

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н. К. КОЛЬЦОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



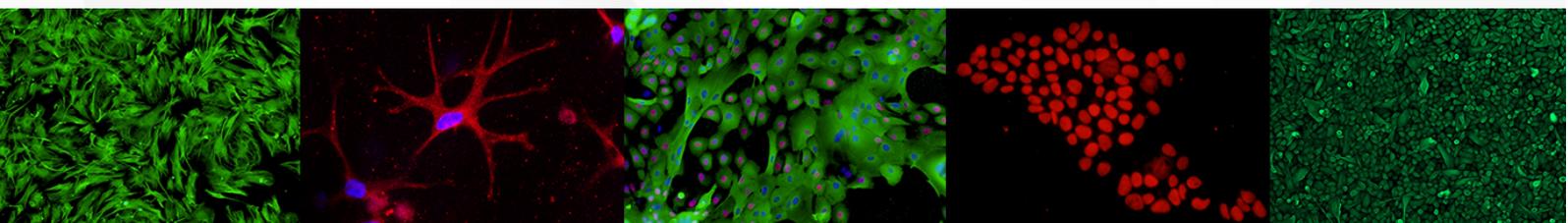
ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ: СОВРЕМЕННЫЕ ВЫЗОВЫ И СЕТЕВЫЕ РЕШЕНИЯ

Сборник тезисов докладов
Всероссийской школы-конференции

22–23 июня 2022 г.

г. Санкт-Петербург



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н. К. КОЛЬЦОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ: СОВРЕМЕННЫЕ ВЫЗОВЫ И СЕТЕВЫЕ РЕШЕНИЯ

Сборник тезисов докладов
Всероссийской школы-конференции
22–23 июня 2022 г., г. Санкт-Петербург

Санкт-Петербург
2022

ББК 28.04:28.05

К60

Коллекции культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения : сборник тезисов докладов Всероссийской школы-конференции, 22–23 июня 2022 г., г. Санкт-Петербург. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2022. – 136 с.

В настоящем сборнике собраны тезисы докладов Всероссийской школы-конференции «Коллекции культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения», прошедшей на базе Института цитологии РАН в Санкт-Петербурге 22–23 июня 2022 г. в рамках Первого научного форума «Генетические ресурсы России» и посвященной вопросам получения и поддержания клеточных линий, их паспортизации, трансформации, расширения фондов коллекций клеточных культур животных и человека, возможностям коллаборации и сетевого взаимодействия, а также использованию клеточных культур в различных генетических и молекулярных исследованиях, разработке клеточных биомедицинских продуктов и для сохранения биоразнообразия.

При поддержке Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации
(Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021)

© Институт биологии развития
им. Н. К. Кольцова Российской академии
наук, 2022

© Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого, 2022

ISBN 978-5-7422-7822-1

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>М.М. Абдурахманова, М.С. Ермаков, О.С. Троицкая, В.А. Рихтер, О.А. Коваль, А.А. Нуштаева</i> Оценка влияния 17 β -эстрадиола и TGF- β на пролиферативный и инвазивный потенциал клеток в составе трехмерных клеточных моделей рака молочной железы.....	9
<i>Э.И. Александер-Синклер, К.Э. Журенков, М.И. Блинова</i> Культуры клеток в стратегии восстановления эпителия роговицы	11
<i>Э.И. Александер-Синклер, С.А. Александрова, Д.М. Дарвиш, Н.В. Едоменко, В.И. Горбач, А.О. Кравченко, И.М. Ермак, Н.А. Михайлова, М.И. Блинова</i> Использование эпителиальных клеток наружной оболочки глазного яблока в качестве тест-систем при разработке липосомальной формы эхинохрома.....	13
<i>С.А. Александрова</i> Возможности использования клеточных культур при разработке биомедицинских клеточных продуктов и материалов для остеопластики.....	15
<i>А.И. Алексеева, А.В. Герасимов, В.В. Куделькина, Н.С. Осипова, С.Ф. Дрозд, А.С. Халанский, Г.В. Павлова, А.М. Косырева</i> Оценка изменения экспрессии онкогенов в экспериментальной глиобластоме крыс 101/8 при терапии PLGA-НЧ, нагруженными доксорубицином.....	17
<i>Е.В. Алпеева, Е.А. Воротеляк</i> Мировая практика биобанкинга и ее реализация в деятельности УНУ Коллекция клеточных культур ИБР РАН	19
<i>Е.В. Алпеева, А.В. Суров, В.П. Куприянов, О.Л. Коломиец, С.М. Матвеевский, А.С. Богданов, И.Ю. Баклушинская</i> Использование культур клеток диких животных для исследования эволюции кариотипов.....	22
<i>А.А. Башарина, К.И. Чандрян, Н.О. Вихлянцева, А.М. Щербаков, А.Л. Михайлова, Т.А. Богуш, В.С. Косоруков</i> Панель культур опухолевых клеток для доклинической оценки влияния цитостатиков на экспрессию PD-L1	24

