in vitro* для экспериментальной онкологии.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6 В КОНТРОЛЕ И ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ. © А. Н. Чернов, В. Н. Калюнов, М. О. Роева, В. А. Кульчицкий. ГНУ Институт физиологии НАН Республики Беларусь, Минск.

На 3-суточной культуре крысиной глиомы С6 цитометрически определяли размеры, площади, занимаемые клетками, их количество, способность к нейритогенезу, степень элонгации отростков и индекс пролиферации как в «интактных» условиях ($n = 5$), так и под влиянием мышинового фактора роста нервов (ФРН) в концентрации 100 нг/мл ($n = 3$). Клетки выращивали в среде Дульбекко, содержащей 0.5 % эмбриональной телячьей сыворотки. Индивидуальные размеры опухолевых глиоцитов, оцениваемые по их диаметру, в первой серии составили 210 ± 0.83 мкм и оказались достоверно меньшими ($P < 0.05$), чем во второй (22.02 ± 0.03 мкм). Статистически значимые различия ($P < 0.01$) коснулись и стандартной площади клеток в каждом ($n = 8$) посева. В обработанных нейротрофиновым протеином она находилась на уровне 224.91 ± 12.66 мкм², тогда как в контрольных препаратах — 214.00 ± 13.73 мкм². Подавляющее большинство неопластических единиц как в опыте (44.70 ± 15.35 %), так и в контроле (58.75 ± 5.19 %) имело по два выроста. Но количество тех из них, которые генерировали по одному (23.7 ± 1.3 %) или по три (15.30 ± 0.25 %) отростка на фоне действия ФРН, достоверно ($P < 0.05$ и $P < 0.01$ соответственно) превышало та-

ковое в лишенных его образцах (18.50 ± 1.66 и 13.25 ± 2.95 %). Это не касается степени элонгации отростков. При экспозиции с нейроростовым белком средняя их протяженность равнялась 125.60 ± 6.27 мкм, а без него 68.60 ± 4.01 мкм ($P < 0.01$). Индекс пролиферации клеточных элементов не претерпевал существенных альтераций ($P < 0.05$), составив 5.210 ± 1.035 в экспериментальных культурах и 4.58 ± 0.52 в контрольных. Таким образом, при аппликации ФРН стимулирует нейритогенез и рост цитоплазматических выростов при увеличении размеров и площадей опухолевых глиоцитов на фоне отсутствия достоверных различий в индексе пролиферации опытной и контрольной серий.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАННИХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ IN VITRO В ПРИСУТСТВИИ БЕТА-ЭНДОРФИНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ, ВЫСТУПАЮЩИХ В РОЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РОСТА.
© А. С. Чернов. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Московская обл.

На развитие ранних эмбрионов млекопитающих оказывает влияние множество факторов. Важную роль в процессах клеточного деления, дифференцировки и морфогенеза в период эмбриогенеза млекопитающих играют пептидные ростовые факторы. Получено много данных, подтверждающих огромное значение факторов роста и их рецепторов во время дробления клеток и образования бластоцист. Одним из факторов, определяющих нормальное развитие эмбрионов *in vivo*, является бета-эндорфин, который секретируется фолликулярными клетками, окружающими яйцеклетку, и клетками эндометрия во время имплантации зародыша в стенку матки. В начале 1980-х годов Джулиард и соавторы получили из экстракта плаценты человека фрагмент 364—377 тяжелой цепи IgG (SLTCLVKGFYPSDI), который имел 50 % подобия с центральной частью молекулы бета-эндорфина 10—23. Позднее в Лаборатории пептидных биорегуляторов ФИБХ РАН были синтезированы бета-эндорфиноподобные пептиды: иммунорфин (SLTCLVKGFY) и его фрагменты 6—10 — пентарфин (VKGFY) и циклопентарфин (cycloVKGFY). Показано, что эти фрагменты являются селективными агонистами неопиоидного (не чувствительного к налоксону) рецептора бета-эндорфина, обнаруженного на клетках иммунной системы, а также то, что иммунорфин (10^{-7} М) стимулирует раннее развитие зародышей мышей *in vitro*. Поскольку пентарфин и циклопентарфин являются фрагментами иммунорфина, в данной работе было изучено влияние этих пептидов и бета-эндорфина (10^{-7} М) на развитие 2-, 4- и 8-клеточных зародышей мыши *in vitro*. Также было изучено действие бета-эндорфина, пентарфина и циклопентарфина в присутствии блокатора опиоидных рецепторов налоксона для выявления механизма действия исследуемых пептидов. Было показано, что все исследуемые пептиды не оказывали отрицательного влияния на раннее развитие зародышей мыши на всех протестированных стадиях. Пентарфин, бета-эндорфин и циклопентарфин увеличивали жизнеспособность 2-, 4- и 8-клеточных эмбрионов, стимулировали деление бластомеров, образование и выклевывание бластоцист по сравнению с контролем. При культивировании ранних эмбрионов в среде с налоксонном наблюдалось большое количество аномалий и меньший процент зародышей достигал стадии бластоцисты.

