

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ISSN 2077- 6055

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ
ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЮЛЛЕТЕНЬ

ВЫПУСК 35

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2019

Настоящий выпуск сборника посвящен 90-летию со дня рождения Георгия Петровича Пинаева (29.01.1929 – 22.11.2013), выдающегося ученого, доктора биологических наук, профессора, Заслуженного деятеля науки РФ.

Сборник содержит информацию о результатах фундаментальных и прикладных исследований Г.П. Пинаева и сотрудников руководимого им в течение 40 лет Отдела клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Представлены также результаты научной деятельности сотрудников отдела в последующие годы после ухода из жизни Г.П. Пинаева.

Сборник предназначен для широкого круга исследователей, работающих в области клеточной биологии, биотехнологии и медицины.

Электронная версия настоящего выпуска помещена на сайте Института цитологии РАН (Санкт-Петербург): <http://www.cytspb.rssi.ru>

Редакционная коллегия: М.С. Богданова – ответственный редактор

Г.Г. Полянская

А.М. Кольцова

РАЗВИТИЕ КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ПОЗВОНОЧНЫХ, СОЗДАННОЙ

ПРОФ. Г.П. ПИНАЕВЫМ

Г. Г. Полянская

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

poljansk@incras.ru

В статье, посвященной памяти Заслуженного деятеля науки РФ, д.б.н., профессора Г.П. Пинаева, дана краткая историческая справка о создании Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур (РККК), основоположником и координатором работы которой он был. Описаны принципы работы РККК. Представлена разносторонняя деятельность Коллекции культур клеток позвоночных (КККП) Института цитологии РАН, которая являлась Центральным банком Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур.

Ключевые слова: Российская коллекция клеточных культур, Коллекция культур клеток позвоночных, паспорт коллекционной клеточной линии, кариотипическая изменчивость, гибридомы, эмбриональные стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки.

Одним из важнейших достижений Заслуженного деятеля науки РФ, д.б.н., профессора Георгия Петровича Пинаева явилось создание Коллекции клеточных культур. Обладая огромным организаторским талантом и высоким профессионализмом в разных областях биологии и, в частности, в клеточной биологии, Георгий Петрович был инициатором и основоположником создания Всесоюзной, а потом Российской коллекции клеточных культур (РККК). До последних дней своей жизни он был координатором деятельности РККК.

Оценив состояние биологической науки в начале 70-х годов прошлого века, Георгий Петрович пришел к выводу, что необходимо создание в стране Коллекции клеточных культур, включающей в себя клеточные линии человека, животных и растений. К этому времени стало понятно, что отечественные перспективные фундаментальные и прикладные исследования в области молекулярной и клеточной биологии, генетики, эмбриологии неразрывно связаны с широким использованием культур клеток разного происхождения. Такие центральные общебиологические проблемы как дифференцировка, канцерогенез, клеточная подвижность, пролиферация, передача наследственной информации, регуляция экспрессии генов и другие решаются, в основном, на клеточных культурах. Клеточные культуры имеют также большое

значение для решения прикладных задач медицины, сельского хозяйства, биотехнологии и биологической промышленности. К основным задачам следует отнести массовое промышленное производство вакцин и физиологически активных соединений, получение моноклональных антител методами гибридомной технологии, лечение тяжелых заболеваний методами генотерапии и клеточной заместительной терапии, повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и выведение новых сортов растений, сохранение биоразнообразия генофонда путем криоконсервации соматических и половых клеток животных и растений.

Клетки в культуре подвержены высокой наследственной изменчивости при длительном культивировании под действием меняющихся условий внешней среды. В большинстве случаев невозможно определить, изменение каких конкретных свойств имело место. Поэтому при работе с клеточными культурами должны быть приняты меры, позволяющие избегать усиления генетической нестабильности. Успешное сохранение исходных или направленно измененных свойств клеточных линий, а также получение воспроизводимых экспериментальных результатов достигается путем соблюдения строго выдерживаемых условий культивирования и криоконсервации клеточных культур. Поддержание исходных клеточных свойств и контроль их состояния осуществляют Национальные коллекции разных стран, создание которых происходило, в основном, во второй половине XX века. К моменту создания Коллекции клеточных культур в нашей стране уже было создано несколько зарубежных коллекций.

Наиболее крупными мировыми коллекциями являются Американская коллекция типовых культур – ATCC (www.atcc.org) и Европейская коллекция клеточных культур животных (www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp). Бурное развитие биоиндустрии и стремительно возрастающая ценность клеточных линий с сопутствующим ограничением международного распространения клеток, имеющих практическое применение, стимулировало создание в течение последних десятилетий ряда новых Национальных коллекций клеточных культур в Германии, Англии, Японии, Китае, Франции, Италии, Дании. Национальные коллекции являются сейчас областью государственных и деловых интересов.

В 70-х годах XX века в период бурного развития в мире молекулярной и клеточной биологии, молекулярной генетики и биотехнологии проявилась невозможность интенсивного развития в нашей стране исследований с широким использованием клеточных культур в связи

с отсутствием централизованной коллекции клеточных линий и с отсталостью материально-технической базы. Существовавшие в отдельных институтах коллекции клеточных культур были невелики по объему, а по способу организации не предназначены для обеспечения клеточным материалом ведущихся в стране исследований. Клеточные линии и штаммы, хранящиеся в коллекциях, были, как правило, недостаточно охарактеризованы. Георгий Петрович привлек 8 институтов, в которых уже имелись клеточные линии, к созданию национальной коллекции на основе общих требований к клеточному материалу, имеющемуся в разных коллекциях. В связи с этим, 29.05.1978 г. на уровне Государственного комитета Совета Министров СССР по науке и технике и Президиума Академии наук СССР было принято решение о создании Всесоюзной коллекции клеточных культур путем организационного объединения уже имевшихся в отдельных институтах коллекций человека, животных и растений. Перед Всесоюзной коллекцией была поставлена задача сбора и сохранения клеточных культур человека, животных и растений, и обеспечения ими научных учреждений СССР.

Постановлением от 13.02 1981 г. за № 24/25/13 Государственный комитет СССР по науке и технике, Госплан СССР и Президиум Академии наук СССР утвердили программу работ по созданию Всесоюзной коллекции клеточных культур. Головным учреждением по проблеме был определен Институт цитологии АН СССР. Всего в Коллекцию вошло 9 специализированных коллекций клеточных культур человека, животных и растений.

Необходимо отметить обширную научно-информационную деятельность, которую постоянно инициировал Георгий Петрович Пинаев. В результате совместных усилий разных коллекций была создана информационная база данных по клеточным линиям, имеющихся в фондах коллекции. В 1991 году был выпущен первый каталог клеточных линий Всесоюзной коллекции клеточных культур. В этом каталоге был приведен перечень культур с указанием отдельных их свойств и информацией об источнике получения (1). Но уже в 1999 году по инициативе Г.П. Пинаева был составлен и опубликован полный каталог всех клеточных линий, составляющих фонды РККК (2). В каталоге были представлены все паспорта клеточных линий согласно международным требованиям. Сведения давали все 9 коллекций РККК, но составителями всего сводного каталога, помимо ответственных редакторов, были сотрудники ИНЦ РАН Г.А. Сакута и М.С. Богданова, внесшие большой вклад в его создание. Каталог был издан в русской и английской версиях. В 2004 году он был переиздан в связи с

большим спросом на представленную в нем информацию. Данные о фондах РККК в обеих версиях в настоящее время размещены в Интернете на сайте ИНЦ РАН (www.incras.ru) в рубрике – «Коллекции, каталоги» и «Collections, Catalogs». Информация по возможности обновляется. Большинство подразделений РККК функционируют и в настоящее время.

По инициативе и под руководством Георгия Петровича была создана межрегиональная общественно-научная организация «Ассоциация специалистов по клеточным культурам» (АСКК), которая просуществовала с начала 80-х годов до 2018 года. Целью создания этой организации было объединение научных сотрудников разных учреждений, занимающихся фундаментальными и прикладными исследованиями на клеточных культурах, что было важно для развития клеточной биологии в стране. Сотрудники всех подразделений РККК стали членами этой организации.

С 1986 года под эгидой Института цитологии РАН и АСКК стал издаваться ежегодный сборник «Клеточные культуры» (Информационный бюллетень). В сборнике представлены экспериментальные статьи и обзоры по проблемам клеточной биологии. Всего издано 35 выпусков. В разные годы в редакционную коллегию входили сотрудники ИНЦ РАН: Г.П. Пинаев, М.И. Блинова, А.Д. Тартаковский, И.И. Фридлянская, С.Ю. Хайтлина, М.С. Богданова, А.М. Кольцова, Г.Г. Полянская. Следует подчеркнуть, что неоценимый вклад в подготовку и издание сборника, начиная с начала 90-х годов, вносит составитель и ответственный редактор М.С. Богданова.

За годы существования Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур был выпущен ряд учебно-методических сборников, способствующих теоретической подготовке и освоению навыков практической работы с клеточными культурами (3–8).

В разные годы РККК являлась членом Европейского общества тканевых культур (ETCS), Всемирной федерации коллекций культур и Европейской организации коллекций Культур (ЕССО). Информация о фондах коллекции представлена в Международных каталогах клеточных линий (9, 10).

В 1987 году Государственным институтом патентной экспертизы была обоснована необходимость патентования штаммов культивируемых клеток животных и растений, представляющих практическую ценность для народного хозяйства. В число патентуемых клеточных линий входят: клетки-продуценты биологически активных веществ; клетки, используемые для производства иммунобиологических препаратов и диагностикумов, а также

гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, которые широко применяются в научных исследованиях и в практической медицине. Все патентуемые линии должны быть депонированы в одной из официальных коллекций для хранения и выдачи образцов референтных штаммов.

В качестве официальных депонирующих организаций для клеточных культур человека и животных были утверждены Коллекция культур клеток позвоночных (КККП) Института цитологии РАН и Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных (СХЖ) при Институте экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко РАСХН. Основанием для этого было совместное решение Комиссии по клеточным культурам Междуведомственного научно-технического совета по проблемам физико-химической биологии и биотехнологии ГКНТ СССР, Академии наук СССР и Всесоюзного научно-исследовательского института государственной патентной экспертизы о правовой охране клеточных линий, представляющих интерес для народного хозяйства. Основой для разработки правил депонирования явился Будапештский договор о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры (Будапешт, 28 апреля 1977 г.). Депонирование авторских клеточных линий проводится и в настоящее время.

До 1995 года руководителем КККП была И. И. Фридлянская, которая вместе с Г.П. Пинаевым заложила основной фундамент коллекции. Совместно с сотрудниками КККП И.И. Фридлянской была начата разработка паспортов коллекционных клеточных линий согласно международным требованиям, что послужило основой для дальнейшего развития коллекции. С 1995 года по настоящее время коллекцией руководит Г.Г. Полянская. В фондах КККП содержится 146 клеточных линий человека и разных видов животных, включая как иммортализованные, так и неиммортализованные линии. Также в фондах КККП находятся 785 авторских клеточных линий и гибридом, депонированных в связи с процедурой патентования. Фонды коллекции в настоящее время составляют около 23000 криопробирок с коллекционным клеточным материалом и 7840 криопробирок с депонированным клеточным материалом, хранящимся в жидком азоте в криокомплексе. С момента создания КККП и до сегодняшнего дня криокомплексом, который является неотъемлемой частью КККП, руководит Николай Аркадьевич Шубин. Являясь, с одной стороны, опытным инженером по холодильным установкам, а с другой, понимая специфику криоконсервации живого клеточного материала,

Николай Аркадьевич создал криокомплекс, состоящий из ряда необходимых приборов и обеспечивающий в настоящее время не только потребности КККП, но и всего ИНЦ РАН в целом.

Задачи работы Коллекции культур клеток позвоночных. Перечисленные ниже задачи работы КККП в целом совпадают с таковыми любой научно-исследовательской коллекции клеточных культур (11, 12).

1. Создание, непрерывное поддержание и развитие фондов коллекции путем получения, паспортизации и хранения клеточных линий человека и животных.

2. Разработка единых требований к качеству коллекционного материала: единые паспорта, методы анализа, хранения и контроля клеточных линий согласно международным требованиям.

3. Совершенствование методов ведения коллекции и работы с клеточными линиями на основе проведения многолетних научных исследований, посвященных изучению влияния условий культивирования, криоконсервации и контаминации на генетическую изменчивость клеточных линий; получение и характеристика новых клеточных линий и гибридом.

4. Депонирование авторских клеточных линий и гибридом в связи с процедурой патентования.

5. Создание информационных баз данных по клеточным культурам.

6. Обеспечение образцами стандартного и полностью охарактеризованного клеточного материала фундаментальных и прикладных биологических, медицинских и сельскохозяйственных исследований.

7. Оказание научно-методической помощи сотрудникам научных учреждений страны по методам культивирования и анализа клеточных линий и издание методических руководств.

Рассмотрим более подробно некоторые задачи, решаемые в КККП. Каждая коллекционная клеточная линия имеет паспорт, в котором представлены основные характеристики согласно международным требованиям, предъявляемым к коллекционным линиям. Паспорт является важнейшим документом, регламентирующим методы, которые необходимо использовать для принятия клеточной культуры в фонды коллекции и присвоения ей статуса коллекционной линии. При поступлении клеточной культуры в коллекционные фонды, прежде всего, проводят контроль на наличие микробной контаминации. При отсутствии контаминаций клетки

размножают и закладывают в криохранилище до тех пор, пока не будет от автора получен паспорт клеточной культуры, соответствующий требованиям международного паспорта, приведенного ниже. После паспортизации клеточные линии переходят в разряд коллекционных линий. Далее создается референтный посевной Банк, который постоянно хранится в криокомплексе. Из него образуют рабочий Банк, состоящий из 50 – 100 криопробирок, который постоянно восполняется новыми закладками.

Ниже представлены основные характеристики, входящие в паспорт коллекционной клеточной линии.

1. Аббревиатура клеточной линии.
2. Происхождение клеточной линии, включая источник литературы, в котором описывается методика получения линии.
3. Морфология клеток в культуре.
4. Способ культивирования.
5. Условия культивирования.
6. Жизнеспособность после криоконсервации, определяемая на 0- пассаже.

7. Контроль контаминации культуры микроорганизмами. Эта характеристика является первой и решающей для определения дальнейшей судьбы клеточной линии. Проводится исследование культуры на присутствие грибов, бактерий и микоплазм. Определение наличия контаминаций представляет для коллекций особую важность, так как в них культивирование клеточных линий ведется в отсутствии антибиотиков. Присутствие грибов и бактерий определяется обычными и широко распространенными микробиологическими методами (8). Наибольшую опасность для клеточных культур представляют микоплазмы. Источниками микоплазменной контаминации, как правило, являются сами исследователи, компоненты ростовых сред и лабораторное оборудование. К настоящему времени определено 6 видов микоплазм, наиболее часто (95% случаев) контаминирующих клеточные культуры: *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorinis*, *M. orale*, *Acholeplasma laidlawii* (13). Микоплазмы относятся к персистирующим инфекциям, присутствие которых очень трудно обнаружить на ранних стадиях контаминации, так как в небольшом количестве они не оказывают видимого отрицательного влияния на клетку. Тем не менее, изменения некоторых характеристик могут иметь место, в частности, изменения транскрипционного профиля эукариотических клеток. При усилении контаминации возникают значительные

цитопатические эффекты. В настоящее время нет универсального индикатора, фиксирующего микоплазменную контаминацию. Для надежного выявления микоплазм в клеточных культурах рекомендуется использовать сочетание двух или трех способов. Основным методом выявления микоплазм – микробиологическое культивирование: высев на селективные питательные среды; 2-й рекомендуемый метод – окраска клеток флуорохромами Hoechst 33258, Dapi или оливомицином; 3-й метод – ПЦР анализ (13–15). Сложность использования только одного метода определения микоплазменной контаминации связана как с ограниченностью каждого метода, так и со специфическими свойствами микоплазм (15–18). Поэтому в коллекции всегда одновременно используется несколько методов детекции микоплазмы в клеточных линиях.

8. Контроль видовой идентичности клеточной линии. В условиях культивирования клетки различных видов животных морфологически неразличимы. Кроме того, в результате технических ошибок персонала нередко происходит перекрестное заражение клетками разных линий – явление довольно частое, особенно в условиях исследовательских лабораторий, где не осуществляется постоянный контроль качества клеточной линии. Основным методом определения видовой идентичности является подробный кариологический анализ, позволяющий с помощью разных дифференциальных окрасок хромосом определить видоспецифичность данной клеточной линии. Причем, исходя из специфики дифференциального окрашивания у разных видов, для определения видоспецифичности в каждом конкретном случае используют наиболее информативный для данного вида тип окрашивания (19, 20). Еще одним методом, используемым для видовой идентификации клеточной линии, является изоферментный анализ, основанный на разной электрофоретической подвижности определенных ферментов у разных таксономических групп животных и человека. Для тестирования используются изоферменты: лактатдегидрогеназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (21).

9. Кариология клеточной линии. Каждая клеточная линия должна иметь кариотипическую характеристику, которая строго специфична для каждой линии (5, 22).

10. ДНК-профиль (STR) – для клеточных линий человека. Во все паспорта коллекционных линий человека, представленных в каталоге КККП, введен данный пункт. С помощью молекулярно-генетического анализа должна быть проведена аутентификация каждой линии с целью подтверждения соответствия данной линии источнику ее получения и отсутствия контаминации другими линиями (ООО «GORDIZ»).