<i>Ю.М. Берсон, А.Ю. Елизарова, А.В. Соколов, О.А. Цаплина</i> Чувствительность эпителиоподобных опухолевых клеток к различным формам лактоферрина.....	26
<i>Д.Е. Бобков, А.В. Полянская, Д.Ф. Гончарова, Р.Б. Тагаева, Н.М. Юдинцева, А.С. Мусорина, Е.В. Ломерт, Г.Г. Полянская</i> Исследование клеточной подвижности разных линий МСК человека в процессе репликативного старения	28
<i>Д.Е. Бобков, А.В. Полянская, С.Б. Семенова</i> Модель кишечного эпителия как инструмент изучения транселлюлярного транспорта глюкозы	30
<i>Л.В. Болдырева, А.А. Огиенко, К.М. Ачасова, С.С. Сайдакова, Е.Н. Кожевникова</i> Прижизненный имиджинг эксплантов эпителия как перспектива для персонализированной диагностики воспалительных заболеваний кишечника	32
<i>А.С. Гончарова, М.В. Миндарь, Г.Ю. Егоров, Е.Н. Колесников, А.В. Галина, Д.В. Ходакова</i> Изучение эффективности трех протоколов криосохранения в отношении ксенотрансплантатов опухолей желудочно-кишечного тракта.....	34
<i>Д.А. Грехнёв, В.А. Вигонт, О.С. Лебедева, Ю.В. Новикова, А.А. Кручинина, Л.Д. Беликова, С.А. Ключников, Е.В. Казначеева</i> Пациент-специфичные модели нейродегенеративных заболеваний для исследования патологической кальциевой сигнализации	36
<i>И.А. Гривенников, Д.М. Шимченко, Е.В. Новосадова, С.А. Антонов, Н.Ф. Мясоедов, В.З. Тарантул</i> Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека: плюрипотентность свойств и плюрипотентность использования.....	38
<i>Т.М. Гринчук, М.А. Шорохова, Н.А. Пуговкина</i> Продолжительная криоконсервация как возможный фактор дестабилизации клеточного генома <i>in vitro</i>	40
<i>Н.Г. Гурская, Н.А. Евтушенко, А.К. Бейлин, А.К. Косых, Е.В. Алпеева, Е.А. Воротеляк</i> Линии клеток пациентов, страдающих ВБЭ, как модель для изучения механизмов патогенеза и подбора метода генотерапии	42
<i>Д.М. Дарвиш, Е.С. Лапина</i> Фибриллярные коллагеновые материалы для клеточного культивирования	44

<i>Н.И. Дергачева, И.О. Сучкова, Л.К. Сасина, Т.В. Баранова, Е.Л. Паткин</i> Культуры клеток человека в токсикоэпигеномных исследованиях	46
<i>А.С. Жданова, И.Н. Стручкова, И.С. Владимиров, Е.И. Радион, В.Е. Мухин</i> Получение нейтральных клеток-предшественников из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с использованием метода двойного ингибирования SMAD	48
<i>И.И. Захаров, П.А. Веселова, А.А. Саидова, М.А. Савицкая, Г.Е. Онищенко</i> Анализ изменения фенотипа клеток NaCaT и A431 при помощи CellProfiler	50
<i>В.П. Иванова</i> Влияние С-концевого фрагмента гистона H3 на миграционную и адгезивную активность фибробластов	52
<i>В.П. Иванова</i> Использование клеточных культур человека и животных при моделировании клеточного ответа	54
<i>Н.А. Калинина, А. А. Мальченкова, Е.Н. Кособокова</i> Стратегия контроля качества клеточных линий человека и животных в биоресурсной коллекции	56
<i>М.В. Каримова</i> Выделение, культивирование и криоконсервация эмбриональных и постнатальных панкреатических островков мыши	58
<i>Д.Д. Каримов, Э.Р. Кудояров, Т.Г. Якупова, Э.Ф. Репина, Д.О. Каримов</i> Протекторные свойства комплексного соединения 5-гидрокси-6-метилурацила с аскорбиновой кислотой <i>in vitro</i>	60
<i>Д.А. Костина, А.А. Лобов, Р.М. Тихилов, С.А. Божкова, А.П. Середа, В.В. Карелкин, А.Б. Малашичева</i> Методика получения, характеристика и перспективы использования культур клеток остеобластов из кости человека	63
<i>П.Д. Котова</i> Моноклональная линия клеток, экспрессирующих сенсоры внутриклеточных cAMP и Ca ²⁺	65
<i>Н.В. Кошелева, М.А. Пешкова, П.Ю. Бикмулина, П.И. Котенева, Ю.М. Ефремов, А.И. Шпичка, И.М. Зурина, И.Н. Сабурина, Син-Цзе Лянь</i> Сфероиды из соматических клеток человека в фундаментальных и прикладных исследованиях	67

<i>В.В. Куделькина, А.И. Алексеева, А.С. Халанский, А.М. Косырева</i> Коллекция экспериментальных опухолей нервной системы – тканевые штаммы и клеточные линии.....	69
<i>А.Ю. Кулибин, Е.А. Малолина</i> Исследование способности Сертоли-подобных клеток сети яичка мышы поддерживать развитие половых клеток <i>in vitro</i>	71
<i>А.К. Лейберова, Ю.С. Храмцова</i> Перспективы использования культуры тучных клеток.....	73
<i>А.В. Лопухов</i> Использование фетальных фибробластов для получения клонированных эмбрионов свиней.....	75
<i>А.А. Мальченкова, Е.Н. Кособокова</i> Подтверждение подлинности клеточных линий методом профилирования на основе коротких tandemных повторов.....	77
<i>А.Г. Мензоров</i> Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общеприкладного и биомедицинского направления ИЦИГ СО РАН	79
<i>Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов</i> Нейролептик галоперидол подавляет Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном, в культивируемых перитонеальных макрофагах крысы	81
<i>Е.И. Моргун, А.Г. Золкин, А.С. Микаелян, Н.О. Дашенкова, Е.А. Воротеляк</i> Экспрессия протеинкиназ RIPK1 и RIPK3 в культуре кератиноцитов человека линии HaCaT	83
<i>А.В. Моршнева, О.О. Гнедина, Д.Н. Киндт, С.Д. Лосев, М.В. Иготти</i> Возможность использования сыворотки крупного рогатого скота в качестве альтернативы телячьей эмбриональной сыворотке (FCS) для культивирования опухолевых клеточных линий A549 и HCT 116	85
<i>М.И. Мурашева, О.П. Кисурина-Евгеньева, Д.М. Поташикова, Г.Е. Онищенко</i> Элиминация клеток с микроядрами в культуре иммортализованных кератиноцитов человека HaCaT	87
<i>Д.Д. Новак, О.С. Троицкая, А.А. Нуштаева, М.Е. Варламов, О.А. Коваль</i> 3D-модель на основе клеток MCF7, гиперэкспрессирующих EGFR, как инструмент для исследования противоопухолевых таргетных препаратов.....	89