Однако добавление налоксона в среду с пентарфином, циклопентарфином и бета-эндорфином не влияло на развитие зародышей. Процесс развития эмбрионов и формирование бластоцист происходил так же хорошо, как и с исследуемыми пептидами. Таким образом, мы предположили, что стимулирующее действие бета-эндорфина, пентарфина и циклопентарфина на ранние зародыши мыши осуществлялось через неопиоидные рецепторы бета-эндорфина. Наиболее активно на развитие ранних эмбрионов влиял циклопентарфин (10^{-7} М). Кроме того, показано, что в присутствии циклопентарфина наблюдалось ускорение развития зародышей без увеличения количества аномалий. Таким образом, представляется возможным использование пентарфина и циклопентарфина как неспецифических факторов роста при культивировании ранних эмбрионов млекопитающих для улучшения их качества и повышения жизнеспособности.

АНАЛИЗ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ И КЛОНАХ КУЛЬТУРЫ ПРОТОВОКОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА MiaPaca2. © Д. А. Шавочкина, И. Ф. Кустова, А. Г. Кузнецова, Н. Л. Лазаревич. НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра РАМН, Москва.

Работа посвящена исследованию экспрессии гепатоцитарных ядерных факторов (HNF и ГЯФ) и некоторых других групп генов в культуре и клонах культуры клеток поджелудочной железы человека MiaPaca2. ГЯФ были описаны как тканеспецифические транскрипционные факторы, определяющие экспрессию большинства функциональных генов печени. Взаимодействие и взаимный контроль всех ГЯФ способствует установлению и поддержанию гепатоцитарного фенотипа, отдельные факторы этой сети экспрессируются и в других органах. Транскрипция HNF4 α может происходить с двух независимо регулируемых промоторов — P1 и P2. По-видимому, центральная роль в регуляции активности сети ГЯФ принадлежит HNF4 α , экспрессия которого определяет образование и дифференцировку целого ряда органов в эмбриогенезе. Во взрослой печени преобладает экспрессия изоформы HNF4 α 1, тогда как в поджелудочной железе активен фактор HNF4 α 7, транскрипция которого идет с альтернативного промотора. Нами проведен анализ экспрессии ГЯФ в культурах клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, различающихся уровнем клеточной дифференцировки, пролиферации и сохранения эпителиальной морфологии. Нами показано, что экспрессия изоформы HNF4 α 7 наблюдается в культурах клеток с высоким уровнем дифференцировки и снижается в культурах клеток, имеющих более злокачественный фенотип. Для исследования возможной роли HNF4 α 7 в регуляции экспрессии генов, обуславливающих дифференцировку клеток поджелудочной железы, нами были получены клоны клеточной линии MiaPaca2, экзогенно экспрессирующие ген HNF4 α 7. MiaPaca2 представляет собой низкодифференцированную клеточную линию протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Восстановление экспрессии гена HNF4 α 7 существенно снижает уровень пролиферации клеток, а также их способность к образованию колоний. Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) выявлены изменения в паттерне экспрес-