Кроме перечисленных основных характеристик в паспорте каждой линии приводят конкретные данные, представляющие большую важность для исследователей, пользующихся коллекционными линиями. Эти характеристики определяют возможную область применения конкретной линии. К таким характеристикам, в частности, относятся: чувствительность к вирусам; специфические особенности линии, включающие ростовые характеристики, туморогенность, наличие биохимических и генетических маркеров и др. Основные работы КККП выполняются по разработанным стандартным операционным процедурам.

Основы паспортизации изложены в ряде зарубежных изданий (23, 24). Современная версия каталога КККП ИНЦ РАН представлена в электронном виде на странице ЦКП сайта ИНЦ РАН http://www.incras.ru/rkkk/katalog_ccc_v_incras_2018_rus.pdf

КККП ведет обширную деятельность в качестве Центра коллективного пользования (ЦКП). С момента своего создания, КККП осуществляла функции ЦКП. Но официально, по приказу, она стала отдельным подразделением ИНЦ РАН в 2004 году. Это подразделение имеет определенную инфраструктуру, которая позволяет ей обеспечивать коллекционную работу как в научных направлениях, так и в качестве ЦКП.

Основными услугами, которые оказывает ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», являются: 1) обеспечение образцами стандартного и полностью охарактеризованного клеточного материала фундаментальных и прикладных биологических, медицинских, сельскохозяйственных и биотехнологических исследований; 2) депонирование авторских клеточных линий и гибридом в связи с процедурой патентования; 3) оказание консультационных услуг по методам культивирования и анализа клеточных линий.

Согласно требованиям Министерства науки и высшего образования РФ, ЦКП КККП имеет собственную страницу на сайте ИНЦ РАН – www.incras.ru/lab_ckp/ckp_lab_ru.htm и на федеральном информационном портале <http://ckp-rf.ru/ckp/3029/>.

Работа КККП ИНЦ РАН была поддержана разными программами: программой Миннауки "Биоразнообразие"- до 2001 г, грантом РФФИ (2000–2003 гг.); Научной программой Президиума СПБНЦ РАН (2000, 2003–2008, 2010–2013 гг.); Программой РАН по молекулярной и клеточной биологии (2003–2007); государственными контрактами (2007–2009; 2011–2013 г.). В 2016–2017 гг. коллекция была поддержана существовавшим в то время Федеральным агентством научных исследований РФ по Программе развития биоресурсных коллекций.

В течение 40 лет в КККП проводятся разносторонние научные исследования по биологии клетки в культуре.

1. Получение и характеристика гибридом. Расширение фондов Коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН всегда определялось запросами фундаментальных исследований и практическими задачами здравоохранения. В 80-е годы прошлого столетия сотрудниками КККП под руководством и при активном участии И.И. Фридлянской было получено и охарактеризовано несколько гибридом, продуцирующих моноклональные антитела. Моноклональные антитела явились новым поколением иммунодиагностических и иммунотерапевтических препаратов, позволивших существенно расширить возможности фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований (25, 26). В течение 1987–1990 года было получено 4 авторских свидетельства, подтверждающих получение новых гибридом.

2. Изучение влияния условий культивирования, криоконсервации и контаминации на кариотипическую изменчивость клеточных линий. Клеточная популяция *in vitro* как автономная система имеет свои особенности по сравнению с организмом. Для ее выживания необходимо образование сбалансированной кариотипической структуры, которой характеризуется стадия стабилизации клеточной линии (27). Клеточные популяции *in vitro* являются динамичными системами и, лишившись многоступенчатого организменного контроля, в значительной степени подвержены влиянию внешних факторов, которые способствуют, в частности, усилению кариотипической изменчивости. Для многих постоянных клеточных линий установление сбалансированной кариотипической структуры связано с наличием в кариотипе перестроенных, по сравнению с донором, постоянных маркерных хромосом. Помимо «маркерных» постоянных клеточных линий, есть и «безмаркерные» постоянные клеточные линии. Научные исследования, проведенные в КККП, посвящены выявлению закономерностей структурной и количественной кариотипической изменчивости в постоянных (иммортизированных), преимущественно «безмаркерных» клеточных линиях, при длительном культивировании в разных условиях. Существенный вклад, внесенный в решение фундаментальных проблем клеточной биологии, состоит в том, что впервые иммортизированные клеточные линии, не имеющие маркерных хромосом, были рассмотрены как особые биологические системы с характерными кариотипическими особенностями. В целом, проведенный кариотипический анализ позволил выдвинуть гипотезу о существовании двух способов адаптации клеточных линий к условиям *in vitro*: образование дицентриков

(теломерных ассоциаций) и изменения регуляции генной экспрессии; стабилизация определенной цитогенетической структуры в популяции на основе соотношения разных структурных вариантов кариотипа - СВК (число гомологичных хромосом каждого морфологического типа). В результате в клеточной популяции *in vitro* реализуется состояние, которое можно назвать кариотипическим гомеостазом. Выполненные цитогенетические исследования имеют и практическую значимость, связанную с необходимостью проведения периодического цитогенетического контроля в клеточных культурах (28–31).

3. Получение и характеристика новых линий эмбриональных стволовых клеток человека. С начала XXI века большое внимание в КККП уделяется получению и характеристике линий стволовых клеток человека, перспективных для использования их как в фундаментальных исследованиях биологии клетки в культуре, так и в диагностике и биомедицинских технологиях. Прежде всего, это коснулось получения линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека и их дифференцированных производных. Линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), выделенных из ранних эмбрионов человека, являются уникальными плюрипотентными клеточными популяциями *in vitro*, обладающими способностью к самообновлению, т.е. к неограниченной пролиферации и одновременно способностью дифференцироваться во все типы соматических клеток и в линию половых клеток. В настоящее время в разных странах мира существуют уже несколько сотен постоянных линий ЭСК человека. Мы тоже получили и охарактеризовали несколько линий ЭСК человека (32–35). Основные характеристики этих линий следующие: 1) неограниченная пролиферация клеток, значительно превышающая 60 удвоений клеточной популяции (число Хейфлика) при отсутствии периода репликативного старения; 2) поддержание высокой теломеразной активности, обеспечивающей стабильную длину теломер, необходимую для поддержания пролиферативной активности; 3) нормальный кариотип; 4) наличие специфических поверхностных эмбриональных антигенов SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 и транскрипционных факторов Oct-4 и Nanog; 5) способность к ненаправленной дифференцировке в производные трех зародышевых листков и в линию половых клеток *in vitro* и *in vivo*. ЭСК человека действительно являются адекватной моделью для проведения многосторонних фундаментальных исследований.

Тем не менее, для использования ЭСК человека в регенеративной медицине необходимо преодолеть ряд препятствий. В частности: 1) наличие гетерогенности клеточных культур; 2)

появление тератом при введении *in vivo* и их вероятная малигнизация; 3) иммунное отторжение производных ЭСК человека, для которых характерна экспрессия генов главного комплекса гистосовместимости (МНС), хотя и более слабая, чем у клеток взрослого организма; 4) повышенный уровень геномной нестабильности по сравнению с другими стволовыми клетками, который может быть частично связан с адаптивными геномными изменениями, способствующими малигнизации клеток. В настоящее время широко обсуждаются этические проблемы и проблемы биобезопасности использования для регенеративной медицины ЭСК человека.

4. Получение и характеристика новых линий мезенхимных стволовых клеток человека.

Получив и охарактеризовав несколько линий ЭСК от разных доноров, включая линии, созданные в фидерных и бесфидерных условиях, мы перешли к получению и характеристике линий различных мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, которые являются более стабильными, чем линии ЭСК. Известные в настоящее время данные по анализу цитогенетической нестабильности МСК свидетельствуют о том, что частота возникновения нестабильности в МСК значительно ниже, чем в ЭСК (36). Согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК разного происхождения определяется рядом определенных характеристик (37, 38).

Известно, что МСК человека обладают иммуномодулирующими свойствами и способностью к мультипотентной дифференцировке. Сравнительное изучение свойств, являющихся определяющими в поддержании статуса МСК, а также других характеристик, ответственных за важнейшие клеточные процессы, актуально как для понимания механизмов биологических процессов в клетке, так и для расширения возможностей использования МСК в регенеративной медицине. Сравнительный анализ характеристик МСК разного происхождения важен в связи с особенностями взаимодействия их с уникальным микроокружением (нишей), характерным для определенной ткани, которое регулирует пролиферацию, выживаемость, миграцию, старение, дифференцировочный потенциал и другие клеточные свойства посредством межклеточных взаимодействий и различных биоактивных молекул (39–43).

Показано, что важнейшим механизмом действия МСК на поврежденные ткани является способность их к миграции в эти участки и оказание трофического действия путем секреции биоактивных факторов, изменяющих микроокружение поврежденных клеток и тем самым

способствующих улучшению тканевой репарации. МСК могут оказывать трофическое действие посредством клеточных везикул, осуществляющих перенос биоактивных молекул в клетки-мишени. В литературе широко обсуждаются механизмы тканевой репарации с помощью МСК, связанные с продукцией цитокинов и паракринных факторов (44–59).

К настоящему времени в КККП получено и охарактеризовано 14 линий МСК человека, полученных из разных источников (60–69). 9 линий включены в современную версию каталога КККП, а также в каталог на бумажном носителе, который включен в книгу, подробно излагающую историю создания и научную деятельность КККП (70).

Между полученными линиями обнаружены количественные различия по ростовым характеристикам, по характеру репликативного старения и по кариотипической нестабильности. Причинами наблюдаемых различий могут быть: 1) эпигенетические факторы, связанные с условиями культивирования или с микроокружением, в котором существовали эти клетки до помещения их в условия *in vitro*; 2) генетические факторы, связанные, как с генетическими различиями между донорами, так и, возможно, с изначальной генетической предрасположенностью конкретных линий МСК к цитогенетической нестабильности (71).

Несмотря на то, что в МСК уровень цитогенетической нестабильности ниже, чем в ЭСК, проблемы в оценке этой нестабильности существуют. Есть допустимый критерий только для клеточных линий, имеющих клональные хромосомные перестройки (72–74). Тем не менее, в ряде линий выявляется значительная хромосомная нестабильность, связанная с неклональными перестройками (63, 64, 67), которая может при продолжении культивирования обеспечить промежуточные этапы канцерогенеза (75). Также показано, что неклональные перестройки в процессе культивирования могут перейти в клональные aberrации (76). Многие данные, подтверждающие цитогенетическую гетерогенность МСК, свидетельствуют о том, что количество некоторых хромосомных нарушений в процессе длительного культивирования может либо увеличиваться, либо уменьшаться, либо совсем исчезать, что, возможно, связано с негативной селекцией (64, 67, 76–78). По-видимому, судьба цитогенетических нарушений в процессе длительного культивирования определяется степенью адаптивности конкретного хромосомного изменения. Тем не менее, вопросы о цитогенетической нестабильности весьма актуальны, особенно, при использовании МСК в биомедицинских исследованиях. Для понимания цитогенетических процессов в популяциях МСК человека необходимы исследования, анализирующие динамику кариотипических изменений в процессе длительного

культивирования, с учетом и сроков репликативного старения. Исследование динамики кариотипической изменчивости в процессе длительного культивирования позволит, в частности, выявить возможную предрасположенность некоторых МСК к генетическим нарушениям. Причем, необходимо исследовать как частоту возникновения клональных, так и неклональных хромосомных aberrаций, возникающих в процессе культивирования.

Несмотря на большое количество положительных эффектов при введении МСК пациентам для лечения некоторых заболеваний, есть и данные, свидетельствующие о возможности их влияния на опухолевый рост и метастазирование вследствие возникновения нежелательных дифференцировок, возникающих в связи с пластичностью МСК при трансплантациях. В частности, нежелательная дифференцировка трансплантированных МСК может способствовать подавлению противоопухолевого иммунного ответа и созданию новых кровеносных сосудов, которые могут способствовать росту опухоли и метастазированию. Учитывая это, необходимо фокусировать исследования при доклинических испытаниях на длительных наблюдениях за МСК, трансплантированных животным (79). Эта точка зрения согласуется с нашими рассуждениями о необходимости длительного культивирования мезенхимных стволовых клеток для выявления их предрасположенности к генетической нестабильности. Последнее направление исследований в наших работах продолжается и существенно расширяется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каталог Всесоюзной коллекции клеточных культур, под ред. Г.П. Пинаева. Ленинград «Наука», 1991. 119 с.
2. Каталог Российской коллекции клеточных культур, под ред. Г.П. Пинаева, Г.Г. Полянской. Санкт-Петербург-Омск: ОмГПУ. Биологическая серия, вып.5 (на русском и английском яз.), 1999. 429 с. Санкт-Петербург (переиздание на русском яз.), 2004. 314 с.
3. Биология клетки в культуре, под ред. А.С.Трошина. Ленинград «Наука», 1984. 280 с.
4. Методы культивирования клеток, под ред. Г.П. Пинаева. Ленинград, «Наука», 1988. 313 с.
5. **Мамаева С.Е.** Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. Москва, Научный мир, 2002. 236 с.

6. Методы культивирования клеток, под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой. Санкт-Петербург, Изд-во Политехнического ун-та, 2008. 278 с.
7. Животная клетка в культуре, под ред. Л.П. Дьяконова. Москва, Спутник, 2009. 656 с.
8. **Пинаев Г.П., Блинова М.И., Николаенко Н.С., Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Шарлаимова Н.С., Шубин Н.А.** Учебное пособие «Клеточная биотехнология». СПб: Изд-во Политехнического ун-та, 2012. 206 с.
9. Human and animal cell lines catalogue, editors: V.Parodi, O Aresu, A. Manniello, P. Romano. Interlab Project, Milano. 1993. 445 p.
10. **Hay R.J, Reid Y.A, McClintock P.R, Chen T.R, Masy M.L.** Cell line and their role in cancer research. J. Cell.Biochem.Suppl., 1996, 24: 107–130.
11. **Пинаев Г.П.** Клеточные культуры в фундаментальных и прикладных исследованиях. Сб. «Методы культивирования клеток». Санкт-Петербург, Изд-во Политехнического ун-та. 2008: 7–22.
12. **Пинаев Г.П., Полянская Г.Г.** Создание и развитие Российской коллекции клеточных культур человека, животных и растений. Сб. «Клеточные культуры» (информ. бюлл.), 2010, 26: 3–61.
13. **Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вишняков И.Е.** Микоплазмы в биологии и медицине начала XXI века. СПб: «Наука». 2016. 334 с.
14. **Ефремова Т.Н.** Контаминация клеточных линий микроорганизмами. В сб. «Методы культивирования клеток». СПб. Изд-во Политехн. Ун-та, 2008: 228–236.
15. **Uphoff C.C., Drexler H.G.** Detection of mycoplasma contamination. Methods Mol. Biol. 2013, 946: 1–13.
16. **Uphoff C.C., Gignac S.M., Drexler H.G.** Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. J. Immunol. Methods. 1992, 149(1): 43–53.
17. **Garner C.M., Hubbard L.M., Chakraborti P.R.** Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. Br. J. Biomed Sci. 2000, 57(4): 295–301.
18. **Dvorakova H., Valicek L., Reichelova M.** Detection of mycoplasma contamination in cell cultures and bovine sera. Vet. Med. – Czech. 2005, 50 (6): 262–268.
19. **Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И.** Хромосомы человека. Москва, Медицина. 1982. 264 с.

20. **Мамаева С.Е.** Методы анализа культивируемых клеток. Сб. «Методы культивирования клеток». Ленинград. Наука. 1988: 78–98.
21. **Маргулис Б.А.** Определение видовой специфичности культивируемых клеток с помощью изоферментного анализа. Сб. «Методы культивирования клеток», 1988, Ленинград, Наука. 1988: 98–103.
22. **Мамаева С.Е.** Цитогенетика клеток в культуре. Сб. «Биология клетки в культуре». Ленинград, Наука. 1984: 195–234.
23. **Freshney R.I.** Culture of Animal cells. USA, Alan R. Liss, Inc., New York, 1987: 207–214.
24. ATCC American type culture collection. Cell lines and hybridomas, editors: R.J. Hay, J. Caputo, T.R. Chen, M. Masy, P. McClintock, Y. Reid. USA. 8 ed. 1994. 638 с.
25. **Фридлянская И.И.** Постоянные клеточные линии, дифференцирующиеся *in vitro*. Сб. «Биология клетки в культуре». Ленинград. Наука. 1984: 50–100.
26. **Фридлянская И.И.** Получение моноклональных антител (гибридомная технология). Сб. «Методы культивирования клеток». Ленинград, Наука. 1988: 194–205.
27. **Мамаева С.Е.** Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология. 1996, 38 (8): 787–814.
28. **Полянская Г.Г.** Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях (Обзор). Успехи совр. биол. 2000, 120 (6): 529–539.
29. **Poljanskaya G.G., Vakhtin Y.B.** The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system. Tsitologija. 2003, 45 (2): 115–131.
30. **Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н.** Влияние *Mycoplasma salivarium* в отсутствие и присутствии L-аргинина на кариотипическую изменчивость в клеточной линии фибробластов кожи индийского мунджака при длительном культивировании. Цитология. 2010, 52 (12): 997–1004.
31. **Полянская Г.Г., Кольцова А.М.** Влияние субстрата, включающего белки внеклеточного матрикса, на кариотипическую изменчивость в двух клеточных линиях фибробластов кожи индийского мунджака. Цитология. 2013, 55 (7): 463–471.
32. **Кольцова А.М., Гордеева О.Ф., Крылова Т.А., Лифанцева Н.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Сравнительные характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a. Онтогенез. 2011, 42 (4): 249–263.