<i>Ю.А. Новикова, О.С. Роговая, А.Н. Попова, А.Д. Финошин, Е.А. Воротеляк</i>	
Исследование влияния криохранения на жизнеспособность клеток кожи и динамику популяции эпидермальных клеток	91
<i>А.А. Нуштаева, М.М. Абдурахманова, М.С. Ермаков, В.А. Рихтер, Т.А. Гайнер, О. А. Коваль</i>	
Создание панели культур клеток рака молочной железы для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов	93
<i>П.А. Поляков, А.В. Артемов, Ю.А. Нащекина</i>	
Структурные и функциональные характеристики красного пигмента дрожжей <i>S.cerevisiae</i>	95
<i>Г.Г. Полянская</i>	
Научная и практическая деятельность коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН на протяжении 45 лет своего существования	97
<i>О.А. Рогачевская</i>	
Получение моноклональных клеточных линий, экспрессирующих экзогенные GPCR и генетически кодируемые сенсоры	99
<i>А.А. Рябинин, Е.П. Калабушева, Е.А. Воротеляк</i>	
Морфогенез кожи в модели дифференцировки эмбрионидных телец из ИПСК человека в кожные органоиды	101
<i>Г.Н. Сингина, А.В. Лопухов, Н.П. Тарадайник, Е.Н. Шедова, Т.Е. Тарадайник, Н.А. Зиновьева</i>	
Практические аспекты технологии получения клонированного потом- ства с использованием соматических клеток домашней коровы (<i>Bos taurus taurus</i>)	103
<i>А.Г. Соболева, И.В. Арутюнян, П.А. Вишнякова, А.В. Ельчанинов, В.В. Польшкин, М.В. Ратушный, А.П. Поляков, К.Б. Гордон, Т.Х. Фатхудинов</i>	
<i>In vitro</i> модель опухолей области головы и шеи	105
<i>Е.К. Тарасова, А.Г. Масютин, Д.А. Самсонов, М.В. Ерохина</i>	
Биодеградация углеродных наночастиц макрофагами ТНР-1 и RAW264.7	107
<i>С.В. Тимофеева, С.Ю. Филиппова, А.О. Ситковская, Н.В. Гненная, И.В. Межесова, Т.В. Шамова, И.А. Новикова, О.И. Кит</i>	
Биоресурсная коллекция первичных опухолей и клеточных линий ФГБУ НМИЦ онкологии Минздрава России	109
<i>Ю. Транова, М.И. Поветко</i>	
Клетки Сасо-2 как модель для изучения активности белка устойчивости к раку молочной железы	111

<i>Е.П. Турищева, Г.А. Ашниева, Е.А. Смирнова</i> Изучение влияния индуктора стресса ЭПР ДТТ на морфологию культивируемых клеток соединительнотканного происхождения.....	113
<i>Е.В. Улас, Е.С. Надеждина, А.В. Бураков</i> Экспрессия малой ГТФазы Arl7 регулируется различными сигнальными путями в клеточных линиях человека и зеленой мартышки	115
<i>Ю.И. Хорольская, Д.А. Переплетчикова, К.Э. Журенков, Э.И. Александер-Синклер, Д.В. Качкин, И.С. Иванова, Н.А. Михайлова, М.И. Блинова</i> Получение и характеристика меченных зеленым флуоресцентным белком лимбальных стволовых клеток и их потенциал для исследований в области регенеративной офтальмологии	117
<i>И.В. Чистякова, Н.И. Бакаленко, А.Б. Малашичева</i> Резидентные лёгочные фибробласты: методика получения, характеристика культуры и перспективы ее использования.....	119
<i>А.С. Шахов, П.А. Ковалева, И.Б. Алиева</i> Линия клеток EA.hy926 как модельная система для исследования цитоскелетных структур в эндотелиоците	121
<i>М.А. Тихомирова, А.А. Валяева, А.А. Жарикова, А.Н. Богомазова, Я.Р. Мусинова, А.А. Миронов, Е.С. Васецкий, Е.В. Шеваль</i> Изучение эффектов Tat белка вируса иммунодефицита человека с использованием клеточных моделей	123
<i>В.О. Чагин, С.Н. Литвинчук</i> Первичные культуры клеток амфибий.....	125
<i>О.Н. Шевелева, Т.А. Ненашева, Н.Н. Буторина, С.П. Медведев, Е.В. Григорьева, Е.А. Протасова, И.В. Лядова</i> Получение генетически модифицированных ИПСК с повышенной экспрессией TNFAIP3	126
<i>А.И. Шевченко, А.М. Арссан, С.М. Закиян, И.С. Захарова</i> Гетерогенность эпигенетического статуса X-хромосом в культурах плюрипотентных стволовых клеток человека: проблемы и подходы к решению	128
<i>Е.Н. Шедова, Г.Н. Сингина</i> Оценка возможности получения культуры соматических клеток с использованием тканевого материала уха погибшего животного.....	130
<i>Т.К. Яковлева, В.И. Турилова</i> Цитогенетический анализ как неотъемлемый элемент паспортизации клеточных линий.....	132