сии генов, входящих в группу тканеспецифических транскрипционных факторов, а также генов, ассоциированных с клеточной пролиферацией и поддержанием эпителиального фенотипа. В клонах культуры *MiaPaca2* нами выявлена значительная HNF4 α 7-зависимая активация экспрессии панкреас-специфического транскрипционного фактора Pdx1, являющегося дифференцировочным маркером β -клеток поджелудочной железы. Кроме того, мы показали активацию экспрессии тканеспецифического гена амилазы в клетках HNF4 α 7-экспрессирующих клонов. Транскрипционные факторы HNF3 γ , HNF1 и vHNF1 в клонах, так же как и в самой культуре *MiaPaca2*, не экспрессируются в отличие от нормальной ткани поджелудочной железы. Однако нами описана экспрессия гена виментина в клетках клонов и культуры, что свидетельствует о происходящем в клетках эпителиально-мезенхимального перехода в отличие от клеток нормальной ткани поджелудочной железы, в которой экспрессируется ген Е-кадгерина. Так же как и клетки нормальной ткани поджелудочной железы, клетки культуры и ее HNF4 α 7-продуцирующих клонов экспрессируют гены транскрипционных факторов ОС-2, С/ЕВР α и С/ЕВР β . В отличие от нормальной ткани в клетках культуры и ее клонах мы не наблюдали значительного уровня экспрессии генов трансформирующих факторов роста TGF β 1 и TGF β 2. Таким образом, экзогенная экспрессия гена HNF4 α 7 приводит к снижению уровня пролиферации клеток, а также к активации экспрессии транскрипционного фактора Pdx1 и тканеспецифического гена амилазы, что может служить показателем приобретения клетками более дифференцированного фенотипа. Мы предполагаем, что изменение уровня экспрессии гена тканеспецифического транскрипционного фактора HNF4 α 7 может являться критерием развития злокачественного фенотипа клеток поджелудочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-12151-офи и грант по программе поддержки ведущих научных школ НШ-5177.2008.4).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ И ЦЕЛОМИЧЕСКОГО ЭПИТЕЛИЯ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* L., ВЫДЕЛЕННЫХ НА РАННИХ СРОКАХ ПОСЛЕ НАНЕСЕНИЯ РАНЫ.
© Н. С. Шарлаимова, О. А. Петухова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Важную роль в регенерации и защитных реакциях иглокожих от различного рода инфекций и повреждений выполняют целомощцы (ЦЦ). ЦЦ циркулируют в составе целомической жидкости (ЦЖ) и способны к фагоцитозу инородных частиц и к образованию агрегатов в зонах существенных повреждений тела, затрагивающих целомические каналы. Восполнение клеточной популяции ЦЦ при нанесении раны происходит достаточно быстро, однако источник и особенности дифференцировки этих клеток до сих пор мало изучены. Предполагается, что восстановление пула ЦЦ может происходить либо за счет деления клеток-предшественников в определенных камбиальных зонах, либо источником являются малодифференцированные клетки депо. Одним из таких предполагаемых клеточных депо у Asteroidea рассматривают целомический эпителий (ЦЭ). Гистологический