33. **Кольцова А.М., Воронкина И.В., Гордеева О.Ф., Зенин В.В., Лифанцева Н.В., Мусорина А.С., Смагина Л.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Разработка новой бесфидерной системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании. *Цитология*. 2012, 54 (8): 637–651.
34. **Кольцова А.М., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Получение и характеристика новой сублинии эмбриональных стволовых клеток человека SC6-FF в аллогенной бесфидерной системе культивирования. *Цитология*. 2016, 58 (7): 507–516.
35. **Lifantseva N., Koltsova A., Krylova T., Yakovleva T., Poljanskaya G., Gordeeva O.** Expression Patterns of Cancer-Testis Antigens in Human Embryonic Stem Cells and Their Cell Derivatives Indicate Lineage Tracks. *Stem Cells Int*. 2011, ID 795239:13.
36. **Полянская Г.Г.** Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. *Цитология*. 2014, 56 (10): 697–707.
37. **Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytother*. 2006, 8: 315–317.
38. **Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R.** Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*. 2010, 98: 93–107.
39. **Gattazzo F., Urciuolo A., Bonaldo P.** Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1840: 2506–2519.
40. **Choi J.S., Lee B.J., Park H.Y., Song J.S., Shin S.C., Lee J.C., Wang S.G., Jung J.S.** Effects of donor age, long-term passage culture, and cryopreservation on tonsil-derived mesenchymal stem cells. *Cell Physiol. Biochem*. 2015, 36: 85–99.
41. **Darnell M., O'Neil A., Mao A., Gu L., Rubin L.L., Mooney D.J.** Material microenvironmental properties couple to induce distinct transcriptional programs in mammalian stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2018, 115: E8368–E8377.
42. **Niedernhofer L.J., Gurkar A.U., Wang Y., Vijg J., Hoeijmakers J.H.J., Robbins P.D.** Nuclear Genomic Instability and Aging. *Annu Rev Biochem*. 2018, 87: 295–322.
43. **Нимирицкий П.П., Сагарадзе Г.Д., Ефименко А.Ю., Макаревич П.И., Ткачук В.А.** Ниша стволовой клетки. *Цитология*. 2018, 60 (8): 575–586.

44. **Caplan A.I., Dennis J.E.** Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.* 2006, 98: 1076–1084.
45. **Phinney D.G., Prockop D.J.** Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells.* 2007, 25: 2896–2902.
46. **Carvalho M.M., Teixeira F.G., Reis R.L., Sousa N., Salgado A.J.** Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2011, 6: 221–228.
47. **Guiducci S., Manetti M., Romano E., Mazzanti B., Ceccarelli C., Dal Pozzo S., Milia A.F., Bellando-Randone S., Fiori G., Conforti M.L., Saccardi R., Ibbá-Manneschi L., Matucci-Cerinic M.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells from early diffuse systemic sclerosis exhibit a paracrine machinery and stimulate angiogenesis *in vitro*. *Ann. Rheum. Dis.* 2011, 70: 2011–2021.
48. **Gruenloh W., Kambal A., Sondergaard C., McGee J., Nacey C., Kalomoiris S., Pepper K., Olson S., Fierro F., Nolte J.A.** Characterization and *In Vivo* Testing of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Tissue Eng Part A.* 2011, 17: 1517–1525.
49. **Huang Y.C., Leung V.Y., Lu W.W., Luk K.D.** The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell-based regeneration of intervertebral disc. *Spine J.* 2013, 13: 352–362.
50. **Luo J., Zhao X., Tan Z., Su Z., Meng F., Zhang M.** Mesenchymal-like progenitors derived from human embryonic stem cells promote recovery from acute kidney injury via paracrine actions. *Cytotherapy.* 2013, 15: 649–662.
51. **Ando Y., Matsubara K., Ishikawa J., Fujio M., Shohara R., Hibi H., Ueda M., Yamamoto A.** Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. *Bone.* 2014, 61: 82–90.
52. **Hendijani F., Javanmard Sh.H., Rafiee L., Sadeghi-Aliabadi H.** Effect of human Wharton's jelly mesenchymal stem cell secretome on proliferation, apoptosis and drug resistance of lung cancer cells. *Res. Pharm. Sci.* 2015a, 10: 134–142.
53. **Hendijani F., Javanmard S.H., Sadeghi-aliabadi H.** Human Wharton's jelly mesenchymal stem cell secretome display antiproliferative effect on leukemia cell line and produce additive cytotoxic effect in combination with doxorubicin. *Tissue Cell.* 2015b, 47: 229–234.

54. **Danieli P., Malpasso G., Ciuffreda M.C., Gnechi M.** Testing the paracrine properties of human mesenchymal stem cells using conditioned medium. *Methods Mol. Biol.* 2016, 1416: 445–456.
55. **Julianto I., Rindastuti Y.** Topical delivery of mesenchymal stem cells "secretomes" in wound repair. *Acta Med. Indones.* 2016, 48: 217–220.
56. **Liang X., Zhang L., Wang S., Han Q., Zhao C.** Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring mir-125a. *J. of Cell Science.* 2016, 129(11): 2182–2189.
57. **Vulcano F., Milazzo L., Ciccarelli C., Eramo A., Sette G., Mauro A., Macioce G., Martinelli A., La Torre R., Casalbore P., Hassan H.J., Giampaolo A.** Wharton's jelly mesenchymal stromal cells have contrasting effects on proliferation and phenotype of cancer stem cells from different subtypes of lung cancer. *Exp. Cell Res.* 2016, 345: 190–198.
58. **Zachar L., Bačenková D., Rosocha J.** Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *J. Inflamm. Res.* 2016, 9: 231–240.
59. **Liu Y., Wang H., Wang J.** Exosomes as a novel pathway for regulating development and diseases of the skin. *Biomed Rep.* 2018, 8: 207–214.
60. **Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. *Цитология.* 2012, 54 (1): 5–16.
61. **Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Сравнительные характеристики линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга и мышцы конечности раннего эмбриона человека. *Цитология.* 2014, 56 (8): 562–573.
62. **Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Полянская Г.Г.** Характеристика клеточных сфероидов, полученных из линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и зачатка конечности раннего эмбриона человека. *Цитология.* 2015, 57 (7): 480–490.
63. **Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Кольцова А.М., Кропачева И.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Получение и характеристика неиммортизированных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста. *Цитология.* 2016, 58(11): 850–864.

64. **Крылова Т.А., Кольцова А.М., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Характеристика двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека. *Цитология*. 2017, 59 (5): 315–327.

65. **Крылова Т.А., Мусорина А.С., Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Получение и сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из крайней плоти двух доноров одного возраста». *Цитология*. 2018, 60 (4): 262–272.

66. **Кольцова А.М., Зенин В.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Характеристика новой линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эмбриональных стволовых клеток человека. *Цитология*. 2015, 57 (11): 761–770.

67. **Кольцова А. М., Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Турилова В. И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Динамика свойств двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека, при длительном культивировании. *Цитология*. 2017, 59 (9): 574–587.

68. **Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенной из пульпы молочного зуба человека. *Цитология*. 2018, 60 (12): 955 –968.

69. **Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.** Характеристика неиммортилизованной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардальной жировой ткани человека. *Цитология*. 2019, 61 (в печати).

70. **Полянская Г.Г., Мусорина А.С.** Коллекция культур клеток позвоночных: создание, деятельность, каталог. СПб. Изд-во Политехнического ун-та, 2018, 184 с.

71. **Полянская Г.Г.** Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Сб. «Клеточные культуры», 2018, вып. 34: 3–18.

72. **Meisner L.F., Johnson J.A.** Protocols for cytogenetics studies of human embryonic stem cells. *Methods*. 2008, 45: 133–141.

73. An international system for human cytogenetic nomenclature, editors: I.G. Shaffer, M.L. Slovak, L.J. Campbell. Basel: S. Karger. 2009. 138 pp.

74. **Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Büscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Mačiulaitis R., Palomäki T., Schneider**

C.K., Sensebé L., Tachdjian G., Tarte K., Tosca L., Salmikangas P. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies--bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytother.* 2013, 15: 753–759.

75. **Borgonovo T., Vaz I.M., Senegaglia A.C., Rebelatto C.L., Brofman P.R.** Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2014, 36: 202–207.

76. **Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D., Miloso M., Redondo J., Riva G., Baronchelli S., Dalprà L., Tredici G.** From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of *in vitro* cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2012, 3: 47. Doi: 10.1186/s13287-012-1138-8.

77. **Kim J.A., Im K.O., Park S.N., Kwon J.S., Kim S.Y., Oh K., Lee D.S., Kim M.K., Kim S.W., Jang M., Lee G., Oh Y.M., Lee S.D., Lee D.S.** Cytogenetic heterogeneity and their serial dynamic changes during acquisition of cytogenetic aberrations in cultured mesenchymal stem cells. *Mutat. Res.* 2015, 777: 60–68.

78. **Nikitina V., Astrelina T., Nugis V., Ostashkin A., Karaseva T., Dobrovolskaya E., Usupzhanova D., Suchkova Y., Lomonosova E., Rodin S., Brunchukov V., Lauk-Dubitskiy S., Brumberg V., Machova A., Kobzeva I., Bushmanov A., Samoilo A.** Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. *PLoS One.* 2018, 13(2):e0192445. doi: 10.1371/journal.pone.0192445.

79. **Volarevic V., Markovic B.S., Gazdic M., Volarevic A., Jovicic N., Arsenijevic N., Armstrong L., Djonov V., Lako M., Stojkovic M.** Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int. J. Med. Sci.* 2018, 15: 36–45.

**THE DEVELOPMENT OF THE COLLECTION OF CELL CULTURES OF VERTEBRATES,
CREATED BY PROFESSOR G. P. PINAEV**

G. G. Poljanskaya

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg

poljansk@incras.ru

In the article devoted to the memory of Honored scientist of the Russian Federation, Professor G. Pinaev, a brief historical background on the creation of the Russian collection of cell cultures

(RCCC), the founder and coordinator of which he was. The principles of work of RCCC are described. The versatile activity of a collection of cultures of cells of vertebrates (CCCV) of Institute of Cytology of RAS which was the Central Bank of all-Union (Russian) collection of cell cultures is presented.

Key words: Russian cell cultures collection, Collection cell cultures of vertebrate, passport collection cell line, karyotypic variability, hybridomas, embryonic stem cells, mesenchymal stem cells.

ПРОДОЛЖЕНИЕ НАУКИ И ЖИЗНИ – ПЯТЬ ЛЕТ БЕЗ ГЕОРГИЯ ПЕТРОВИЧА ПИНАЕВА

О. А. Петухова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

petukhova@yandex.ru

Статья посвящена памяти Георгия Петровича Пинаева. Описываются некоторые события из жизни сотрудников Отдела клеточных культур ИНЦ РАН, имевшие место во время экспедиций на Беломорскую биологическую станцию «Картеш». Приводятся результаты развития одного из направлений научной работы, основы которого были заложены Георгием Петровичем.

Ключевые слова: *Asterias rubens*, регенерация, пролиферация, целоמוциты, целомический эпителий, культивирование клеток, протеомика.

Вот уже пять лет мы живем без Георгия Петровича Пинаева, заведующего Отделом клеточных культур. В текущем 2019 году мы бы праздновали его 90-летие. Вспоминаются события десятилетней давности, когда мы с упоением готовились отметить его 80-летие. Участие в торжествах принимал весь отдел и весь институт, и много гостей из Санкт-Петербурга и других городов России и зарубежья. Приветствия, речи, танцы, балет, поставленный его ученицей Дашей Ивановой, белые девушки и черные юноши. И апофеоз – в строгой тайне приготовленное па-де-де в исполнении Георгия Петровича и Наташи Баландиной. Пинаев – премьер, в белой сорочке и черных трико, классические позы и танец, и поддержки.

С тех пор много изменений произошло в Отделе клеточных культур и в самом Институте цитологии. У нас дважды сменился директор института, ушел председатель Диссертационного совета Александр Львович Юдин, Отдел клеточных культур возглавила Галина Георгиевна Полянская, не стало одной из первых сотрудниц отдела Татьяны Алексеевны Крыловой. Основные направления деятельности, основы которых заложил Георгий Петрович, продолжают в настоящее время развиваться, чему он был бы очень рад. К активно развивающемуся направлению относятся исследования, проводимые на морских беспозвоночных, связанные с экспедициями на Беломорскую биологическую станцию ЗИН РАН на мысе Картеш. Эти исследования также не прекращаются. Совсем немного повторюсь и расскажу, куда мы продвинулись за эти 5 лет.

События первых лет экспедиции, начиная с 1995 года, были в некоторой степени описаны в статье, посвященной памяти Пинаева, в сборнике «Клеточные культуры», который был издан в 2014 году (1). Общая научная задача была сформулирована следующим образом: создание культур клеток морских беспозвоночных (эти работы были начаты на Дальнем Востоке Миральдой Ивановной Блиновой) и характеристика защитных реакций морской звезды в ответ на травму. Работа велась по нескольким направлениям. На Белом море занимались культивированием клеток бластемы пескожила, *Arenicola marina*. Ирина Владимировна Воронкина работала на морской звезде *Asterias rubens*, анализировала состав целомической жидкости в процессе регенерации звезды, получала фракции целомической жидкости с помощью метода гель-хроматографии. Анализ влияния фракций целомической жидкости на клетки млекопитающих и беспозвоночных выполняли в течение нескольких лет ряд сотрудников: Татьяна Станиславовна Горячая, Галина Анатольевна Сакута, Александра Феликсовна Аре, Наталья Сергеевна Николаенко и Наталья Сергеевна Шарлаимова. Протестировали несколько клеточных линий, которые могли бы расти в термостате без стабилизации среды атмосферой CO₂. Остановились на линии фибробластов подкожной соединительной ткани мыши NCTC, клон 929. В соответствии с влиянием на клетки выделили фракцию целомической жидкости, стимулирующую адгезию, фракцию, стимулирующую пролиферацию клеток, и цитотоксическую фракцию (2-4). Николай Аркадьевич Шубин вместе с Георгием Петровичем занимались замораживанием и, соответственно, размораживанием клеток целомической жидкости звезды. Критерием для оценки выживания клеток после замораживания являлась способность целоцитов к тромбообразованию. Исследование

механизмов образования тромба целомицитами морской звезды было еще одним направлением работ Георгия Петровича. Лев Николаевич Саломатин, бессменный участник первых экспедиций, обеспечивал техническую поддержку экспедиции и сбор материала. В составе экспедиции принимали однократное участие также Николай Румянцев, помогающий Г.П. Пинаеву, и Мария Даугавет, работающая с М.И. Блиновой, а также Александра Козлова, выполняющая дипломную работу под моим руководством, автор первой публикации по клеточному составу целомической жидкости морской звезды.

Я присоединилась к тематике в 2000 году и первые три года работала с пескожилком, пробуя те или иные молекулярные подходы. После периода выбора объекта и обсуждений все члены экспедиции сосредоточились на работе с морской звездой *A. rubens*. Определились с экспериментальной моделью. Восстановление пула целомицитов - наша экспериментальная модель физиологической регенерации. Собственные наблюдения, а также исследования других авторов показали, что однократный надрез луча *A. rubens*, связанный с незначительной потерей целомической жидкости, приводит через 6 часов к увеличению числа клеток в целомической полости в 3-4 раза (5). Целомическая полость – вторичная полость тела, выстланная целомическим эпителием, функционирует как внутренняя циркуляторная система, окружающая все внутренние органы. Требовалось выяснить, откуда появляются целомициты в целомической полости. А также объяснить результаты молекулярных исследований, например, объяснить присутствие в экстрактах целомицитов белков, узнаваемых антителами против белков-регуляторов клеточного цикла – ретинобластомы и циклина Д3. И, конечно, поработать в направлении создания культур клеток разных тканей морской звезды. Но сначала простые вопросы, знакомство с объектом, характеристика клеточного состава целомической жидкости и других тканей, получение первичных культур клеток разных тканей, характеристика пролиферативной активности клеток разных тканей *in vivo* и *in vitro*.

Особенность звезды, как и других представителей иглокожих, заключается в способности к регенерации утраченных частей тела и органов. В литературе рассматриваются два процесса, обеспечивающие регенерацию иглокожих: 1) миграция клеток, их дедифференцировка и/или трансдифференцировка; 2) активность стволовых клеток. Участие процесса дедифференцировки в регенерации иглокожих убедительно показано на гистологическом и ультраструктурном уровнях (5, 6). Присутствие стволовых клеток и их вклад в регенерацию

иглокожих исследован недосаточно (7, 8), хотя экспрессия ряда маркеров стволовых клеток у иглокожих доказана (9, 10). Предполагается, что у морских звезд регенерация протекает в основном по типу морфаллаксиса, когда клетки существующих тканей мигрируют к месту заживления, дедифференцируются и/или трансдифференцируются, причем деление клеток может отсутствовать. В качестве таких тканей-депо рассматривались целомический эпителий (11), эпидермальный слой шнура радиального нерва (12), тидемановы тельца и аксиальный орган (13).

Нами был исследован состав популяций клеток целомической жидкости и целомического эпителия морской звезды *A. rubens* после гистологического окрашивания азур - эозином, предложена собственная классификация клеток, причем состав суспензий клеток целомического эпителия был охарактеризован впервые. Выявлены морфологические типы клеток, общие для целомического эпителия и целомической жидкости. Это крупные агранулоциты и гранулоциты и малые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, характеризующиеся дискретно окрашенным ядром (эпителиоциты 1-го типа). Выявлены изменения доли именно этих клеток в составе целомического эпителия и целомической жидкости, вызванные потерей значительного количества целомической жидкости. Более того, была обнаружена новая субпопуляция клеток, слабо связанных с целомическим эпителием, обогащенная на 50 % малыми эпителиоцитами 1 типа, и показана возможность миграции малых эпителиоцитов-1 из состава эпителия. Следовательно, в целомическом эпителии присутствует значительный пул малодифференцированных клеток, готовых к выходу в целомическую полость и к дальнейшей дифференцировке (14, 15). Проллиферативной активностью характеризуется очень незначительная доля малых эпителиоцитов 1 типа, а также малые эпителиоциты 2 типа, клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением меньшего размера и плотно окрашенным ядром.