М.М. Абдурахманова^{1,2}, М.С. Ермаков¹,
О.С. Троицкая¹, В.А. Рихтер¹,
О.А. Коваль^{1,2}, А.А. Нуштаева¹

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ 17 β -ЭСТРАДИОЛА И TGF- β
НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ И ИНВАЗИВНЫЙ
ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК В СОСТАВЕ ТРЕХМЕРНЫХ
КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

M.M. Abdurakhmanova^{1,2}, M.S. Ermakov¹,
O.S. Troitskaya¹, V.A. Richter¹,
O.A. Koval^{1,2}, A.A. Nushtaeva¹

**EVALUATION OF THE INFLUENCE OF 17 β -ESTRADIOL AND
TGF- β ON THE PROLIFERATIVE AND INVASIVE POTENTIAL
OF CELLS IN THREE-DIMENSIONAL CELLULAR MODELS
OF BREAST CANCER**

m.savinkova@g.nsu.ru

Линии клеток рака молочной железы (РМЖ) широко используются для исследований в области онкологии. Для 2D-культур характерна измененная морфология клеток, отсутствие градиентов кислорода и факторов роста и неспособность воспроизводить тканеподобную архитектуру. 3D-модели или клеточные сфероиды позволяют преодолеть недостатки 2D-культур, вследствие чего востребованы в исследованиях противоопухолевых препаратов *in vitro*. Гетерогенные сфероиды (3D-2), содержащие опухолевые и стромальные клетки, более релевантные модели РМЖ.

Цель исследования заключалась в конструировании 3D-2-моделей РМЖ и анализе пролиферативных и инвазивных свойств клеток в составе сфероидов при стимуляции 17 β -эстрадиолом (E2) и TGF- β .

В качестве опухолевого компонента использовали линии клеток РМЖ, гормон-зависимые — MCF-7 и гормон-независимые —

MDA-MB-231 и SK-BR-3. В качестве стромального компонента — персональные культуры фибробластов BrC4f, BrC120f и BN120f. Культивирование сфероидов проводили в двух режимах: 1) моно-культивирование (3D), при котором сфероиды формировались только из опухолевых клеток; 2) со-культивирование опухолевых и стромальных клеток (3D-2 модель).

Подобраны одинаковые условия для культивирования гетерогенных сфероидов РМЖ для всех типов опухолевых клеток. Стромальные клетки способствуют формированию сфероидов и образуют центральный каркас, а опухолевые клетки — их внешний слой.

E2 стимулирует пролиферацию клеток в составе 3D-2 моделей вне зависимости от типа опухолевых клеток. E2 влияет на самоорганизацию сфероидов в микроткань из клеток гормон-зависимой линии MCF-7. TGF- β увеличивает пролиферации клеток гормон-независимой культуры SK-BR-3 в составе 3D- и 3D-2 моделей РМЖ. Инвазивный потенциал клеток MDA-MB-231 в составе 3D-2 моделей повышается при стимуляции E2, а при стимуляции TGF- β — снижается.

Таким образом, была сконструирована релевантная 3D-модель культивирования клеток РМЖ. Такие разработки устраняют разрыв между 2D- и моделями *in vivo*.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ (грант № 20–74–10039).

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

doi:10.18720/SPBPU/2/id22-96

Э.И. Александер-Синклер¹,
К.Э. Журенков¹, М.И. Блинова¹

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК В СТРАТЕГИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ

E.I. Aleksander-Sinkler¹,
K.E. Zhurenkov¹, M.I. Blinova¹

CELL CULTURES IN THE STRATEGY OF RECOVERY OF THE CORNEAL EPITHELIUM

elga.aleks@gmail.com

Являясь передней частью наружной оболочки глаза, роговица подвержена воздействию агрессивных факторов внешней среды, способных привести к ее повреждению. Восстановление роговицы во многом связано с регенеративным потенциалом ее многослойного плоского эпителия и зависит от целостности ниши лимбальных стволовых клеток. Нарушение целостности эпителия роговицы вследствие травм, инфекции или дефицита лимбальных стволовых клеток может привести к слепоте. Консервативное лечение патологий роговицы требует длительного времени и не всегда гарантирует восстановление её свойств и функций. Длительное применение местных препаратов может вызывать нежелательные изменения в структуре глазной поверхности, вследствие чего возникает необходимость применения хирургических методов лечения. В связи спостоянным увеличением количества пациентов с роговичной слепотой, которым необходимо хирургическое вмешательство в виде трансплантации роговицы, остро стоит вопрос о разработке альтернативных методов терапии. За последние десятилетия появился целый ряд новых возможностей, напрямую связанных с развитием клеточных технологий. В настоящее время стратегию на основе культивируемых клеток используют для создания эквивалентов роговицы разных уровней сложности. Такие эквиваленты могут

быть использованы как для замены ткани роговицы при трансплантации, так и в качестве потенциальных моделей роговицы *in vitro* для исследования механизмов реэпителизации роговицы и скрининга фармакологических свойств и токсикологических характеристик лекарственных препаратов. Актуальным является поиск источников клеток и материалов для создания эффективных эквивалентов роговицы, которые могут стать инструментом для открытия новых вариантов ее лечения.