анализ клеточных популяций ЦЦ и ЦЭ, проведенный при экспериментальном истощении ЦЖ, позволил выделить несколько типов клеток. Анализ динамики популяций в зависимости от срока восстановления показал увеличение доли ЦЦ с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением на 3-е сут. Именно этот тип клеток считают недифференцированными клетками-предшественниками. Анализ популяций клеток ЦЭ показал, что по крайней мере некоторые типы клеток ЦЖ и ЦЭ имеют общие морфологические характеристики, в частности клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. По ранее полученным данным, клетки ЦЖ и ЦЭ *A. rubens* остаются жизнеспособными в условиях *in vitro* более 2 мес. Целью данной работы является гистологический анализ клеток ЦЖ и ЦЭ в условиях культивирования, а также анализ пролиферативной активности клеток *in vitro*. Эксперименты проводили на Беломорской биологической станции Зоологического института РАН. Для нанесения экспериментальной раны особям *A. rubens* размером 10—12 см отрезали кончик луча и максимально спускали целомическую жидкость, после чего замещали ее морской водой. Далее клетки ЦЖ и ЦЭ выделяли в культуру на разных сроках восстановления популяций методом ферментативной диссоциации, после чего клетки культивировали в модифицированной среде Лейбовича в присутствии 2 % сыворотки. В процессе культивирования клеток проводили фиксацию и дальнейшую гистологическую окраску препаратов, а также оценивали уровень включения бромдезоксисуридина для контроля пролиферативной активности клеток. Характерной особенностью ЦЦ, выделенных в культуру через 5 ч после поранения, является образование синцитиев. В остальных случаях клетки ЦЖ в культуре образуют сети; кроме того, были обнаружены все типы клеток, описанные ранее при анализе суспензии клеток. В образовании сетей участвуют гранулоциты и крупные агроулоциты. В процессе культивирования клетки ЦЭ формируют несколько типов межклеточных образований: агрегаты мелких агроулоцитов с темноокрашенным ядром; распластанные клетки, образующие сети, подобные сетям ЦЦ (агроулоциты и гранулоциты); одиночные гранулоциты; группы распластанных агроулоцитов с более светлым ядром. Часто наблюдали агрегаты мелких агроулоцитов, сидящих на сетях. Способность клеток ЦЭ формировать сети, подобны сетям ЦЦ, зависела от временного периода прошедшего после экспериментальной раны. Анализ пролиферативной активности клеток ЦЭ показал, что через 2 мес культивирования они сохраняют способность включать бромдезоксисуридин (до 5 %). Морфологически эти клетки можно идентифицировать как клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Таким образом, поведение клеток ЦЖ и ЦЭ зависит от того, в какой момент после нанесения раны клетки выделяли в культуру, что может отражать функциональное состояние клеток, измененное в результате экспериментального истощения ЦЖ. При культивировании можно обнаружить все типы клеток, описанные ранее *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-10090-К).

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИИ КЛЕТОК НЕК293 СО СТАБИЛЬНОЙ ТРАНСФЕКЦИЕЙ YFP-МЕЧЕННОГО ЭФРИ-

НОВОГО РЕЦЕПТОРА EphA2 С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-АКТИВИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ СОРТИРОВКИ. © Г. В. Шаронов,^{1,2} М. В. Астапова.¹ ¹ Институт биоорганической химии РАН, Москва, и ² Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета, sharonov@gmail.com.

В настоящее время общепринятым стандартом при исследовании функции белка в клетке является использование флуоресцентных белков в качестве зондов. Получение клеток с транзиторной трансфекцией исследуемого химерного белка не представляет существенных проблем, однако результаты, получаемые на клетках с транзиторной трансфекцией, не всегда воспроизводимы. Надежный подход для изучения химерных белков подразумевает получение клеток со стабильной трансфекцией данного белка, что уже представляет определенные трудности. Традиционный способ получения такой линии, заключающийся в селекции трансфицированных клеток с помощью антибиотика, занимает не менее 2 нед и далеко не всегда оказывается успешным. В данной работе в качестве альтернативы традиционному способу опробован метод флуоресцентно-активированной клеточной сортировки (ФАКС) с помощью клеточного сортера MoFlo (ДАКО, Дания). Было установлено, что экспрессия эфрина рецептора EphA2, конъюгированного с флуоресцентным белком, существенно замедляет рост клеток. Селекция антибиотиком в этом случае вызывала постепенное снижение числа как EphA2-отрицательных (EphA2⁻-клетки), так и EphA2-положительных (EphA2⁺-клетки) клеток и в конечном итоге приводила к потере культуры или выживанию небольшого числа EphA2⁻-клеток. При сортировке на клеточном сортере было установлено, что, несмотря на замедление скорости роста EphA2⁺-клеток, они продолжают делиться, хотя и медленнее, чем EphA2⁻-клетки. Отсутствие антибиотика позволило увеличивать число трансфицированных клеток в 10—50 раз за 1 нед. При этом в конце недели из культуры выделяли EphA2⁺-клетки, которые культивировали далее. Доля EphA2⁺-клеток составила 2, 5 и 32 % после 1, 2 и 3-й нед соответственно. Результат указывает на то, что в некоторых случаях ФАКС является предпочтительнее, чем традиционный способ получения стабильно трансфицированной линии клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01372-а) и фонда президента РФ (грант МК-3160.2008.4).