Были отработаны методы выделения и культивирования клеток различных тканей, при этом мы опирались на опыт наших коллег. Методика выделения ткани целомического эпителия от начала и до конца разработана Н.С. Шарлаимовой. Выяснили, что малые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением сохраняют пролиферативную активность в условиях культуры по крайней мере 2 месяца (16).

В поисках субстрата для культивирования клеток были охарактеризованы типы клеток целомической жидкости и целомического эпителия, способные прикрепляться к разным

субстратам и распластываться на них. В этих тканях мы выявили морфологически сходные типы клеток, два из которых являются вероятными кандидатами на роль клеток-предшественников целоцитов – целоцитоподобные и малые эпителиоциты с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Важными оказались результаты, демонстрирующие обогащение популяции прикрепленных клеток целомического эпителия малыми клетками при посадке на ламинин и сохранение жизнеспособности эпителиоцитов при культивировании на ламинине в течение 1 месяца (17).

Таким образом, наиболее перспективным объектом для исследований оказался целомический эпителий, а морфология малых эпителиоцитов, их пролиферативная активность *in vivo* и *in vitro*, способность к миграции из состава эпителия в целом говорит о том, что эти клетки обладают характеристиками стволовых клеток или, по крайней мере, клеток-предшественников.

После ухода Георгия Петровича в исследования принимают участие четыре человека: Н. С. Шарлаимова, Д.Е. Бобков, С. Шабельников и О.А. Петухова. У каждого есть своя любимая тема и каждый выполняет необходимую часть общей работы. Иногда в экспедиции участвует Николай Шуйский, бывший студент О.И. Подгорной. Работы в 2015-2017 годах проводились в рамках проекта РФФИ «Пролиферирующие клетки морской звезды *A. rubens* L. *in vivo* и *in vitro*».

Работа была направлена на исследование морфологических характеристик и показателей пролиферативной активности клеток, принимающих участие в восстановлении клеточного состава целомической жидкости морской звезды после кровопотери. Предположение, что эти клетки выполняют роль клеток-предшественников, способных в процессе регенерации восстанавливать ткани и органы всего организма морской звезды, подтверждается результатами наших исследований. В частности, нами были выявлены клетки, подобные эпителиоцитам 1-го и 2-го типов в тканях аксиального органа, тидемановых тельцах, пилорических железах и околоанальных кожных выростах морской звезды. В желудке и ректальных выростах обнаружены особые, характерные для тканей этих органов клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, морфологически отличающиеся от клеток других органов.

Существование в разных органах морской звезды малодифференцированных клеток, морфологически сходных с клетками целомического эпителия и целомической жидкости,

говорит о возможности обмена клетками между этими органами и свидетельствует в пользу существования общих клеточных источников регенерации. Желудок, по-видимому, имеет независимые клеточные источники восстановления тканей.

В этих же органах пролиферативная активность выявлена в малых клетках с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, подобных клеткам целомического эпителия. Помимо малых клеток, пролиферативную активность проявляют также более крупные клетки, ядерно-цитоплазматическое отношение которых ниже 0,7. Эти клетки характеризуются специфичной структурой тубулинового цитоскелета, выявляемой в виде тяжей после окраски антителами против альфа-тубулина. Желудок и ректальные выросты характеризуются собственным типом пролиферирующих клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, а также содержат пролиферирующие клетки, подобные крупным клеткам с видимой цитоплазмой и тяжом тубулина, характерным для пролиферирующих клеток других тканей (18).

Таким образом, в разных органах морской звезды выявлено 4 типа пролиферирующих клеток, 3 типа клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и один тип более крупных клеток с видимой цитоплазмой.

Существование значительного пула мелких клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением в целомическом эпителии не является уникальным свойством *A. rubens*. Морфологически подобные клетки целомического эпителия, способные пролиферировать, были обнаружены у родственного вида, дальневосточной звезды *A. amurensis* (19, 20).

Все последующие научные достижения опубликованы полностью в отчетах РФФИ, частично в докладах на конференциях, частично подготовлены к печати. Результаты протеомного анализа целомической жидкости опубликованы в *Journal Experimental Biology* (21).

Пониманию процесса восстановления популяции целомацитов и общим представлениям о биологии клеток звезды способствовало использование методов ультраструктурного и иммунофлуоресцентного анализа. Сканирующая электронная микроскопия выявила неравномерность распределения малых эпителиоцитов на поверхности целомического эпителия аборальной части луча звезды. Ультраструктурный анализ, выполненный нашими коллегами из Лаборатории морфологии клетки, Ольгой Алексеевной Быстровой и Мариной Георгиевной Мартыновой установил мозаичный характер строения целомического эпителия, выявил малые клетки в значительном количестве в составе эпителия, а также в слое

соединительной ткани. Крупные агранулоциты и малые эпителиоциты в составе эпителия демонстрируют фенотип мобильных клеток и выявляются на границе целомического эпителия и целома. Эти результаты в комбинации с данными о миграции клеток в экспериментах с условно-интактным целомическим эпителием и с общей моделью исследования – восстановление пула клеток целомической жидкости после полного удаления целомической жидкости из целома - свидетельствуют в пользу миграции крупных агранулоцитов и малых эпителиоцитов из состава целомического эпителия. Электронно-микроскопический анализ позволил также разделить крупные агранулоциты целомической жидкости на два морфологических типа. С помощью иммунофлуоресцентного анализа был выявлен специфический тип гранулоцитов, содержащих гранулы, окрашиваемые антителами против актинина 4. Такие гранулоциты встречались в разных тканях звезды, их пропорция менялась в ответ на травму. Удалось проследить последовательные стадии созревания актинин 4-содержащих гранулоцитов.

На пути постижения механизмов, контролирующих пролиферативную активность клеток *A. rubens*, выявлено, что в ядерных экстрактах тканей звезды присутствует несколько ДНК-белковых комплексов, взаимодействующих с консенсусной последовательностью ДНК, узнаваемой транскрипционными факторами семейства E2F. Взаимодействие факторов транскрипции и белков-регуляторов, в том числе циклина D и ретинобластомы, с E2F белком опосредует пролиферативную активность клеток. Памятуя об экспрессии белка-гомолога циклина D3 в экстрактах целомоцитов, была исследована локализация этого белка в гетерогенных популяциях целомоцитов, целомического эпителия и тидемановых телец, выявлены особенности его локализации в клетках и исследована динамика появления клеток с различной локализацией циклина под влиянием травмы и показана возможность транспорта этого белка в ядро клеток.

Первоначальные успехи культивирования пока что затормозились. За прошедшее время удалось установить поведение разных типов клеток (не всех) при культивировании и получить моделирование нескольких процессов, происходящих *in vivo*, например, образование синцитиев.

Что касается модели тромбообразования, показано вовлечение тропомиозина, запасенного в виде белковых агрегатов в клетках, в организацию цитоскелетных структур, необходимых

для осуществления целоμοцитами кальций-зависимых реакций, приводящих к агрегации клеток и сокращению клеточного сгустка (клоттинг).

Прижизненные наблюдения за процессом агрегации целомоцитов под действием кальция с помощью метода конфокальной микроскопии показали, что активация целомоцитов путем добавления кальция не сопровождается входом кальция в клетки, а ингибиторы кальциевых каналов широкого спектра действия не влияют на процесс кальций-зависимой агрегации клеток. Прижизненные наблюдения позволили выявить различные функции клеток целомиической жидкости, в частности, выявлен особый тип целомоцитов, не принимающих участие в формировании сетей в реакции тромбообразования.

Значительный прогресс в исследовании, приближающий нас к пониманию молекулярных механизмов регенерации, был достигнут в результате протеомного анализа бесклеточной целомиической жидкости методом LC – MALDI масс-спектрометрии. Были идентифицированы белки целомиической жидкости, потенциально способные принимать участие в регенерации и защитных реакциях иглокожих, а также выявлены травмоспецифичные белки целомиической жидкости.

Сравнительный протеомный анализ целомоцитов, клеток целомиического эпителия и субпопуляции целомиического эпителия, обогащенной малодифференцированными клетками, позволил выявить белковые маркеры для каждой группы клеток и потенциальные регуляторы пролиферации. В целом, результаты протеомного анализа дают в руки инструменты для детального анализа молекулярных механизмов, участвующих в осуществлении защитных реакций у морской звезды.

На основе полученных результатов была сформулирована рабочая гипотеза о закономерностях восполнения пула циркулирующих клеток целомиической жидкости. Суммируя, можно сказать, что некоторые типы целомоцитов происходят из целомиического эпителия. Новым является представление о пуле маргинальных целомоцитов, клеток, запасенных на поверхности целомиического эпителия, готовых войти в циркуляцию. Маргинальный пул целомоцитов реализуется в быстрой реакции на физиологические раздражители, то есть на кормление, и на легкие травмы. Малые недифференцированные клетки целомиического эпителия участвуют в восполнении целомоцитов после более сильных повреждений, связанных с потерей большой массы целомоцитов. Эти клетки хранятся на поверхности или внутри целомиического эпителия в избытке. Их происхождение остается

неясным, но, по нашему мнению, их появление в целом не является следствием прямой трансдифференцировки ресничных клеток на поверхности целомического эпителия. Мы вовсе не отрицаем участие процессов трансдифференцировки, но склонны считать, что эти клетки могут возникать в результате временной активности стволовых клеток.

С помощью протеомного анализа были выявлены общие и уникальные белки для трех клеточных пулов и подтвержден промежуточный статус клеток на границе целомического эпителия и целома. Были определены потенциальные участники, которые могут быть вовлечены в процессы регенерации. Работа обеспечивает основу для дальнейшего изучения клеточных и молекулярных механизмов регенерации.

Задачи будущих исследований заключаются в поисках подтверждений или опровержений наших представлений о клеточных участниках процесса регенерации у *A. tubens*. Важно получить надежные молекулярные маркеры различных типов клеток, чтобы иметь возможность проследить за процессами дифференцировки/трансдифференцировки, активностью стволовых клеток, пролиферативной активностью. Будет проводиться протеомный анализ (LC – MALDI) популяций клеток, обогащенных определенными типами клеток, полученными в результате фракционирования клеток в градиентах плотности Перколла и белков субклеточных фракций – мембранных и ядерных, выделенных из контрольных и травмированных животных. Мечтаем: охарактеризовать транскриптомы обогащенных фракций клеток, особенно малодифференцированных; проводить прижизненные наблюдения за процессами дифференцировки/трансдифференцировки; установить причины блока пролиферации в клетках звезды и многое другое. Все это реально решаемые задачи в нашем коллективе. Было бы только финансирование.

Пять лет без Георгия Петровича. Пришлось осознать, что никто не стоит между нами и всем остальным миром. И приходится самим добывать деньги на работу, участвовать в стахановской гонке за импакт-факторами. И все вокруг утверждает, что вовсе и не мы все решаем, а уже следующие поколения. И не стоит думать, а что было бы, если бы Георгий Петрович был жив.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Петухова О.А.** Беломорская экспедиция: наука и жизнь. Информационный бюллетень АСКК Института цитологии РАН «Клеточные культуры» СПб, Изд-во СПбГПУ. Политехн. Ун-та. Ред. М.С. Богданова, Полянская, А.М. Кольцова, 2014, вып. 30:12-22.
2. **Воронкина И.В., Шарлаимова Н.С., Блинова М.И., Пинаев Г.П.** Изменение пролиферативной и миграционной активности соматических клеток млекопитающих под действием фракций целомической жидкости регенерирующей морской звезды зависит от присутствия матриксных металлопротеиназ. Цитология, 2003.45:861.
3. **Voronkina, I.V., Protasov, M.V., Galibin, O.V., Pinaev, G.P., Prokopchuk, S.N., Solovieva, M.A.** Studying the influence of protein fractions of regenerating sea star *Asterias rubens* coelomic liquid on process of wound healing on deep wound model at rats. Tsitologiya, 2004, 6, 904.
4. **Holm K., Voronkina I, Sharlaimova N. Thorndyke M, Hernroth B.** Functional properties of proteins from the coelomic fluid of the wounded sea star *Asterias rubens* (L). Journal of Invertebrate Pathology 2010, 105: 197–199.
5. **García-Arrarás J.E., Dolmatov I.Yu.** Echinoderms: Potential Model Systems for Studies on Muscle Regeneration. Curr Pharm Des, 2010, 16: 942–955.
6. **Mashanov V.S., Garcia-Arraras J.E.** Gut regeneration in holothurians: a snapshot of recent developments. Biol Bull, 2011, 221:93–109.
7. **Rinkevich B, Matranga V. (Eds.).** Stem cells in marine organisms. Heidelberg: Springerlink, London, 2009, 367 pp.
8. **Ben Khadra Y, Sugni M, Ferrario C, Bonasoro B, Coelho AV, Martinez P, Candia Carnevali MD.** An integrated view of asteroid regeneration: tissues, cells and molecules. Cell Tiss Res, 2017, 370:13–28.
9. **Mashanov V.S., Zueva O.R., Garcia-Arraras J.E.** Expression of pluripotency factors in echinoderm regeneration. Cell Tiss Res 2015, 359: 521–536.
10. **Reinardy H.C., Emerson C.E., Manley J.M., Bodnar A.G.** Tissue regeneration and biomineralization in sea urchins: role of Notch signaling and presence of stem cell markers. PLoS ONE, 2015, 10: e 0133860.
11. **Vanden Bossche J.P., Jangoux M.** Epithelial origin of starfish coelomocytes. Nature, 1976, 261: 227–228

12. **Candia Carnevali M. D., Bonasoro F.** Microscopic overview of Crinoid regeneration. *Micr. Res. Technique*, 2001, 55 :403—426.
13. **Догель В. А.** Зоология беспозвоночных. 1975. М.: Высшая школа. 560 с.
14. **Козлова А.Б., Петухова О.А., Пинаев Г.П.** Анализ клеточных элементов целомической жидкости на ранних сроках регенерации морской звезды *Asterias rubens* L. *Цитология*, 2006, 48: 175–183.
15. **Sharlaimova N., Shabelnikov S., Petukhova O.** Small coelomic epithelial cells of the starfish *Asterias rubens* L. that are able to proliferate *in vivo* and *in vitro*. *Cell Tiss Res*, 2014, 356 (1): 83–95.
16. **Шарлаимова Н.С., Пинаев Г.П., Петухова О.А.** Сравнительный анализ поведения и пролиферативной активности в культуре клеток целомической жидкости и клеток различных тканей морской звезды *Asterias rubens* L. полученных из нормальных и травмированных животных *Цитология*, 2010, 52: 317-325.
17. **Шарлаимова Н.С., Петухова О.А.** Характеристика популяций клеток целомической жидкости и целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L., способных прикрепляться и распластываться на различных субстратах. *Цитология*, 2011, 53 :891–902.
18. **Petukhova O, Sharlaimova N, Shabelnikov S, Bobkov D, Martynova M, Bystrova O.** Small undifferentiated cells from starfish *Asterias rubens* L.: candidates to the role of progenitor cells. *Invert Surviv J*, 2018, 15:111–112.
19. **Sharlaimova N. S., Petukhova O.A.** The small cells of coelomic fluid and coelomic epithelium isolated from starfish *Asterias rubens* and *Asterias amurensis* (Echinodermata: Asteroidea): Comparative analysis of cell morphology and proliferative activity *in vivo* and *in vitro*. *Russian Journal of Marine Biology*, 2016, 42: 199–203.
20. **Шарлаимова Н.С., Петухова О.А.** Сравнительная характеристика морфологии и пролиферативной активности клеток целомической жидкости и целомического эпителия морских звезд *Asterias amurensis* и *A. rubens*. *Цитология*, 2016, 58: 720–729.
21. **Shabelnikov S.V., Bobkov D.E., Sharlaimova N.S., Petukhova O.A.** *Journal of Experimental Biology*, 2019 doi: 10.1242/jeb.198556.

**SCIENCE AND LIFE TO BE CONTINUED - FIVE YEARS WITHOUT GEORGY PETROVICH
PINAEV**

O.A. Petukhova

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, petukhova@yandex.ru

The article is dedicated to the memory of Georgy Petrovich Pinayev. Some events in the life of the staff of the Cell Cultures Department of the Institute of Cytology RAS, which took place during the expeditions to the White Sea biological station “Kartesh”, are described. The progress in one of the directions of scientific work, the foundations of which were laid by Georgy Petrovich, are presented.

Key words: *Asterias rubens*, regeneration, proliferation, coelomocytes, coelomic epithelium, cell culturing, proteomics.

**О НАУЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ПРОФЕССОРА Г.П. ПИНАЕВА:
ОТ ПОЛИМОРФИЗМА СОКРАТИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ ДО РОЛИ ЦИТОСКЕЛЕТА В
ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛА**

С. Ю. Хайтлина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

skhspp@yahoo.com

Статья посвящена краткому описанию исследований Георгия Петровича Пинаева в области биологической подвижности, от изучения физико-химических свойств белков сократительного аппарата мышц до связи белков цитоскелета с регуляторными системами клетки, внеклеточным матриксом и компонентами сигнальной системы. Приведен большой список публикаций Г.П. Пинаева и его учеников и коллег, который поможет заинтересовавшимся читателям ближе познакомиться с этими работами.