Из биоптатов роговичного лимба и слизистой нижней губы, представляющих собой эпителиально-стромальные комплексы, нами были выделены и введены в культуру мультипотентные стволовые клетки (МСК) человека и кролика. Проведена оценка биосовместимости этих клеток со скаффолдами на основе амниотической мембраны и коллагеновых гелей. Эксперименты *in vivo* на кроликах продемонстрировали высокий потенциал использования таких конструкций для восстановления эпителия роговицы при лимбальной недостаточности. Полученные МСК и эпителиальные клетки конъюнктивы и роговицы человека были успешно использованы как тест-системы для скрининга фармакологических свойств и токсикологических характеристик глазных капель различных фармакологических групп в целях рационального подбора фармакотерапии.

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

Э.И. Александер-Синклер¹,
С.А. Александрова¹, Д.М. Дарвиш¹,
Н.В. Едоменко¹, В.И. Горбач²,
А.О. Кравченко², И.М. Ермак²,
Н.А. Михайлова¹, М.И. Блинова¹

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА-
РУЖНОЙ ОБОЛОЧКИ ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА В КАЧЕСТВЕ
ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ
ФОРМЫ ЭХИНОХРОМА**

E. I. Aleksander-Sinkler¹,
S.A. Aleksandrova¹, D.M. Darvish¹,
N.V. Edomenko¹, V.I. Gorbach²,
A.O. Kravchenko², I.M. Yermak²,
N.A. Mikhailova¹, M.I. Blinova¹

**EPITHELIAL CELLS OF THE OUTER SHELL
OF THE EYEBALL AS TEST SYSTEMS IN THE DEVELOPMENT
OF A LIPOSOMAL FORM OF ECHINOCROME**

elga.aleks@gmail.com

Липосомы успешно применяются в различных областях медицины как средство доставки лекарственных препаратов. Большой интерес представляет разработка липосом, содержащих комплекс природных соединений морского происхождения каррагинан и эхинохром (CRG/Ech-containing liposomes), для местного применения в офтальмологии. Важной задачей местного применения лекарств при лечении глаз является достижение высоких концентраций лекарственного средства без повреждения поверхности глаза. При изучении фармакологических свойств и токсикологических характеристик лекарственных препаратов широкое применение получают методы тестирования с использованием клеточных линий человека.

В нашем исследовании при разработке CRG/Ech-containing liposomes была проведена оценка влияния липосом, несущих эхинохром (Ech) и каррагинан (CRG), и их отдельных структурных компонентов на жизнеспособность культивируемых клеток. В качестве тест-систем были использованы линии эпителиальных клеток наружной оболочки глазного яблока: клетки конъюнктивы (Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4) и эпителия роговицы человека (HCE). В качестве методов оценки использовали МТТ-тест и морфологический анализ.

Исследование выявило, что Ech, присутствуя в питательной среде в одной и той же концентрации (0,1 мг/мл), но в различной форме, оказывает различное действие на клетки. Влияние раствора Ech оказалось критичным для жизнеспособности клеток обеих тест-систем. Ech в комплексе с CRG оказывал сильное токсическое действие только на клетки эпителиа роговицы, а жизнеспособность клеток конъюнктивы при этих условиях составила около 50%. Ech, включенный в CRG/Ech-containing liposomes, не оказал цитотоксического действия на клетки обеих тест-систем.

Скрининг цитотоксичности в условиях *in vitro* с использованием клеточных тест-систем выявил, что липосомальная форма эхинохрома является безопасной для эпителиальных клеток наружной оболочки глазного яблока и может быть исследована на эффективность в качестве лекарства в дальнейшем.

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

² Тихоокеанский институт биоорганической химии Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия
Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia

**ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ
КУЛЬТУР ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОМЕДИЦИНСКИХ
КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ И МАТЕРИАЛОВ
ДЛЯ ОСТЕОПЛАСТИКИ**

**POSSIBILITIES OF USING CELL CULTURES IN THE
DEVELOPMENT OF BIOMEDICAL CELL PRODUCTS AND
MATERIALS FOR OSTEOPLASTY**

alekssvet2205@gmail.com

Несмотря на широкий выбор материалов и устройств для остеопластики, до конца нерешенными остаются проблемы, возникающие при их взаимодействии с организмом пациента: воспалительная реакция, нестабильность, изнашиваемость и др. Многолетний опыт показал, что остеопластические материалы должны обладать не только нужными физико-химическими характеристиками и биосовместимостью, но и оказывать локальный лечебный эффект и стимулировать репаративные процессы в поврежденных тканях. Использование клеточных культур открывает большие возможности для решения этих задач.

В настоящее время в процессе разработки материалов и устройств, предназначенных для восстановления костных тканей, в качестве тест-систем для определения биосовместимости и возможной цитотоксичности активно применяют трансформированные клеточные линии соединительно-тканного происхождения, предпочтительно – остеогенной природы. Появление охарактеризованных линий мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (МСК), способных к остеогенной дифференцировке, дало возможность исследовать материалы на наличие остеоиндуктивных свойств. Нормальный кариотип, выработка биологически-активных веществ

и способность к длительной пролиферации без изменения основных свойств позволяют считать их потенциально пригодными для использования в заместительной клеточной терапии костной и других тканей.