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ВИТРИФИКАЦИИ НА МОДЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЛИНИИ НЕК293. © Ю. И. Шеина, А. В. Еремеев. Центр репродуктивной медицины, Красноярск, shein1@mail.ru.

В связи с интенсивным развитием клеточных технологий в области стволовых клеток появилась необходимость разработки адекватных методов заморозки данного материала. На настоящий момент наиболее распространенным способом криоконсервации стволовых клеток являются метод медленной заморозки с предварительным охлаждением до $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ и инкубации при этой температуре в течение 1 сут. В последнее время разработаны новые методы заморозки, основанные на

прямом погружении клеток в жидкий азот, без медленного предварительного охлаждения (витрификация). К ней можно отнести разнообразные методики с использованием различных криопротекторов и различных емкостей для заморозки. Однако, как правило, витрификации подвергают лишь незначительное количество клеточного материала (несколько десятков микролитров). В связи с этим целью данной работы стал подбор оптимальных условий для заморозки больших количеств (около 1 мл) клеток при прямом погружении их в жидкий азот в криобирках с последующим сохранением их жизнеспособности. Первоначальной целью работы был выбор пригодных для витрификации сред и тестирование их на модельном объекте — культуре клеток линии НЕК293. В работе оценивали процентное содержание выживших клеток после заморозки с использованием метода прижизненной окраски эозином, а также проводили анализ содержания в культуре клеток, вступивших в апоптоз и некроз после криоконсервации. Были использованы следующие среды: 1) коммерческая среда для заморозки эмбрионов (1,2-пропандиол, сахара) с добавлением 2 мМ диметилсульфоксида; 2) эмбриональная телячья сыворотка; 3) смесь эмбриональной телячьей сыворотки (80 %) и диметилсульфоксида (20 %); 4) среда DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 10 % диметилсульфоксида. После заморозки проводили анализ клеток на жизнеспособность при окрашивании их эозином и исследовании образцов в световом микроскопе. Кроме того, проводили анализ на выявление клеток, вступивших в апоптоз и некроз при окрашивании их Hoechst 33342 и Propidium iodide, под флуоресцентным микроскопом. Результаты сравнили с незамороженными опухолевыми клетками. Были рассчитаны медианы и квартили (25 и 75) для всех показателей. Достоверность различия сравниваемых показателей оценивали с помощью критерия Манна—Уитни. При оценке процентного содержания выживших клеток после витрификации четырьмя способами было выявлено, что наиболее эффективным является способ заморозки с использованием в качестве криопротектора среды для криоконсервации эмбрионов с 2 мМ диметилсульфоксида. При этом способе доля выживших клеток достоверно снижается на 42.2 % в сравнении с долей живых клеток в интактных колониях ($P = 0.049$, $n = 5$). Анализ в культурах после заморозки клеток, вступивших в апоптоз и некроз, выявил, что при использовании всех видов сред для криоконсервации после разморозки во всех культурах достоверно преобладает процесс некроза ($P = 0.049$). В интактной же колонии клеток имеется тенденция к увеличению количества клеток, вступивших в апоптоз ($P = 0.127$, $n = 5$). Таким образом, было получено, что в сравнении с показателями жизнеспособности интактных незамороженных клеток доля живых клеток после витрификации с использованием среды для криоконсервации эмбрионов с 2 мМ диметилсульфоксида достоверно наибольшая по сравнению с другими исследованными средами. При использовании всех сред для криоконсервации после разморозки во всех культурах достоверно преобладает процесс некроза.

ГЕНЫ ПРОТЕИНАЗ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ. © А. В. Шубин, Н. А. Лунина, Е. В. Новосадова, И. В. Демидок, С. В. Костров. Институт молекулярной генетики РАН, Москва, shavlady@gmail.com.