Ключевые слова: миогенез, изоформы астина, сократительные белки двустворчатых моллюсков, сократительная система кардиомиоцитов, внеклеточный матрикс, NF- κ B, α -

актинин-4, цитоплазматические мультимолекулярные белковые комплексы, тропомиозин, миозин-9.

Имя профессора Георгия Петровича Пинаева давно и прочно связано с активным внедрением в исследовательскую работу клеточных культур и клеточных технологий, организацией Коллекции клеточных культур, получением, паспортизацией и каталогизацией клеточных линий. Однако теперь уже мало кто помнит о том, что этому предшествовали, а потом сопутствовали его многолетние и тоже пионерские исследования сократительного аппарата мышц на разных стадиях его развития и формирования, перестроек сократительных структур клетки и цитоскелета и их связи с регуляторными системами клетки, внеклеточным матриксом и компонентами сигнальной системы. Настоящая статья будет посвящена этим исследованиям. В настоящее время исследования сократительных белков мышц и цитоскелета не рассматриваются как различные разделы науки, а представляют собой взаимосвязанные области биологической подвижности. Однако эта интеграция была принята только около 25-30 лет назад, и профессор Г.П. Пинаев был одним из немногих биохимиков – «мышечников» того времени, работы которых способствовали этому пониманию. Уже в первых работах Г.П. Пинаев выявил существенную разницу в физико-химических свойствах актомиозина и его составляющих, миозина и актина, выделенных на последовательных стадиях миогенеза скелетных мышц кролика. Эти результаты позволили предположить, что в ходе миогенеза происходит замена клеточных белков актомиозинового комплекса на изоформы этих белков, специфические для мышц (1-4).

Действительно, с помощью метода изоэлектрического фокусирования в различных клеточных линиях и тканях млекопитающих были обнаружены множественные изоформы актина. При этом четыре «мышечные» изоформы (α -скелетный, α -сердечный и два α -гладкомышечных актина) отличались от двух «цитоплазматических» изоформ (β - и γ -актинов) (4). Дальнейшее развитие этих исследований показало, что синтез специфических изоформ актина сопровождается их субклеточной компартментализацией, причем оба процесса регулируются факторами пролиферации и дифференцировки клеток. Изоформы актина не могут заменить друг друга, а высокий уровень синтеза экзогенных актинов приводит к изменениям в организации и морфологии клеток. Это указывает на то, что высоко консервативные актины являются функционально специализированными для тканей, в

которых они преобладают, и различие их свойств коррелирует с динамикой актиновых микрофиламентов, с одной стороны, и стабильностью миофибриллярных систем, с другой стороны (5,6). В мышечных клетках изоформы актина различаются по скорости полимеризации (7-10) и эффективности стимуляции АТФазной активности цитоплазматических миозинов (11). Кроме того, получение тщательно отобранных моноклональных антител против клеточных изоформ актина выявило различную локализацию и функциональную активность β - и γ -цитоплазматических актинов в клетках разного происхождения (12, 13). Показано, в частности, что γ -актин способствует развитию опухоли, а β -актин подавляет опухолевый рост (14). Изоформы актина играют также разную роль в регуляции клеточного цикла (15). Более подробную информацию о функциональной специфичности изоформ актина можно найти в вышеупомянутых (5,6,13) и других (16,17) обзорах.

Два других направления исследований Г.П. Пинаева и его коллег, связанные с изучением полиморфизма и динамики сократительных систем, были посвящены изучению специфики сократительных систем в разных мышцах и выявлению функциональных особенностей компонентов сократительной системы клетки – цитоскелета.

В мышечных тканях двустворчатых моллюсков было выявлено присутствие многочисленных минорных белков (18) и показана специфичность некоторых белков моллюсков (19-23). Было также показано, что препараты актина, выделенные из амбулакральных ножек морской звезды, отличаются от актина скелетных мышц кролика и, возможно, содержат специфические актин-связывающие белки (24, 25). Со временем эти первоначальные исследования привели к систематическому изучению механизмов, лежащих в основе запирающего тонуса (catch-сокращения) гладких мышц моллюсков. Впервые была обнаружена способность твитчина, титиноподобного белка гладких мышц моллюсков, взаимодействовать с Ф-актином. Было показано, что взаимодействие твитчина с актином регулируется фосфорилированием твитчина. Эти данные свидетельствуют о том, что твитчин может механически связывать тонкие и толстые филаменты запирающих мышц, моллюсков, поддерживая catch-сокращение (26). Было также обнаружено, что фосфорилирование регулирует взаимодействие с актином и миозином другого белка гладких мышц моллюсков, миорода, локализованного на поверхности толстых нитей вместе с твитчином и миозином (27). Эти результаты, а также новые данные о свойствах кальпонино-

подобного (28) и тропонино-подобного (29) белков значительно способствовали пониманию механизма catch-сокращения. Кроме того, результаты этих исследований поднимают важный вопрос о том, можно ли в модельных экспериментах использовать сократительные белки, выделенные из разных мышечных тканей (30).

Еще одной привлекательной моделью для выяснения механизмов, регулирующих сборку и функции сократительных систем, оказалась реорганизация миофибриллярного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования. Во время длительного культивирования кардиомиоцитов новорожденных крыс их сократительная система претерпевает обратимое превращение типичных миофибрилл в структуры, подобные стресс-фибриллам, что приводит к потере сократимости (31). Это превращение сопровождается продукцией внеклеточного матрикса (ECM), который обычно не продуцируется кардиомиоцитами (32-34), а также переключением изоформ актина. Таким образом, появление α -гладкомышечного актина предшествует превращению миофибрилл в структуры немышечного типа, в то время как постепенное накопление белков внеклеточного матрикса соответствует исчезновению α -актина гладких мышц. Эти результаты показывают, что усиление экспрессии α -гладкомышечного актина может быть вызвано отсутствием внеклеточного матрикса, тогда как накопление соответствующего матрикса может быть сигналом для повторной экспрессии сердечной изоформы актина (34,35).

Дальнейшие исследования культивируемых клеток подтвердили значительное влияние белков внеклеточного матрикса на перестройки актинового цитоскелета в немышечных клетках, указывающее на связь между специфическими взаимодействиями лиганда с рецептором и организацией цитоскелета (36). Исследование влияния элементов внеклеточного матрикса, фибронектина, ламинина 2/4 и антител к рецептору эпидермального фактора роста (ЭФР) при взаимодействии клеток A431 с этими лигандами показало, что ряд актин-связывающих белков фосфорилируется по тирозину, и их фосфорилированное состояние сохраняется на протяжении всего срока распластывания. Киназа фокальных контактов (PAK) фосфорилируется по тирозину при взаимодействии клеток со всеми исследованными лигандами и, в свою очередь, фосфорилирует белки-мишени (37).

Оказалось, также, что субъединица RelA / p65 фактора транскрипции NF- κ B, индуктора множества клеточных генов, взаимодействует с актин-содержащими структурами. Более того, с помощью аффинной хроматографии было продемонстрировано прямое связывание

субъединицы p65 с Ф-актином (38). Оказалось, также, что перераспределение RelA / p65 происходит как при сборке стресс-фибрилл при адгезии клеток к фибронектину, так и при разборке стресс-фибрилл в ответ на обработку клеток цитохалазином D. При этом часть пула RelA / p65 сохранялась в тесной связи с актиновыми структурами, тогда как другая часть пула RelA / p65 одновременно перемещалась в ядро (39-41).

Специальные исследования, направленные на то, чтобы выяснить, с какими белками цитоскелета взаимодействует RelA / p65, показали, что p65-субъединицы NF- κ B не только ко-локализуются в цитоплазме с актин-связывающим белком α -актинином-4, но и совместно мигрируют в ядро под действием ростовых факторов и цитохалазина D (42-44). Изоформы α -актина-4 входят в состав различных ядерных белковых комплексов, которые выполняют разные функции. Показано, что количество α -актина-4 в ядерных белковых комплексах, содержащих p65 субъединицу транскрипционного фактора NF- κ B, различно при распластывании клеток на различных белках внеклеточного матрикса. Изменение содержания α -актина-4 коррелирует с уровнем экспрессии генов-мишеней p65 – BAX и TNC, что свидетельствует о возможном участии α -актина-4 в регуляции активности транскрипционного фактора NF- κ B. Помимо ассоциации с p65 субъединицей NF- κ B α -актинин-4 входит в состав ряда других ядерных комплексов, содержащих около 50 различных белков. Идентификация этих белков методом масс-спектрометрии показала, что в их число входят белки, регулирующие экспрессию генов на уровнях транскрипции и процессинга мРНК. (45,46). Кроме того, было показано, что альфа-актинин-4 усиливает зависимую от RelA / p65 экспрессию нескольких генов, хотя актин-связывающие домены альфа-актина-4 не являются критическими для транслокации RelA / p65 в ядро и ко-активации RelA / p65-зависимой транскрипции (47). Эти исследования продолжаются в настоящее время и направлены на то, чтобы выявить регуляторную роль цитоскелета в стимуляции NF- κ B.

Необходимость связи между поверхностными рецепторами и актин-связывающими белками была также выявлена при кэппинге рецепторов эпидермального фактора роста (EGF-R) на поверхности клеток A431. Оказалось, что для формирования EGF-R кэпов необходима связь рецепторных комплексов с интактным кортикальным актином, который аккумулировался под кэпами (48). При этом актин-связывающие белки спектрин, винкулин и аннексин I перемещались вместе с EGF-R и концентрировались под плазматической мембраной в областях, где происходило образование кэпа. Однако только спектрин был локализован с

EGF-R, что свидетельствует об основной роли спектрина как белка, связывающего рецептор с микрофиламентами (49).

Хотелось бы завершить этот краткий обзор научной деятельности Г.П. Пинаева и его коллег описанием экспериментов, которые возвращают нас к механизмам сборки актина и ее регуляции. Оказалось, что в немышечных клетках тропомиозин, связанный в основном со стресс-фибриллами и пучками актиновых филаментов, также присутствует в специфических частицах («dots») (50). Стимуляция клеток факторами роста индуцирует быстрый рост ламеллоподий и филоподий, связанный с полимеризацией актина, и этот процесс сопровождается уменьшением количества частиц, содержащих тропомиозин, что позволяет предположить их возможное участие в формировании актиновых филаментов (51, 52). С помощью иммунофлуоресцентных методов, электрофореза и Вестерн-блот-анализа установлено, что изолированные частицы являются цитоплазматическими белковыми комплексами, не связанными с цитоскелетными структурами, в состав которых наряду с актином и тропомиозином входит миозин-9 (53). С помощью метода перекрестной иммунопреципитации показано, что при воздействии лизофосфатидиловой кислоты (ЛФК), вызывающей в клетках активацию сигнального пути RhoA и перестройки актинового цитоскелета, происходит быстрая разборка этих комплексов. Кроме того, ЛФК вызывает протеолитическую деградацию миозина-9, ассоциированного со структурами актинового цитоскелета. Полученные результаты свидетельствуют о том, что мультимолекулярные цитоплазматические белковые комплексы, содержащие миозин-9 и тропомиозин, принимают участие в регуляции клеточного ответа на стимуляцию ЛФК/ RhoA. Исследования в этом направлении также продолжаются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Пинаев Г.П.** Изменение формы и размера частиц актомиозина поперечнополосатых мышц в онтогенезе. Биохимия. 1965, 30 (1): 20–32.
2. **Пинаев Г.П., Хайтлина С.Ю.** 1972. Изменения физико-химических свойств актина скелетных мышц кролика в миогенезе. Журнал Эвол.Биохим.Физиол. 1972, 8: 369–373.
3. **Хайтлина С.Ю., Пинаев Г.П.** Различия в полимеризации очищенных актинов, выделенных на разных стадиях миогенеза скелетных мышц кролика. Биохимия. 1976, 41: 787–

783.

4. **Rubenstein P. A.** The functional importance of multiple actin isoforms. *BioEssays*. 1990, 12: 309–315.

5. **Khaitlina S. Yu.** Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol.* 2001, 202: 35–98.

6. **Хайтлина С. Ю.** Механизмы сегрегации изоформ актина в клетке. *Цитология*. 2007, 5: 345-354.

7. **Pròchniewicz E, Yanagida T.** Comparison of intermonomer interactions within polymers of chicken gizzard and rabbit skeletal muscle actins. *J. Biochem.* 1981, 89 (4):1215–1221.

8. **Хайтлина С.Ю., Пинаев Г.П.** Инактивация актина скелетных мышц новорожденного и взрослого кролика при различных условиях полимеризации и хранения образцов. *Биофизика*. 1976, 21: 495-499.

9. **Khaitlina S. Yu., Antropova O. Yu., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Collins, J.H.** Correlation between conformational changes and polymerizability in scallop β -like actin and skeletal muscle α -actin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, 368: 105–111.

10. **Bergeron S.E., Zhu M., Thiem S.M., Friderici K.H., Rubenstein P.A.** Ion-dependent polymerization differences between mammalian β - and γ -nonmuscle actin isoforms. *J. Biol. Chem.* 2010, 285 (21): 16087–16095.

11. **Müller M., Diensthuber R.P., Chizhov I., Claus P., Heissler S.M., Preller M., Taft M.H., Manstein D.J.** Distinct functional interactions between actin isoforms and nonsarcomeric myosins. *PLoS One*. 2013, 8 (7):e70636.

12. **Dugina V., Zwaenepoel I., Gabbiani G., Clément S., Chaponnier C.** β - and γ -cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J. Cell Science*. 2009, 122: 2980–2988.

13. **Дугина В.Б., Шагиева Г.С., Хромова Н.В., Копнин П.Б.** Изоформы актина и неопластическая трансформация. *Успехи молекулярной онкологии*. 2017, 4 (1): 8-15.

14. **Dugina V., Khromova N., Rybko V., Blizniukov O., Shagieva G., Chaponnier C., Kopnin B., Kopnin P.** Tumor promotion by γ and suppression by β non-muscle actin isoforms. *Oncotarget*. 2015, 6 (16):14556–14571.

15. **Dugina V., Shagieva G., Khromova N., Kopnin P.** Divergent impact of actin isoforms on cell cycle regulation. *Cell Cycle*. 2018, [Epub ahead of print].

16. **Simiczjzew A., Pietraszek-Gremplewicz K., Mazur A., Nowak D.** Are non-muscle actin isoforms functionally equivalent? *Histol. Histopathol.* 2017, 32: 1125–1139.

17. **Perrin B.J., Ervasti J.M.** The actin gene family: function follows isoform. Cytoskeleton (Hoboken) 2010, 67 (10): 630–634.
18. **Margulis B.A., Pinaev G.P.** The species specificity of the contractile protein composition of the bivalve molluscs. *Compю Biochemю Физиолю В.* 1976, 55 (2):189–194.
19. **Шелудько Н.С., Хайтлина С.Ю., Пинаев Г.П.** Сократительные белки аддуктора двустворчатых моллюсков. I. Белковый состав миофибрилл, выделенных их скелетных мышц кролика и запирающей мышцы (аддуктора) гребешков двух видов. Биологические исследования дальневосточных морей. Владивосток. Vladivostok 1978, 66–70.
20. **Хайтлина С.Ю., Шелудько Н.С.** Экстрагируемость миофибриллярных белков двустворчатых моллюсков. *Журнал Эвол. Биохим, Физиол.* 1979. Приложение, 187–193.
21. **Шелудько Н.С., Хайтлина С.Ю., Цховребова Л.А., Подлубная З.А.** α -Актинин из запирающей мышцы морского гребешка. Физико-химические свойства. *Биофизика* 1980, 25: 164–167.
22. **Цховребова Л.А., Хайтлина С.Ю., Шелудько Н.С., Подлубная З.А.** Взаимодействие α -актинина и тропомиозина с актином. *Биофизика.* 1982, 27: 20–25.
23. **Khaitlina, S.Yu., Tskhovrebova L.A., Shelud'ko N.S.** Unusual extraction of α -actinin from the adductor muscles of bivalve molluscs. *Comp.Biochem.Physiol.* 1982, 73B: 655–661.
24. **Подгорная О.И., Дроздов А.Д., Пинаев Г.П.** Профиламентный актин в мышечных клетках амбулакральных ножек морской звезды. *Биохимия.* 1981, 46 (6): 1015–1025.
25. **Подгорная О.И., Дроздов А.Л., Маргулис Б.А., Пинаев Г.П.** Саркоплазматический актин в мышечных клетках амбулакральных ножек морской звезды. *Биофизика.* 1982. 27 (2): 285–287.
26. **Shelud'ko N.S., Matusovskaya G.G., Permyakova T.V., Matusovsky O.S.** Twitchin, a thick-filament protein from molluscan catch muscle interacts with F-actin in a phosphorylation-dependent way. *Archю Biochemю Biophys.* 2004, 432 (2): 269–277.
27. **Matusovsky O.S., Matusovskaya G.G., Dyachuk V.A., Shelud'ko N.S.** Molluscan catch muscle myorod and its N-terminal peptide bind to F-actin and myosin in a phosphorylation-dependent manner. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011, 509 (1): 59–65.
28. **Dobrzhanskaya A.V., Vyatchin I.G., Lazarev S.S., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S.** Molluscan smooth catch muscle contains calponin but not caldesmon. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2013, 34 (1): 23–33.