Совместно с сотрудниками Отделения фтизиоостеологии и ортопедии НИИ Фтизиопульмонологии МЗ РФ в рамках НИР по разработке остеозамещающего биомедицинского клеточного продукта (БМКП) для остеопластики дефектов, вызванных туберкулезом, была создана тканеинженерная конструкция (ТИК). В процессе ее создания исследовали цитотоксичность различных по происхождению и составу остеопластических материалов («Биосит Ср-Элкор», OSTEOSET T, Orthoss, ЛитАр) с использованием тест-систем на основе трансформированных клеточных линий остеогенной природы и МСК костного мозга. Наименее токсичным для клеток оказался стеклокристаллический материал «Биосит Ср-Элкор» (биоситалл). Также было выявлено, что коллагеновый гель способствует повышению биосовместимости биоситалла с клетками. Кроме того, было показано, что оба этих компонента обладают остеоиндуктивным эффектом в отношении МСК. Применение разработанной ТИК, состоящей из биоситалла и МСК костного мозга, заключенных в коллагеновый гель, в экспериментах *in vivo* на кроликах ускорило зарастание сформированного экспериментального дефекта передней пластины метафизарной части бедренной кости кроликов.

Проведенное исследование продемонстрировало высокий потенциал использования клеточных культур при разработке БМКП и сопутствующих материалов для остеопластики.

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

А.И. Алексеева^{1,2}, А.В. Герасимов³,
В.В. Куделькина¹, Н.С. Осипова⁴,
С.Ф. Дрозд⁵, А.С. Халанский¹,
Г.В. Павлова², А.М. Косырева¹

**ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ОНКОГЕНОВ
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЕ КРЫС 101/8
ПРИ ТЕРАПИИ PLGA-НЧ, НАГРУЖЕННЫМИ
ДОКСОРУБИЦИНОМ**

A.I. Alekseeva^{1,2}, A.V. Gerasimov³,
V.V. Kudelkina¹, N.S. Osipova⁴,
S.F. Drozd⁵, A.S. Khalansky¹,
G.V. Pavlova², A.M. Kosyreva¹

**EVALUATION OF CHANGES IN ONCOGENES EXPRESSION
IN EXPERIMENTAL 101/8 RAT GLIOBLASTOMA DURING
THERAPY OF PLGA-NP LOADED WITH DOXORUBICIN**

mariott@bk.ru

Глиобластома – злокачественное новообразование, характеризующееся крайне агрессивным ростом, устойчивостью к химиотерапии и низкой выживаемостью пациентов. Одной из причин, обуславливающих неблагоприятное течение заболевания, является поздняя постановка диагноза и, как следствие, отсроченное начало терапии.

В предыдущих исследованиях показана высокая эффективность наносомальных форм доксорубицина (докс-PLGA) в отношении интракраниальной глиобластомы 101.8 крыс. Целью данной работы была сравнительная оценка уровня экспрессии основных онкогенов глиобластомы при отсроченном начале терапии доксорубицином и докс-PLGA на 8, 11 и 14 сутки после имплантации опухоли.

По сравнению с нелечеными животными при терапии докс-PLGA в периферической зоне опухоли выявлено увеличение уровня

экспрессии маркера пролиферации Melk в 9,2 раза и гена-маркера множественной лекарственной устойчивости Abcb1b, кодирующего р-гликопротеин, – в 5,4 раза. При терапии доксорубицином в центральной зоне опухоли наблюдалось увеличение уровня экспрессии маркера плюрипотентности Sox2 в 3,1 раз, тогда как при лечении докс-PLGA было выявлено его снижение в 23,1 раза. Таким образом, повышение уровня экспрессии Melk и Abcb1b в результате терапии докс-PLGA свидетельствует об увеличении степени злокачественности опухоли и повышении её устойчивости к химиотерапии цитостатиками, что, возможно, определяется поздними сроками начала терапии глиобластомы 101.8. В то же время существенное увеличение экспрессии онкомаркеров в периферической зоне опухоли свидетельствуют о накоплении докс-PLGA в опухолевых клетках и подтверждает эффективность адресной доставки доксорубицина в составе наночастиц.

¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия
Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Москва, Россия

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Moscow, Russia

³ МИРЭА – российский технологический университет, Москва, Россия
MIREA – Russian Technology University, Moscow, Russia

⁴ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

⁵ НМИЦ нейрохирургии им Н.Н. Бурденко, Москва, Россия.

Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery, Moscow, Russia

Е.В. Алпеева¹,
Е.А. Воротеляк¹

**МИРОВАЯ ПРАКТИКА БИОБАНКИНГА И ЕЕ РЕАЛИЗАЦИЯ
В ДЕЯТЕЛЬНОСТИ УНУ КОЛЛЕКЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ
КУЛЬТУР ИБР РАН**

E.V. Alpeeva¹,
E.A. Vorotelyak¹

**WORLD BIOBANKING PRACTICE
AND ITS IMPLEMENTATION IN THE OPERATION
OF THE CELL CULTURE COLLECTION OF IDB RAS**

Alpeeva_l@mail.ru

Предпосылками создания коллекций клеточных культур человека и животных явились: получение первых перевиваемых линий в начале 1950-х гг., разработка сред для культивирования и стандартизация методов культивирования (Уилтон Ерл и Дж. О. Гей, 1940-е гг.), открытие цитопротекторных свойств криопротекторов (глицерол, DMSO – 1940–60-е гг.). Появившиеся возможности получения и сохранения клеточных линий привели к созданию коллекций клеточных культур для нужд исследователей и клеточных банков для коммерческих целей. Крупнейшие мировые коллекции на сегодня: американская коллекция ATCC, функционирующая с 1959–1962 гг., немецкая DSMZ, ведущая отсчет с 1969 г., европейская коллекция ECACC, основанная в 1985 г., клеточный банк Riken, образованный в 1989 г. в Японии. Основные задачи коллекций – это сбор, идентификация клеточного материала, его хранение и распространение. Однако помимо этого коллекции часто депонируют авторские линии в связи с процедурой патентования, выполняют заказные исследования и работы, такие как идентификация клеточных линий, тестирование наличия контаминации микоплазмой, наращивание клеточной биомассы, организация

мастер- и рабочих банков, участие в разработке и тестировании ЛС, а также являются крупными центрами аккумуляции знаний в области работы с клеточными линиями, проводят обучение и выпускают учебные материалы. Крупнейшие коллекции насчитывают тысячи различных линий клеток человека и животных и поставляют их в различные страны. Стоимость одной линии составляет в среднем 500 \$, однако доставка в Россию в особых условиях в замороженном виде повышает цену материала для конечного российского пользователя в разы, а в данный момент основные коллекции перестали принимать заказы из России. Поэтому крайне актуальной задачей является поддержание, развитие и расширение отечественных коллекций.