Одним из интенсивно развивающихся современных подходов к лечению онкологических заболеваний является генная терапия. К настоящему времени проанализировано противораковое действие большого количества генов, однако лишь некоторые из них оказались пригодными для клинического использования. В связи с этим актуальной задачей является поиск новых терапевтических генов, обладающих противоопухолевой активностью. Протеиназы играют ключевую роль в запуске клеточной гибели, что позволяет рассматривать гены этих ферментов в качестве потенциальных противораковых агентов. На основе анализа литературных данных в качестве кандидатных были выбраны гены протеиназ 2А полиовируса человека и 3С вируса гепатита А человека, а также гены лизосомальных протеиназ — катепсинов D и В. Ранее способность вызывать клеточную гибель была показана для протеиназ 2А и 3С, а также для катепсинов D и В при их выходе из лизосом в цитоплазму. Для оценки способности протеиназ вызывать клеточную гибель был предложен подход, основанный на регулируемой экспрессии кандидатных генов в модифицированной линии клеток НЕК293 Tet-OFF, полученной на основе культуры клеток НЕК293. Гены целевых белков вводили в вектор рBi-EGFP под контроль двунаправленного тетрациклинзависимого промотора. Под управлением того же промотора находился ген зеленого флуоресцентного белка, что позволяло детектировать несущие вектор клетки. Главным достоинством такой системы является возможность проводить оценку способности кандидатных генов вызывать гибель клеток без получения стабильно трансфицированных клеточных линий. С использованием описанной системы нами была проведена оценка способности генов протеиназ 2А, 3С, а также катепсинов D и В и их вариантов с модифицированными сигналами сортинга вызывать гибель клеток. Модификация сигналов сортинга катепсинов D и В была проведена для обеспечения цитоплазматической локализации белков. Экспрессия генов протеиназ 3С и 2А в линии клеток НЕК293 Tet-OFF приводила к клеточной гибели, детектируемой через 48 ч после проведения трансфекции. Результаты двойного окрашивания флуоресцентными ядерными красителями (Хёхстом 33258 и иодидом пропидия) свидетельствовали о гибели клеток по пути апоптоза. В то же время экспрессия всех вариантов генов катепсинов D и В к клеточной гибели не приводила. Полученные нами данные подтверждают, что протеиназы 2А полиовируса человека и 3С вируса гепатита А человека

могут рассматриваться в качестве потенциальных агентов противораковой генной терапии, а также демонстрируют возможность использования предложенной нами системы для тестирования способности широкого спектра генов вызывать гибель клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Роснауки (лот 5.2007-02-2.2-05-01).

КАРИОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ КАК СПОСОБ ПАСПОРТИЗАЦИИ КЛЕТОК В ГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИОБАНКАХ (НА ПРИМЕРЕ РОДА *SILENE*). © А. П. Яковлев, А. В. Яшклина, С. Г. Яшина. Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Московская обл., xloroplast@mail.ru.

Неотъемлемой частью описания живых организмов является характеристика генетического аппарата. Живой материал, консервируемый в криобанках, нуждается в систематизации и паспортизации. Для этих целей наиболее выгодно использовать кариотип консервируемого объекта. Для определения кариотипа растений часто используют методику приготовления временных препаратов метафазных хромосом из корешков с окраской ДНК-специфичными красителями (ацетокармином, ацетоорсеином и др.). Мы использовали для окраски метафазных хромосом флуоресцентные ДНК-специфичные красители (Hoechst, DAPI и др.) с последующим изучением препаратов на конфокальном микроскопе. Предложен метод окраски метафазных хромосом из корешков некоторых видов рода *Silene* флуоресцентным ДНК-специфичным красителем Hoechst 33342. Данный краситель имеет сродство к парам АТ-оснований, хорошо прокрашивая ядерный материал. Очевидным преимуществом красителя Hoechst являются быстрота связывания с ДНК и интенсивная флуоресценция, практически без выцветания. При использовании флуоресцентных красителей время эксперимента существенно сокращается. Основным достоинством предлагаемой методики является возможность получения трехмерных изображений хромосом, что в свою очередь позволяет с большей точностью построить кариотип. Использование конфокальной микроскопии исключает ошибки при идентификации отдельных хромосом, так как позволяет исследовать объект по всей его глубине.