29. **Vyatchin I.G., Shevchenko U.V., Lazarev S.S., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S.** Troponin-like regulation in muscle thin filaments of the mussel *Crenomytilus grayanus* (Bivalvia: Mytiloidea). *Biochim. Biophys. Acta.* 2015, 854 (10 Pt A): 1444–1450.
30. **Shelud'ko N.S., Vyatchin I.G., Lazarev S.S., Shevchenko U.V.** Hybrid and non-hybrid actomyosins reconstituted with actin, myosin and tropomyosin from skeletal and catch muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015, 464 (2): 611–615.
31. **Борисов А.Б., Гончарова Е.И., Пинаев Г.П., Румянцев П.П.** Изменения в локализации альфа-актина и миофибриллогенезе в кардиомиоцитах крыс при культивировании. *Цитология.* 1989, 31 (6): 642–646.
32. **Bildyug N.B., Pinaev G.P.** Зависимость организации сократительного аппарата кардиомиоцитов от внеклеточного матрикса. *Цитология.* 2013, 55 (10): 713–724.
33. **Bildyug N.B., Voronkina I.V., Smagina L.V., Yudintseva N.M., Pinaev G.P.** Matrix metalloproteinases in primary culture of cardiomyocytes. *Biochemistry (Mosc).* 2015, 80 (10): 1318–1326.
34. **Bildyug N., Bozhokina E., Khaitlina S.** Contribution of α -smooth muscle actin and extracellular matrix to the *in vitro* reorganization of cardiomyocyte contractile system. *Cell Biol. Int.* 2016, 40: 472–477.
35. **Bildyug N.** Matrix metalloproteinases: an emerging role in regulation of actin microfilament system. *Biomol Concepts.* 2016, 7 (5-6): 321-329.
36. **Арз А.Ф., Пospelova Т.В., Пинаев Г.П.** Особенности структуры актинового цитоскелета и его перестройки белками внеклеточного матрикса в нормальных, иммортализованных и трансформированных фибробластах крысы. *Цитология.* 1999, 41 (8): 707–715.
37. **Бабаков В.Н., Кропачева И.В., Петухова О.А., Туроверова Л.В., Пинаев Г.П.** Внутриклеточное распределение актин-связывающих белков, фосфорилированных по тирозину, при распластывании клеток A431 на разных субстратах. *Цитология.* 2004, 46 (12): 1055–1063.
38. **Are A.F., Galkin V.E., Pospelova T.V., Pinaev G.P.** The p65/RelA subunit of NF- κ B interacts with actin-containing structures. *Exp. Cell Res.* 2000, 256(2): 533–544.

39. **Большакова А.В., Петухова О.А., Пинаев Г.П., Магнуссон К.Е.** Сравнительный анализ методов субклеточного фракционирования для выявления альфа-актинина 1 и альфа-актинина 4 в клетках A431. *Цитология*. 2009, 51 (2): 122–129.
40. **Bolshakova A., Magnusson K.E., Pinaev G., Petukhova O.** Functional compartmentalization of NF- κ B-associated proteins in A431 cells. *Cell Biol Int*. 2013, 37 (4): 387–396.
41. **Bolshakova A., Magnusson K.E., Pinaev G., Petukhova O.** EGF-induced dynamics of NF- κ B and F-actin in A431 cells spread on fibronectin. *Histochem Cell Biol*. 2015, 144 (3): 223–235.
42. **Бабаков В.Н., Бобков Д.Е., Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева И.В., Подольская Е.П., Пинаев Г.П.** α -Актинин-4 и р65-субъединица транскрипционного фактора NF- κ B солокализуются и совместно мигрируют в ядро в клетках A431 под действием ЭФР. *Цитология*. 2004. 46 (12): 1064–1072.
43. **Babakov V.N., Petukhova O.A., Turoverova L.V., Kropacheva I.V., Tentler D.G., Bolshakova A.V., Pinaev G.P.** RelA/NF- κ B transcription factor associates with alpha-actinin-4. *Exp. Cell Res*. 2008, 314: 1030–1038.
44. **Бобков Д.Е., Кропачева И.В., Пинаев Г.П.** Мультимолекулярные комплексы, одержащие р65 субъединицу фактора NF- κ B и белки цитоскелета в клетках A431. *Биол. мембраны*. 2010, 27 (1): 133–137.
45. **Туроверова Л.В., Хотин М.Г., Юдинцева Н.М., Магнуссон К.-Э., Блинова М.И., Пинаев Г.П., Тентлер Д.Г.** Метод анализа белков внеклеточного матрикса, синтезируемого клетками в культуре. *Цитология*. 2009, 51 (8): 691–696.
46. **Хотин М.Г., Туроверова Л.В., Подольская Е.П., Краснов И.А., Соловьева А.В., Аксенова В.Ю., Магнуссон К.-Э., Пинаев Г.П., Тентлер Д.Г.** Исследование ядерных белковых комплексов α -актинина-4 методами двумерного электрофореза и масс-спектрометрии. *Цитология*. 2009, 51 (8): 684–690.
47. **Aksenova V., Turoverova L., Khotin M., Magnusson K.E., Tulchinsky E., Melino G., Pinaev G.P., Barlev N., Tentler D.** Actin-binding protein alpha-actinin 4 (ACTN4) is a transcriptional co-activator of RelA/p65 subunit of NF- κ B. *Oncotarget*. 2013, 4 (2): 362–372.
48. **Khrebtukova I.A., Kwiatkowska K., Gudkova D.A., Sorokin A.B., Pinaev G.P.** The role of microfilaments in the capping of epidermal growth factor receptor in A431 cells. *Exp. Cell Res*. 1991, 194 (1): 48-55.

49. Kwiatkowska K, Khrebtukova I.A., Gudkova D.A., Pinaev G.P., Sobota A. Actin-binding proteins involved in the capping of epidermal growth factor receptors in A431 cells. *Exp. Cell Res.* 1991, 196 (2): 255-263.

50. Hillberg L., Rathje L.-S. Z., Nyåkern-Meazza M., Helfand B., Goldman R.D., Schutt C.E., Lindberg U. Tropomyosins are present in lamellipodia of motile cells. *Eur. J. Cell Biol.* 2006, 85: 399–409.

51. Grenklo S., Hillberg L., Rathje L.-S. Z., Pinaev G., Schutt C.E., Lindberg U. Tropomyosin assembly intermediates in the control of microfilament system turnover. *Eur. J. Cell Biol.* 2008, 87: 905–920.

52. Бобков Д.Е., Айзенштадт А.А., Кропачева И.В., Пинаев Г.П. Выделение и анализ состава цитозольных белковых комплексов, содержащих тропомиозин. *Цитология.* 2012, 54 (1): 33-43.

53. Бобков Д.Е., Кропачева И.В. Влияние лизофосфатидиловой кислоты на состав цитоплазматических белковых комплексов, содержащих миозин-9 и тропомиозин. *Цитология.* 2017, 59 (2): 125-132.

**PROFESSOR G.P. PINAEV'S SCIENTIFIC ACTIVITY:
FROM POLYMORPHISM OF THE CONTRACTILE SYSTEMS
TO THE ROLE OF CYTOSKELETON IN SIGNAL TRANSDUCTION**

S. Yu. Khaitlina

Institute of Cytology RAS, Sankt-Petersburg

skhspb@yahoo.com

The article is devoted to a brief description of the research initiated and performed by George Petrovich Pinaev in the field of biological motility, from studying the physical-chemical properties of muscle contractile proteins to the association of cytoskeleton proteins with cell regulatory systems, extracellular matrix and signal transduction components. A large list of publications by G.P.Pinaev and his students and colleagues is given, which will help interested readers to become better acquainted with these works.

Key words: myogenesis, actin isoforms, contractile proteins of bivalve mollusks, двустворчатых моллюсков, cardiomyocytes contractile system, extracellular matrix, NF-kappaB, α -actinin-4, cytoplasmic multimolecular protein complexes, tropomyosin, myosin-9.

**КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ
В ИНСТИТУТЕ ЦИТОЛОГИИ РАН (САНКТ-ПЕТЕРБУРГ)**

М.И. Блинова

mira.blinova@mail.ru

В статье представлена информация о направлении исследований в области регенеративной медицины, ведущихся в настоящее время в Институте цитологии РАН: разработки биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) в области урологии, ортопедии, офтальмологии, разработки скаффолдов для клеточных продуктов, технологии производства БМКП для клинического применения, а также использование культивируемых клеток для тестирования лекарственных средств.

Ключевые слова: дифференцировка, регенерация, биомедицинский клеточный продукт, культивируемые клетки, офтальмология, ортопедия, урология.

29 января 1929 г. родился Георгий Петрович Пинаев - доктор биологических наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ. Сейчас ему исполнилось бы 90 лет. Прожил он полнокровно и полноценно из этого срока 85 лет, работая практически до последнего дня без всяких скидок на возраст, усталость и т.п. Георгий Петрович был из разряда людей, которые по своей сути не могли решать только одну конкретную задачу и быть довольным полученным результатом. Если перед ним вставала какая-то задача, то он, прежде всего, определял ее место в соответствующей системе и, отталкиваясь от этого, решал уже не только эту задачу, но и, по возможности, системную проблему, вовлекая в ее решение своих коллег.

На первых этапах своей научной деятельности Г.П. Пинаев занимался фундаментальными проблемами биологической подвижности. Логика дальнейших исследований привела его к необходимости использования в работе культивируемых клеток. Интерес к использованию в научных исследованиях клеток в культуре в 60-е годы XX века в нашей стране возрастал. В то время в Институте цитологии АН СССР, сотрудником которого был Георгий Петрович, клетки культивировали только в Лаборатории цитологии злокачественного роста, руководимой Ю.М. Оленовым. Деятельность Г.П. Пинаева по использованию культивируемых клеток в своих собственных исследованиях началась с создания в Институте цитологии в 1976 г. Отдела

клеточных культур. Георгий Петрович Пинаев до последнего дня жизни (22 ноября 2013 г.) руководил Отделом в течение почти 40 лет.

В 1978 году были приняты Постановления ЦК КПСС, СМ СССР и АН СССР №662 и 807 о создании в стране Всесоюзной коллекции клеточных культур (ВККК). Для осуществления этой работы была создана Междуведомственная комиссия под руководством вице-президента АН СССР, академика Ю.А. Овчинникова. Руководителем ВККК был назначен Г.П. Пинаев. Эти постановления касались не только формального создания ВККК, но и выполнения задач по обеспечению страны отечественными приборами, посудой и материалами для культивирования клеток и биотехнологических разработок, по созданию отечественного интерферона и по ряду разделов научной программы. Большой заслугой Георгия Петровича было создание в Институте цитологии на базе ОКК Коллекции культур клеток позвоночных, которая была утверждена Центральным банком ВККК.

Г.П. Пинаев уделял большое внимание системному подходу к проблеме подготовки кадров. Именно поэтому в Отделе клеточных культур всегда было достаточно молодежи. Помимо организации научных конференций и школ для молодых специалистов, по инициативе Георгия Петровича был сформирован курс лекций по биологии клетки в культуре, который вели сотрудники института для студентов Факультета медицинской физики и биоинженерии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета им. Петра Великого и студентов Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета. До сих пор многочисленные студенты проходят в лабораториях института практику, выполняя свои бакалаврские и магистерские дипломные работы. За годы существования Отдела клеточных культур по инициативе Г.П. Пинаева был опубликован ряд учебно-методических сборников, способствующих теоретической подготовке начинающих ученых. Кроме того, в Институте цитологии постоянно проходили стажировку по методам культивирования клеток сотрудники учреждений из разных регионов страны и из государств – бывших союзных республик СССР (Казахстан, Узбекистан и др.).

Проблемы биотехнологии и, в частности, клеточных технологий и их применение в медицине стали активно развиваться за рубежом в конце 70-х годов XX века. В США впервые в клинической практике для лечения ожогов были использованы клеточные продукты с культивируемыми кератиноцитами (эпидермальными клетками кожи человека) в виде многослойного пласта кератиноцитов, выращенного в условиях *in vitro*. Затем во Франции был

разработан дермальный эквивалент с дермальными фибробластами. С конца 80-х годов XX века началась активная эпоха развития клеточной биологии и биотехнологии и у нас в стране.

В 1991 году по заданию Главного военно-медицинского управления МО СССР в рамках проекта **«Биотехнологическое моделирование живой человеческой кожи с целью лечения критических и сверхкритических ожогов»** была поставлена задача – разработать метод лечения ожогов с использованием культивируемых клеток кожи человека. Научно-исследовательскую работу выполняли сотрудники Института цитологии РАН (в частности, в Отделе клеточных культур под руководством Георгия Петровича Пинаева) и сотрудники Клиники термических поражений Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО СССР (руководитель Б.С. Вихриев). На первом этапе в работе принимали участие также сотрудники Института биологии развития им. Кольцова АН СССР (руководитель – В.В. Терских). Это были первые, предпринятые в нашей стране исследования по разработке клеточных продуктов для клинического применения.

Поставленная задача была решена к 2000 г. На начальном этапе работы были освоены методы выделения из цельной ткани необходимых клеток; модифицированы, по сравнению с зарубежными, способы культивирования выделенных клеток с сохранением их структурной и функциональной активности, подобраны соответствующие условия культивирования с учетом того, что в стране отсутствовал ряд необходимых материалов и реактивов. В результате были разработаны 3 биомедицинских клеточных продукта (БМКП): *«Эквивалент дермальный ЭД»*, *«Пласт кератиноцитов многослойный – аналог эпидермиса кожи для трансплантации на ожоговые поверхности, стерильный, ПКМ-ЭК»*, *«Эквивалент кожи полной, ЭКП»*. Для этих клеточных продуктов сотрудниками Института цитологии был разработан способ приготовления особого коллагена - *«Коллаген желирующий I типа»*, поскольку в то время в нашей стране не было коллагена необходимого качества. Кроме того, впервые была разработана нормативно-технической документации на эти клеточные продукты, т.е. составлены *«Технические условия»*. Были выполнены все необходимые испытания первых двух вышеупомянутых клеточных продуктов - клинические, технические и токсикологические. Клинические испытания проводились в 3-х клиниках: в Военно-медицинской академии МО РФ, в ГКВГ им. Н.Н. Бурденко МО РФ и в Институте скорой помощи им. И.И. Джанелидзе. На производство и клиническое применение этих БМКП были получены первые в стране разрешения: на *«Пласт кератиноцитов многослойный»* - в 2002 г. от Комитета по новой

медицинской технике МЗ РФ, на «Эквивалент дермальный ЭД» - в 2006 г. от Росздравнадзора. К настоящему времени при их применении в 17 медицинских учреждениях продемонстрирована эффективность восстановления нарушенной кожной поверхности у более 500 пациентов при заживлении различных ран: ожогов разной степени, в том числе критических и сверхкритических; травм различного происхождения, в том числе, огнестрельных ран; язв разной этиологии, в том числе, образовавшихся в результате диабета или радиационного облучения; свищей, пролежней и др.

В Институте цитологии РАН после ухода из жизни Г. П. Пинаева, но уже в составе нового инфраструктурного подразделения – Центра клеточных технологий (зав. Н.А. Михайлова), продолжают развиваться начатые под руководством Георгия Петровича Пинаева исследования по направленной дифференцировке стволовых клеток. В частности, проводятся исследования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК), способных к дифференцировке в хондрогенном, остеогенном, мышечном и других направлениях, с целью разработки на их основе биомедицинских клеточных продуктов, способствующих регенерации поврежденных тканей роговицы глаза, органов мочеполовой системы, хрящевой и костной тканей. В настоящее время предпринимаются исследования с использованием новых молекулярно-генетических методов, способствующих дифференцировке клеток в заданном направлении и разработке на их основе клеточных технологий для восстановления нарушенных тканей (в частности, роговицы глаза).

Необходимость достижения максимального функционирования в процессе культивирования дифференцированных клеток различных органов и тканей (кожи, кости, хряща, уротелия, сердечной мышцы, эндотелия, лимба глаза) и применения их в клинической практике для регенерации поврежденных тканей поставила задачу создания комплексных продуктов этих клеток на основе биodeградируемых скаффолдов (белки внеклеточного матрикса, биodeградируемые полимеры различной природы). Фундаментальные исследования роли белков внеклеточного матрикса инициировались Георгием Петровичем еще раньше, в период изучения механизмов клеточной подвижности и роли цитоскелета в адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировке клеток. В Отделе клеточных культур специалистами биохимиками были разработаны способы выделения ряда белков внеклеточного матрикса - желирующего коллагена I типа, ламинина, фибронектина, матригеля. На базе этих белков и некоторых природных полимеров (в частности,

полилактидов) разработаны резорбируемые матрицы. Матрицы, заселенные культивируемыми клетками, успешно используются в регенеративной медицине. Как показало время, подобная комплексность исследований и взаимодействие разных специалистов в одной и той же области расширяет возможности достижения эффективных результатов.

При взаимодействии с рядом учреждений медицинского профиля (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Институт фтизиопульмонологии МЗ РФ, Институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, Госпиталь для ветеранов войн, ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова МЗ РФ, Санкт-Петербургский государственный медицинский институт им. И.П. Павлова) выполняется ряд экспериментальных исследований в разных направлениях функциональной активности клеток, в частности, в процессах дифференцировки и трансдифференцировки стволовых клеток разного гистогенеза. Полученные результаты расширяют возможности разработки новых БМКП для решения проблем регенеративной медицины.