В России крупнейшая коллекция клеток позвоночных получила свой официальный статус в 1978 г. Она появилась на базе Института цитологии РАН под руководством Г.П. Пинаева. В 2015 г. началась работа по возрождению коллекционной деятельности в нашей стране, которая сильно пострадала после распада СССР. Основными достижениями данной работы стали: инвентаризация уцелевших и появившихся новых коллекций, разработка стандартных операционных процедур (СОП) коллекций, расчет стоимости их выполнения, создание единого портала биоресурсных коллекций (БРК), регистрация коллекций на сайте skr.rf (в качестве ЦКП и УНУ), обновление приборной базы.

Одной из коллекций, вошедших в программу по поддержанию БРК, стала Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) ИБР РАН (ККК ИБР). В ее работе используются международные стандарты коллекционной деятельности: следование СОП в культуральной работе, STR-профилитрование клеточных линий для их аутентификации, проверка наличия контаминации микоплазмой, паспортизация клеточных линий по международному образцу, двухуровневая организация клеточного банка, электронная система регистрации образцов. ККК ИБР на данный момент насчитывает около 190 клеточных линий человека и различных животных (обезьян, мышей, кроликов, хомяков,

слепушонков, свиней и т. д.). Среди них линии первичных, опухолевых, иммортализованных, генномодифицированных клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Количество клеточных линий коллекции постоянно растет. Пользователями коллекции являются различные научно-исследовательские институты, образовательные учреждения, коммерческие организации. На базе ККК ИБР также проводятся заказные исследования на имеющихся клеточных линиях. Таким образом, ККК ИБР является одной из ведущих коллекций клеточных культур человека и животных в России.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

Е.В. Алпеева¹, А.В. Суров²,
В.П. Куприянов², О.Л. Коломиец³,
С.М. Матвеевский³, А.С. Богданов¹,
И.Ю. Баклушинская¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК ДИКИХ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭВОЛЮЦИИ КАРИОТИПОВ

E.V. Alpeeva¹, A.V. Surov²,
V.P. Kupriyanov², O.L. Kolomiets³,
S.M. Matveevsky³, A.S. Bogdanov¹,
I.Yu. Bakloushinskaya¹

APPLICATION OF CELL CULTURES OBTAINED FROM WILD ANIMALS FOR THE EVALUATION OF KARYOTYPE EVOLUTION

Alpeeva_l@mail.ru

Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ККК ИБР) является одной из крупнейших и разнообразнейших коллекций клеток человека и животных в России. Задача коллекционной деятельности ККК ИБР заключается в депонировании наряду с различными клетками лабораторных животных и человека также клеток диких животных для сохранения труднодоступного биологического материала, который может быть впоследствии использован для различных, в том числе генетических, исследований. В данный момент в коллекции имеются клетки слепушонок, сурков, различных видов хомяков.

Линии клеток диких животных широко используются для получения качественных хромосомных препаратов при изучении эволюции кариотипов и половых хромосом с использованием методов молекулярной цитогенетики и цитогенетического анализа

геномных данных: микродиссекции определенных локусов или целых хромосом; хромосомного пэйнтинга с цельнохромосомными или локус-специфическими пробами; сравнительной геномной гибридизации.

Культуры фибробластов и хондроцитов самцов и самок слепушонок *Ellobius alaicus* были использованы в исследовании механизма возникновения робертсоновских транслокаций у этого вида животных [1]. Основным результатом по анализу культуры клеток стало обнаружение неустойчивости хромосомного набора в соматических клетках *in vitro*, особенно хондроцитах. Зафиксированные множественные разнотипные нарушения в культуре (анеуплоидные метафазные пластинки, микроядра, анафазные мосты, хромотрипсис и др.) не были обнаружены при анализе митотических хромосом, полученных прямым методом из костного мозга. Таким образом, для эволюционных исследований следует с осторожностью использовать хромосомные наборы из культуры клеток, так как выявляемые в них изменения кариотипа могут не соответствовать тем процессам, что происходят в природных популяциях. Рекомендуются использовать клетки разных тканей и контроль в виде хромосомных препаратов, полученных прямым методом.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021, грантом РФФИ 20-04-00102.

Литература:

1. Matveevsky S., Kolomiets O., Bogdanov A., Alpeeva E., Bakloushinskaya I. Meiotic chromosome contacts as a plausible prelude for Robertsonian translocations. *Genes*. 2020; 11(4):386.