1. **Урология.** Показана эффективность использования тканеинженерной конструкции на основе скаффолда из смеси полилактида и фиброина шелка, заселенного аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), для восстановления частичного повреждения ткани мочевого пузыря (МП) кролика. Продемонстрирована безопасность использования клеточной конструкции и ее интеграция с нативной тканью с сохранением емкости МП кролика. Участие МСК в восстановлении различных слоев поврежденной ткани МП кролика может свидетельствовать об их возможной дифференцировке в клетки мышечного слоя и в клетки уротелия. Показано, что после инкубирования клеточной конструкции в течение 3 мес в поврежденном участке стенки МП происходит процесс васкуляризации регенерирующей ткани. При этом, степень ее васкуляризации становится сопоставимой с таковой в интактной ткани МП кролика (1 - 9).

2. **Ортопедия.** Продолжены исследования по разработке заселенных мезенхимальными стволовыми клетками моделей титановых протезов, предназначенных для протезирования нижних конечностей. Выполнены доклинические исследования таких протезов в экспериментах на лабораторных животных (mini pigs).

Давно показано, что имплантаты на основе титана широко используются в реконструктивной хирургии и ортопедии, однако применение необработанных имплантатов часто приводит к недостаточной остеоинтеграции. Нанесение на поверхность титанового

имплантата наноструктурного рельефа способствует формированию нано- и микро топографических структур. Показано, что заселение обработанных имплантатов МСК, приводит к усиленной дифференцировке клеток в остеогенном направлении. Оценка *in vivo* остеоинтегративных свойств имплантатов демонстрирует прогрессивное новообразование кости в зоне контакта костного имплантата и повышенную прочность. Нанесение микро-/нанотопографических покрытий на поверхность внутрикостных титановых имплантатов может быть использовано в трансляционных и клинических исследованиях в ортопедии и реконструктивной хирургии (10 - 14).

3. **Офтальмология.** Отработаны условия заселения пористой тетрафторэтиленовой (ПТФЭ) мембраны дермальными фибробластами. С помощью метода сканирующей электронной микроскопии показана способность клеток нормально адгезировать, расти и образовывать монослой на таком скаффолде. В экспериментах *in vivo* на кроликах показана возможность восстановления целостности структуры поврежденной ткани глаза в результате трансплантации такой мембраны, заселенной клетками, но без восстановления прозрачности.

Освоен ферментативный способ выделения лимбальных стволовых клеток глаза кролика. Подобраны условия культивирования и криосохранения их в атмосфере жидкого азота. Отработаны условия: формирования плотного коллагенового скаффолда (концентрация коллагена 14 мг/мл), заселения скаффолда выделенными клетками и трансплантации на модельную рану роговицы глаза кролика. Гистологический анализ биоптатов регенерирующей роговицы показал восстановление роговицы, но пока без достаточной степени ее прозрачности.

Показана возможность применения стволовых клеток лимба и слизистой полости рта для терапии дисфункции лимбального эпителия. Источником клеток служили фрагменты лимба цельных энуклеированных глаз и биоптаты слизистой оболочки полости рта здоровых кроликов породы Шиншилла, а также освоен способ выделения и культивирования стволовых клеток ротовой полости человека. Полученные и введенные в культуру *in vitro* популяции клеток использовали в качестве клеточного элемента при создании БМКП со скаффолдами на основе коллагена I типа и амниотической мембраны (АМ). Созданные тканеинженерные конструкции трансплантировали кроликам с моделью лимбальной недостаточности. Полученные результаты показали, что примененные в эксперименте методики трансплантации разработанных тканеинженерных конструкций с культивируемыми

стволовыми клетками как лимба, так и слизистой полости рта, обеспечивают восстановление нормального эпителиального покрова роговицы у кролика.

Проводятся экспериментальные исследования по разработке скаффолдов на основе синтетических полимерных материалов, в частности, полилактидов (поликапролактон, полилактид-ко- гликолид и полилактид-ко-капролактон), предназначенных для заселения их клетками с целью реконструкции роговицы глаза и оценки их биосовместимости в условиях *in vitro*. Результатом должны быть разработки по созданию БМКП. Использование стволовых клеток эпителия лимба или слизистой ротовой полости в комплексе с синтетическими полимерными скаффолдами откроет новые возможности для регенеративной офтальмохирургии по реконструкции тканей глаза (15 - 21).

4. **Хондро-остеогенез.** Отработаны методы получения культуры хондрогенных клеток из суставного хряща кролика и заселение ими полилактидных матриц. Показано, что наиболее оптимальными условиями культивирования этих клеток является предобработка матриц ростовой средой и нанесение клеток на матрицу в составе коллагенового геля.

Исследована способность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга пациента с остеоартрозом к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлениях под воздействием электрического поля электрета. Показано, что в присутствии образцов с анодным оксидом в электретном состоянии в МСК костного мозга интенсифицируются процессы синтеза белков-маркеров дифференцировки. Проведено сравнение воздействия электретов с равномерным и линейным распределением заряда по поверхности. В процессе остеогенной дифференцировки МСК значительно усиливали экспрессию остеокальцина и коллагена I типа. В ходе хондрогенной дифференцировки обнаружено усиление экспрессии агрекана и коллагена II типа. Эти признаки максимально выражены при воздействии на клетки образцов электрета с распределением заряда по поверхности, близким к линейному.

Создание тканеинженерных конструкций имеет большое практическое значение в разработке новых методов терапии хряща. Отработана методика получения трехмерных полилактидных скаффолдов с порами различного диаметра. Проведен сравнительный анализ скаффолдов по следующим признакам: количество жизнеспособных МСК костного мозга в процессе культивирования; выработка клетками белков внеклеточного матрикса в процессе

хондрогенной дифференцировки. Сделан выбор в пользу скаффолдов с диаметром пор 0.04 – 0.14 мм для дальнейшего использования в восстановительной терапии хрящевой ткани.

Экспериментальная разработка биомедицинского клеточного продукта с МСК, культивируемыми в коллагеновом геле на скаффолде, приготовленном на основе гидроксиапатита (вариант «Биоситалл») и факторов остеогенной дифференцировки показали, что как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*, формируются новые элементы костной ткани (22 - 30).

5. Формирование тканеподобных структур *in vitro* для регенеративной терапии и реконструктивной хирургии. Установлено, что для получения трехмерных полилактидных матриц с большим размером пор важную роль играют следующие параметры – количественное соотношение растворителей (диоксан и вода), присутствие используемых модификаторов (коллаген и хитозан), а также процесс замораживания (жидкий азот или лед). Структуру матриц и размер пор определяли с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (31 - 38).

6. Тестирование лекарственных средств. Разработана тест-система *in vitro* для оценки влияния фармакотерапии на клеточную составляющую тканеинженерных конструкций при заместительной офтальмохирургии. Одним из перспективных способов лечения заболеваний роговицы, связанных с дисфункцией лимбальных стволовых клеток роговицы, является трансплантация стволовых клеток на различных типах скаффолдов, которая всегда сопровождается фармакотерапией. Правильный подбор офтальмологических препаратов позволит минимизировать риски возникновения побочных эффектов, вызванных цитотоксическим действием препарата на клеточную составляющую тканеинженерных конструкций. Для оценки токсичности коммерческих препаратов в форме глазных капель, относящихся к группам: анестетики, антисептики, антибиотики и глюкокортикостероиды, в качестве тест-системы были выбраны лимбальные стволовые клетки (ЛСК). Выявлено, что внутри фармакологических групп препараты различаются по степени и характеру токсичности. Это позволяет косвенно прогнозировать, что неправильно подобранный препарат или его концентрация могут привести к гибели трансплантированных клеток и заметно снизить эффективность репаративных процессов (39 - 44).

7. Использование БМКП в клинической практике. С момента получения разрешений на производство и клиническое применение БМКП на основе клеток кожи («Эквивалент

дермальный» и «Многослойный пласт кератиноцитов») постоянно поступают запросы из медицинских учреждений в соответствии решениями Этических комитетов этих учреждений на применение БМКП для заживления серьезных нарушений кожной поверхности, прежде всего, в результате ожогов различной степени и трофических язв разной этиологии. Количество БМКП, предоставленных в разное время разным клиникам до конца 2018 г. представлено в таблице (45 - 47).

КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, ПРИГОТОВЛЕННЫХ НА 14.11. 2018 г.

Наименование	Количество	В каком виде	Медицинское учреждение
Многослойный пласт кератиноцитов	2486 см ²	Пласт	Военно-медицинская академия МО РФ (СПб); Детский ожоговый центр (СПб); Институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе (Региональный ожоговый центр, СПб); Больница Святителя Луки (СПб)
Дермальный эквивалент на основе коллагена	61 272 см ² 1951 мл	Плотный гель Полужидкий	Медсанчасть в Сосновом бору (СПб); Радиационный центр (Обнинск); Больница Святителя Луки (СПб); Детский ожоговый центр (СПб); Больница святого Георгия (СПб); Военно-медицинская академия МО РФ(СПб); Мед. ун-т им. И.П. Павлова (СПб); МАПО (СПб); ГВК МО РФ им. Н.Н. Бурденко (Москва); Институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе (СПб); Стоматология (СПб); Казанский университет; Клиника МЧС (С.-Петербург); Офтальмология (Больница №2, СПб); Госпиталь ветеранов войны (СПб) Гор. Больница №9 (СПб) Ин-т эксперимент. медицины(СПб)
Дермальный эквивалента на основе фибриногена	70 мл 160 см ²	Полужидкий Плотный гель	Больница Святителя Луки (СПб)
Эквивалент полной кожи	290 см ²	Дермальный эквивалент + кератиноциты	Больница Святителя Луки (СПб)
Суспензия фибробластов	409x10 ⁶ клеток	В растворе	Стоматология (СПб)

Раствор коллагена + компоненты для желирования	465 мл	Раствор	Медицинский радиологический научный центр РАМН (Обнинск)
--	--------	---------	--

Общее количество переданного в клиники в 2018 г. материала «Эквивалент дермальный ЭД» для заживления ожогов, трофических язв разной этиологии, пролежней составило 2 624 см². Кроме того, было приготовлено 274 см² кератиноцитов (для лечения ожогов). С помощью применения БМКП для лечения пациентов с критическими и сверхкритическими ожогами (65 и 90% повреждения кожной ткани) удалось спасти несколько жизней или избежать ампутаций.

8. Разработана структура формирования банка клеток для медицинского применения. Ключевым элементом производства клеточных продуктов является создание банков клеток человека, используемых в качестве стандартизированного материала для восстановления поврежденных тканей пациентов. Для случаев, когда нельзя использовать собственные клетки пациента, создают банки аллогенных клеток (клеток доноров). Разработана структура двухуровневого банка для сохранения фибробластов кожи человека. С использованием инфраструктуры опытного производства клеточных продуктов, созданного в Институте цитологии, отработаны все этапы технологической цепочки по созданию такого банка. Банк должен состоять из 2-х разделов – референтный банк, в котором хранятся только что выделенные клетки, и рабочий, в котором представлен наработанный массив клеточного материала в результате пассирования клеток. С клеточным материалом этой части банка выполняются все необходимые контроли, характеризующие свойства клеток. А именно, определение наличия/отсутствия различных контаминаций, определение ростовых характеристик, наличие характерных поверхностных маркеров и дифференцировочного потенциала с целью подтверждения статуса линии мезенхимных стволовых клеток. Для характеристики ростовых характеристик определяются: время удвоения, индекс пролиферации, эффективность клонирования; также характеризуется фаза репликативного старения; проводится кариотипический анализ; определяются поверхностные маркеры с помощью метода проточной цитофлуориметрии, иммунофлуоресцентного анализа, экспрессия коллагена I типа; определяется способность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях. Полная характеристика каждой клеточной линии

оформляется соответствующими протоколами. Создана необходимая нормативная документация – СОПы (стандартные оперативные процедуры).

В США и ряде европейских государств существуют специальные криобанки клеток военнослужащих и людей, работающих в областях, связанных с риском. Подобные криобанки и клеточные технологии фактически обеспечивают биобезопасность страны. Таким образом, результаты фундаментальных исследований по биологии клетки в культуре создают непосредственную возможность для применения их в клинической практике (48).

9. **Инфраструктура для технологического производства БМКП.** Следует отметить, что ввиду системного видения проблемы, присущего Георгию Петровичу, его беспокоило отсутствие в цепочке «разработка биомедицинского клеточного продукта – клиническое его применение» среднего звена – «технологическая наработка клеточного продукта». Но закрыть этот пробел ему не удалось из-за отсутствия необходимого финансирования. Уже позднее Институт цитологии, выиграв по конкурсу РФ проект №14-50-00068 «Молекулярно-клеточные технологии для лечения социально значимых заболеваний», осуществил закрытие этого пробела. Инфраструктура организованного в Институте цитологии Центра клеточных технологий (руководитель Н.А. Михайлова) позволила создать опытное производство для внедрения технологии наработки биомедицинских клеточных продуктов по международным стандартам GMP и ГОСТ Р ИСО 14644-4-2002 и в соответствии с ФЗ №180 об обращении биомедицинских клеточных продуктов для обеспечения ими медицинских учреждений. Кроме того, это позволит производить клеточные продукты для клинических исследований, которые являются необходимым этапом, предшествующим регистрации и внедрению. Центр клеточных технологий - единственный в структуре РАН - имеет такую площадку. Поэтому отработка процедур опытного производства, создание необходимой нормативной документации приобретают особую значимость как для внедрения разработок ИИЦ РАН, так и разработок, выполненных в других организациях (руководитель М.Г. Хотин). В состав опытного производства входят:

- Комплекс чистых помещений класс D (ISO8).
- Изоляторные технологии.
- Автоматизированная роботизированная система для культивирования клеток ComrasT Select (позволяет стандартизировать процесс культивирования клеток, гарантировать отсутствие контаминации и кросс-контаминации, упрощать сертификацию процессов по

стандартам GMP и GLP, высвободить рабочее время квалифицированного персонала, одновременно вести до 6 типов культур клеток в культуральных флаконах и планшетах).

– Автоматическая система розлива по криопробиркам Fill-It TAP - для быстрого автоматизированного наполнения криопробирок суспензией клеток для минимизации их гибели после добавления криоконсерванта, стандартизации процесса криоконсервации, исключения контаминации на стадии заполнения криопробирок.

– Микроскоп Evos FL Auto - автоматизированная система флуоресцентной визуализации клеток.

– 4D Нуклеофектор Lonza - для проведения высокоэффективной трансфекции первичных культур и клеточных линий методом нуклеофекции.

В 2017 г. заключено Соглашение о научно-техническом сотрудничестве между Институтом цитологии РАН, Sartorius Stedim Biotech S.A. и ООО «ОПТЭК» и созданию на базе ИНЦ РАН Российско-Скандинавского референтного центра по клеточным технологиям (от 18.05.2017). Целью Соглашения является установление научно-технического сотрудничества в области клеточных технологий, совместной разработки новых методов автоматизированного культивирования клеточных культур и создания клеточных продуктов, предназначенных для клинического применения, и на их основе тест-систем для тестирования новых лекарственных препаратов.

Таким образом, в цепочке: «разработка биомедицинского клеточного продукта – клиническое его применение» появилось среднее звено: «наработка клеточного продукта». В результате цепочка замкнулась, пробел был устранен. Дело, начатое Георгием Петровичем Пинаевым, продолжается и развивается. В Институте цитологии активно выполняются фундаментальные исследования по дифференцировке и функционированию культивируемых клеток, а полученные результаты служат основой для разработок на современном уровне новых биомедицинских клеточных препаратов, необходимых для клинического применения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлова Н.В., Муравьев А.Н., Виноградова Т.И., Юдинцева Н.М. Применение аллогенных клеток для реконструкции мочевого пузыря (экспериментальное исследование).

ISSN 2575-7999 Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). Ежемесячный научный журнал. 2014, 1 (4): 134-37.

2. **Муравьев А.Н., Орлова Н.В., Блинова М.И., Юдинцева Н.М.** Тканевая инженерия в урологии, новые возможности для реконструкции мочевого пузыря. Цитология, 2015, 57 (1): 14-18.

3. **NM Yudintceva, YA Nashchekina, MI Blinova, MA Shevtsov, NV Orlova, TI Vinogradova, AN Muravjev.** Application of allogenic bone marrow stromal cells on the urology. ESGCT and FSGT Collaborative Congress, Helsinki, 17 to 20 September 2015; Materials of Congress.

4. **Муравьев А.Н., Орлова Н.В., Блинова М.И., Юдинцева Н. М.** Тканевая инженерия в урологии, новые возможности для реконструкции мочевого пузыря. Цитология. 2015, 57 (1): 14–18.

5. **Ф.Гусейнова, Д.А. Ниаури, Т.И. Виноградова, Н.М. Юдинцева, А.А. Муртузалиева, Н.М. Блюм, Д.С. Момот, Н.В. Заболотных, М.Л. Витовская, Т.В. Кольцова, П.К. Яблонский.** Первый опыт применения стромальных клеток костного мозга в терапии экспериментальной туберкулезной инфекции женских половых органов. Ф.М. Таврический медико-биологический вестник. 2015, 10, 1 (69): 22-26.

6. **Орлова Н.В., Муравьев А.Н., Виноградова Т.И., Блюм Н.М., Юдинцева Н.М., Блинова М.И., Нащекина Ю.А., Яблонский П.К.** Клеточные технологии в реконструктивной хирургии мочевого пузыря. Медицинский альянс. 2015, (1): 149.

7. **Natalia M Yudintceva, Yulia A Nashchekina, Miralda I Blinova, Nadezhda V Orlova, Alexandr N Muraviov, Tatiana I Vinogradova, Magomed GSheykhov, Elena Y Shapkova, Dmitriy V Emeljannikov, Petr K. Yablonskii, Igor A. Samusenko, Anastasiya L. Mikhrina, Artem V. Pakhomov, Maxim A. Shevtsov.** Experimental bladder regeneration using a poly-l-lactide/silk fibroin scaffold seeded with nanoparticle-labeled allogenic bone marrow stromal cells. International Journal of Nanomedicine., 2016, 11: 4521-4533.

8. **Н.В. Орлова, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова, Н.М. Блюм, Н.Ю. Семенова, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, М.И. Блинова, М.А. Шевцов, М. Витовская, Н.В. Заболотных, М.Г. Шейхов.** Экспериментальная реконструкция мочевого пузыря кролика с использованием аллогенных клеток различного тканевого происхождения. МедАльянс. 2016, (1): 50-52.

9. **Yudintceva Natalia M., Bogolyubova Irina O., Muraviov Alexandr N., Sheykhov Magomed G., Vinogradova Tatiana I., Sokolovich Evgenii G., Samusenko Igor A., Shevtsov Maxim A.**

Application of the allogenic mesenchymal stem cells in the therapy of the bladder tuberculosis. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018, 121580–e1593. doi: 10.1002/term.2583.

10. **Shevtsov M.A., Galibin O.V., Yudintceva N.M., Blinova M.I., Pinaev G.P., Ivanova A.A., Savchenko O.N., Suslov D.N., Potokin I.L., Pitkin E., Raykhtsaum G., Pitkin M.R** Two-stage implantation of the skin- and bone-integrated pylon seeded with autologous fibroblasts induced into osteoblast differentiation for direct skeletal attachment of limb prostheses. *J Biomed Mater Res Part A.* 2014, 10 (2A): 3033–3048.

11. **Maxim A Shevtsov, Natalia Yudintceva, Miralda Blinova, George Pinaev, Oleg Galibin, Igor Potokin, Ketul C Popat, Mark Pitkin.** Application of the skin and bone integrated pylon with titanium oxide nanotubes and seeded with dermal fibroblasts *Prosthetics and Orthotics International.* 2014, 1-10. DOI: 10.1177/0309364614550261

12. **Elena G. Zemtsova, Natalia M. Yudintceva, Pavel E. Morozov, Ruslan Z. Valiev, Vladimir M. Smirnov, Maxim A. Shevtsov.** Improved osseointegration properties of hierarchical micro/nanotopographic coatings fabricated on titanium implants. *International Journal of Nanomedicine,* 2018, 13:2175—2188. DOI <https://doi.org/10.2147/IJN.S161292>.

13. **Nazarov D.V., Smirnov V., Zemtsova E., Yudintceva N., Shevtsov M., Valiev R.** Enhanced osseointegrative properties of the ultrafine-grained titanium implants modified by the chemical etching and atomic layer deposition. *ACS Biomater. Sci. Eng.,* 2018, 4(9): 3268–3281. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.8b00342.

14. **Shevtsov Maxim A., Yudintceva Natalia M., Blinova Miralda I., Voronkina Irina V., Suslov Dmitriy N., Galibin Oleg V., Gavrilov Dmitriy V., Akkaoui Michael, Raykhtsaum Grigoriy, Albul Andrey V., Pitkin Emil, Pitkin Mark.** Evaluation of the effect of physical vapor deposition (PVD) silver coating on resistance to infection in transdermal SBIP implants with deep porosity. *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials,* 2018, doi: 10.1002/jbm.b.34108.

15. **М.И. Блинова, Н.М. Юдинцева, Е.А. Вершевская, З. Н. Джанаева, Ю.С. Астахов, В.В. Томсон, И.Л. Потокин, О.В. Галибин, Г.П. Пинаев.** Возможность культивирования фибробластов дермы человека на искусственной пористой мембране из политетрафторэтилена, предназначенной для склеропластики. *Гены и клетки.,* 2015, 10 (1): 48-54.

16. **Чурашов С.В., Черныш В.Ф., Дубовиков А.С., Конкиева А.В., Блинова М.И., Александрова О.И.** К вопросу о консервации амниотической мембраны в качестве матрицы

для культивирования лимбальных стволовых клеток. IX Российский общенациональный офтальмологический форум. Сборник научных трудов научно-практической конференции с международным участием. Москва, 2016, 12-14 октября 2016 г. Под редакцией В.В. Нерова. 2: 497-500.

17. **Куликов А.Н., Чурашов С.В., Черныш В.Ф., Безушко А.В., Дубовиков А.С., Блинова М.И., Александрова О.И., Суетов А.А., Гаврилюк И.О., Хорольская Ю.И.** Применение коллагенового скаффолда в качестве носителя культивированных аутологичных лимбальных эпителиальных клеток для устранения лимбальной недостаточности в эксперименте. *Современные технологии в офтальмологии*. 2018, 3 (23): 116-120.

18. **Куликов А.Н., Чурашов С.В., Черныш В.Ф., Блинова М.И., Александрова О.И., Карпович В.В., Хорольская Ю.И.** Современные подходы к проблеме выбора носителя для культивирования стволовых клеток роговицы в лечении лимбальной недостаточности. *Офтальмологические ведомости*, 2018, 11 (2): 48-56.

19. **Карпович В.В., Куликов А.Н., Чурашов С.В., Черныш В.Ф., Блинова М.И., Нащекина Ю.А., Цобкалло Е.С., Москалюк О.А., Мельников А.С., Сердобинцев П.Ю., Хороших Д.А., Ридель С.А., Горохов А.О.** Экспериментальное исследование прозрачности, механических свойств и биодegradации синтетических полимерных матриц как возможных носителей для культивируемых лимбальных эпителиальных стволовых клеток. *Современные технологии в офтальмологии*. 2018, 4 (24):150-154.

20. **Гаврилюк И.О., Александрова О.И., Хорольская Ю.И., Журенков К.Э., Кузнецова А.Ю., Куликов А.Н., Чурашов С.В., Черныш В.Ф., Дубовиков А.С., Безушко А.В., Блинова М.И.** К вопросу о заборе, выделении и культивировании стволовых клеток эпителия слизистой полости рта. *Современные технологии в офтальмологии*, 2018, 4 (24): 60-63. DOI: 10.25276/2312-4911.

21. **Дубовиков А.С., Гаврилюк И.О., Куликов А. Н., Чурашов С. В., Черныш В. Ф., Безушко А. В., Александрова О. И., Блинова М. И.** Способ иммобилизации нативной амниотической мембраны для транспортировки консервации и применения ее в качестве носителя культивированных клеток. Патент № 2018120993, 2 680 471, от 06.06.2018.

22. **Александрова С.А., Никонов П.О., Нащекина Ю.А.** Характеристика остеоиндуктивных свойств полилактидных матриц. *Физиология и медицина. Исследования, высокие технологии,*

стартапы: сборник статей VI Международной научно-практической конференции. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2014: 199-201.

23. **Александрова С.А., Пинаев Г.П.** Характеристика актинового цитоскелета на начальном этапе трансэндотелиальной миграции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга. *Биофизика*, 2014, 59, (5): 913-918.

(Эта статья выходит также в англо-язычной версии - Alexandrova S.A., Pinaev G.P. Actin cytoskeleton reorganization in bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells at the initial step of transendothelial migration. *Biophysics*, 2014, 59 (5): 741-745.

24. **Касьянова Е.С., Александрова С.А., Сердобинцев М.С.** Оценка биосовместимости остеозамещающих материалов с мезенхимными стромальными клетками для пластики дефектов при костном туберкулезе. *Медицинский академический журнал*, 2016, 16 (3). 2-4.

25. **Нащекина Ю.А., Чабина А.С., Осмоловская О.М., Добровольская И.П., Юдин В.Е.** Влияние формы частиц гидроксиапатита на организацию актинового цитоскелета и жизнеспособность мезенхимных клеток костного мозга. *Цитология*. 2018, 60 (10): 813 – 816.

26. **Попов Г. И., Крюков А. Е., Попрядухин П. В., Нашекина Ю. А., Ивановна Е. М., Вавилов В. Н., Юдин В. Е., Смирнова Н. В.** Выбор оптимальных методов посева и культивирования мезенхимных стволовых клеток на биоразлагаемой матрице из L-полилактида. *Цитология*. 2018, 60 (4): 279–286 doi:10.31116/tsitol.2018.04.06.

27. **Попов Г.И., Крюков А.Е., Нашекина Ю.А., Ивановна Е.М., Вавилов В.Н., Юдин В.Е., Попрядухин П.В., Юкина Г.Ю., Смирнова Н.В.** Сравнительная оценка методов культивирования мезенхимных стволовых клеток на биоразлагаемой матрице из нановолокон L-полилактида для создания тканеинженерного сосудистого имплантата. *Региональное кровообращение и микроциркуляция*. 2018, 17 (1):61–68 DOI: 10.24884/1682-6655-2018-17-1-61-68.

28. **Божокин М.С., Божкова С.А., Нетылько Г.И., Наконечный Д.Г., Блинова М.И., Нашекина Ю.А.** Результаты замещения поверхностного дефекта гиалинового хряща крысы клеточно-инженерной конструкцией в эксперименте. *Труды Карельского научного центра Российской Академии Наук*, 2018, (4)13-22 DOI: <http://dx.doi.org/10.17076/them815>.

29. **Копелев П.В., Нашекина Ю.А., Александрова С.А.** Сравнительный анализ трёхмерных полилактидных скаффолдов различной пористости, предназначенных для восстановления хрящевой ткани. *Бюллетень информационных технологий*, 2018, 2 (7): 25-31.

30. **Касьянова Е.С., Копелев П.В., Александрова С.А.** Оценка влияния модификации коллагеном I типа поверхности остеозамещающего материала «Биосит-Ср Элкор» на жизнеспособность мезенхимных стромальных клеток костного мозга. Бюллетень инновационных технологий. 2018, 2 (3): 33-37.

31. **Нащекина Ю.А., Никонов П.О., Михайлов В.М., Пинаев Г. П.** Зависимость заполнения стромальными клетками костного мозга трёхмерной матрицы от способа посева клеток и типа модификации поверхности матрицы, Цитология., 2014, 56 (4): 283–290.

32. **Нащекина Ю.А., Зорин И.М., Фетин П.А., Скачилова С.Я., Билибин А.Ю.** Композиционные пленочные покрытия на основе поли (D, L-лактида) и ацексамовой кислоты. Журнал прикладной химии, 2014, 87 (8): 1167-1171.

33. **Копелев П.В., Александрова С.А., Никонов П.О., Нашекина Ю.А.** Использование полилактидных матриц для культивирования клеток хряща. Сборник трудов. «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии: материалы Всерос. науч.-практ. конф.» (Иркутск, 25–27 июня 2015 г.). – Иркутск: Изд-во ИРНТУ 2015, 394: 220-228.

34. **Нащекина Ю.А., Никонов П.О., Юдинцева Н.М., Нашекин А.В., Лихачёв А.И., Москалюк О.А., Юдин В.Е., Блинова М.И.** «Взаимодействие мезенхимных клеток костного мозга с нативными волокнами фиброина шёлка», Цитология, 2016, 58 (11): 843-49.

35. **Гин (Ермакова) И.И., Лутцева (Вершевская) Е.А., Воронкина И.В.** Стабильность гелей на основе коллагена I типа и гиалуроновой кислоты. Цитология, 2016, 58, (6): 467-475.

36. **Korzhikov-Vlakh V., Averianov I., Sinitsyna E., Nashchekina Y., Polyakov D., Guryanov I., Lavrentieva A., Raddatz L., Korzhikova-Vlakh E., Scheper T. and Tennikova T.** Novel Pathway for Efficient Covalent Modification of Polyester Materials of Different Design to Prepare Biomimetic Surfaces. *Polymers*, 2018.10:1299; doi:10.3390/polym10121299.

37. **Nashchekina Y.A., Kurdyukova K.E., Zorin, I.M., Mikhailova N.A., Bilibin A. Yu.** Spectrophotometric Evaluation of L-Lysine Concentrations in Water-Organic Solutions. *Technical Physics*. 2018, 63 (9):1341-1344 DOI: 10.1134/s106378421809013x.

38. **Nashchekina Y. A., Kurdyukova K. E., Zorin I. M., Darvish D.M., Tsobkallo E.S., Blinova M.I., Bilibin A.Yu.** Synthesis of D, L-Lactide–ε-Caprolactone Copolymers and Preparation of Films Based on Them. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2018, 91 (1):113-120.

39. **О.И. Александрова, Ю.И. Хорольская, Д.Ю. Майчук, М.И. Блинова**, Исследование общей цитотоксичности антибиотиков аминогликозидного и фторхинолонового ряда на клеточных культурах. Вестник офтальмологии, 2015, 5: 39-48.
40. **О.И. Александрова, И.Н. Околов, Ю.В. Тахтаев, Ю.И. Хорольская, Т.С. Хинтуба, М.И. Блинова**. Сравнительная оценка цитотоксичности антимикробных глазных капель. Вопросы офтальмофармакологии, 2015, VIII (1): 89-97.
41. **Ю.В. Тахтаев, Т.С. Хинтуба, И.Н. Околов, Ю.И. Хорольская, О.И. Александрова, М.И. Блинова**, «Количественная и качественная оценка цитотоксичности антибактериальных глазных капель фторхинолонового ряда *in vitro*». Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук, 2016, 20 (2): 83–90.
42. **Тахтаев Ю.В., Хинтуба Т.С., Околов И.Н.** Анализ цитотоксичности антибактериальных глазных капель фторхинолонового ряда *in vitro*. **IX Российский общенациональный офтальмологический форум**. Сборник научных трудов научно-практической конференции с международным участием. 2016, 2: .474-486.
43. **Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Блинова М.И., Чураков Т.А.** Оценка влияния бензалкония хлорида на цитотоксичность глазных капель Неттацин и Тобрекс в условиях *in vitro*/ Современные технологии в офтальмологии, 2016, (3):163-166.
44. **Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Панова И.Е., Блинова М.И.** Оценка цитотоксичности *in vitro* как критерий рационального выбора слезозаместительных препаратов. Офтальмология. 2018, 15 (2): 167-175.
45. **Блинова М.И., Юдинцева Н.М., Александрова О.И., Баллюзек М.Ф., Хабарова И.Г., Маркин С.М., Чагунава О.Л.** Клинический опыт заживления трофических язв с использованием клеточного продукта «Эквивалент дермальный ДЭ». Здоровье - основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. 2015. 10, (2): 690-694.
46. **А. А. Коцлова, М. А. Биниенко, Н. М. Юдинцева, М. И. Блинова, Т. Д. Власов, В. В. Давыденко**. Опыт применения дермального эквивалента в комплексном лечении синдрома диабетической стопы. Московский хирургический журнал, 2016, 5 (51): 27-33.
47. **Д.О. Вагнер, Е.В. Зиновьев, К.М. Крылов, П.К. Крылов, В.В. Солошенко, Д.В. Костяков, Ю.В. Юркевич, Н.И. Енукашвили, М.И. Блинова, О.И. Александрова, Н.А. Михайлова**. Опыт клинического применения аллогенных фибробластов у пострадавших с

обширными ожогами кожи. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2018.

48. **Т.А. Крылова, А.С. Мусорина, В.В. Зенин, А.М. Кольцова, И.В. Кропачева, В.И. Турилова, Т.К. Яковлева, Г.Г. Полянская** Получение и характеристика неиммortalизованных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослого донора. Цитология, 2016, 58 (11): 850-863.

49. Методы культивирования клеток. Под ред. Пинаева Г.П., Богдановой М.С. СПб. Изд-во Политехн. ун-та. 2008. 278 с.

50. Клеточные технологии для регенеративной медицины. Под ред. Пинаева Г.П., Богдановой М.С., Кольцовой А.М. СПб. Изд-во Политехн. ун-та. 2011. 333 с.

51. **Пинаев Г.П., Блинова М.И., Николаенко Н.С., Полянская Г.П., Ефремова Т.Н., Шарлаимова Н.С., Шубин Н.А.** Клеточная биотехнология: учебное пособие. СПб. Изд-во Политехн. ун-та. 2012. 206 с.

52. Роль цитоскелета в жизнедеятельности культивируемых клеток. Под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой, А.М. Кольцовой. СПб. Изд-во Политехн. ун-та. 2013. 190 с.

**CELL BIOTECHNOLOGY
IN THE INSTITUTE OF CYTOLOGY RAS (ST. PETERSBURG)**

M.I. Blinova

mira.blinova@mail.ru

The article provides information about the direction of research in the field of regenerative medicine, currently being conducted at the Institute of Cytology RAS: development of biomedical cell products (BMCP) in the field of urology, orthopedics, ophthalmology. the development of scaffolds for cellular products, technology for the production of BMCP for clinical use, and the use of cultured cells for drug testing.

Key words: differentiation, regeneration, biomedical cell product, culturing cells, ophthalmology, urology, scaffold.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

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

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

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

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

Адрес редакции: 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4. Институт цитологии РАН.

Отв. редактору Инф. бюлл. «Клеточные культуры» М.С. Богдановой.

Тел.: (812) 297-44-20, 8-911-284-28-64; факс: (812) 297-03-41, 297-42-96.

Электронный адрес: msb2051@rambler.ru

О Г Л А В Л Е Н И Е

Полянская Г.Г.

Развитие коллекции культур клеток позвоночных, созданной профессором Г.Г. Пинаевым.....3

Петухова О.А.

Продолжение науки и жизни – пять лет без Георгия Петровича Пинаева..... 24

Хайтлина С.Ю.

О научной деятельности профессора Г.П. Пинаева: от полиморфизма сократительных систем до роли цитоскелета в передаче сигнала.....35

Блинова М.И.

Клеточные биотехнологии в Институте цитологии РАН
(Санкт - Петербург).....46

Правила для авторов.....65