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

² Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия
Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russia

³ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия
Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

А.А. Башарина¹, К.И. Чандран¹,
Н.О. Вихлянцева¹, А.М. Щербаков¹,
А.Л. Михайлова¹, Т.А. Богуш¹, В.С. Косоруков¹

**ПАНЕЛЬ КУЛЬТУР ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ
ЦИТОСТАТИКОВ НА ЭКСПРЕССИЮ PD-L1**

A.A. Basharina¹, K.I. Chandran¹,
N.O. Vikhlyantseva¹, A.M. Scherbakov¹,
A.L. Mikhailova¹, T.A. Bogush¹, V.S. Kosorukov¹

**TUMOR CELL CULTURE PANEL FOR PRECLINICAL
EVALUATION OF THE EFFECT OF CYTOSTATICS
ON PD-L1 EXPRESSION**

basharinaa@inbox.ru

Иммунотерапия – это современный тренд лечения злокачественных новообразований, при этом комбинированное применение классических цитостатиков в ряде случаев позволяет повысить эффективность, хотя в других – не изменяет или даже ухудшает результат лечения. Эти данные демонстрируют необходимость доклинической оценки воздействия цитостатиков на экспрессию мишени ингибиторов контрольных точек иммунитета PD-L1 для прогнозирования их влияния на эффективность иммунотерапии.

Целью настоящего исследования явилось создание панели культур клеток, охарактеризованных по экспрессии PD-L1, для оценки воздействия противоопухолевых препаратов на эту мишень ингибиторов контрольных точек иммунитета.

Материалы и методы. Иммунофлуоресцентным методом и проточной цитометрией экспрессия PD-L1 исследована в клетках человека 14 культур: рак молочной железы: HCC-1954, MDA-MB-231, MCF-7 и T47D; рак яичников: EFO-21, NCI/ADR-RES, SK-OV-3 и COLO-704; рак простаты: 22Rv1 и DU-145; рак легкого A-549; рак желудка SNU-1; карцинома кожи A-431. Используются первичные антитела к PD-L1 (Arigo, клон SQab1716) и вторичные –

конъюгированные с DyLight®650 (ab98510). Оценены показатели экспрессии PD-L1: уровень (%) – количество специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля (инкубация только с вторичными антителами); интенсивность – отношение среднего геометрического интенсивности флуоресценции в опытном образце к контролю (усл. ед.); индекс – интегральный показатель, равный произведению интенсивности и уровня экспрессии, деленному на 100 (усл. ед.). Анализ результатов, полученных на проточном цитометре Beckman Coulter Navios, проведён с использованием критерия Колмогорова-Смирнова, программ WinMDI 2.9 и FlowJo 10.0.8.

Результаты. В исследованном ряду выявлены три группы культур клеток. В 57% случаев клетки характеризуются умеренными показателями уровня, интенсивности и индекса экспрессии маркера, которые в 1,4; 1,3 и 1,6 раза превышают соответствующие показатели в клетках с низкой экспрессией PD-L1. В этой группе, как и в группе с высокой экспрессией PD-L1, оказалось около 20% исследованных культур. При этом уровень, интенсивность и индекс экспрессии PD-L1 были выше показателей в группе с низкой экспрессией маркера в 2,0; 1,8 и 3,4 раза, соответственно. Обращает на себя внимание, что клетки HCC-1954 и MDA-MB-231, «лидирующие» по экспрессии PD-L1, относятся к высоко агрессивным подтипам рака молочной железы.

Выводы. Охарактеризованная по количественным показателям экспрессии PD-L1 панель культур клеток человека, полученных из опухолей разных локализаций и разного гистогенеза, может рассматриваться как доклиническая модель для оценки характера потенциального воздействия противоопухолевых препаратов на мишень ингибиторов контрольной точки иммунитета PD-L1 с целью прогнозирования эффективности их совместного применения.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение о субсидии № 075-15-2021-1060 от 28.09.2021 года.

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия
Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

Ю.М. Берсон¹,
А.Ю. Елизарова²,
А.В. Соколов²,
О.А. Цаплина¹

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭПИТЕЛИОПОДОБНЫХ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К РАЗЛИЧНЫМ ФОРМАМ
ЛАКТОФЕРРИНА**

Y.M. Berson¹,
A.Yu. Elizarova²,
A.V. Sokolov²,
O.A. Tsaplina¹

**SENSITIVITY OF EPITHELIAL-LIKE TUMOR CELLS
TO DIFFERENT FORMS OF LACTOFERRIN**

juletschka.ber@gmail.com

Лактоферрин (ЛФ) — железо-связывающий гликопротеин, присутствующий в молоке и экзокринных секретах преимущественно в свободной от железа апо-форме (апо-ЛФ). ЛФ участвует в обмене железа, обладает антимикробной и противовирусной активностью, антиоксидантными, противоопухолевыми и ферментативными свойствами. Известно, что степень насыщения железом влияет на противораковые свойства ЛФ. В экспериментах на клеточных линиях апо-ЛФ стимулировал пролиферацию клеток Сасо-2, а применение насыщенного железом ЛФ (холо-ЛФ) индуцировало апоптоз клеток MDA-MB-231 и MCF-7. При этом было показано избирательное противораковое действие ЛФ на примере клеток карциномы легкого A549 и нормальных клеток бронхиального эпителия человека (NHBE). Известно, что ЛФ может взаимодействовать с олеиновой кислотой с образованием комплекса, обладающего большим противоопухолевым действием, чем ЛФ, что было показано как на мышинной, так и на клеточных моделях.

Целью данной работы являлось сравнение противоопухолевого действия апо- и холо-форм рекомбинантного лактоферрина человека, а также комплекса холо-ЛФ с олеиновой кислотой (ЛФ-ОК). В экспериментах на мышах нами было показано, что ЛФ в разном количестве накапливается в органах (легкие, печень, почки). Поэтому было решено исследовать чувствительность клеточных линий из этих органов к различным формам ЛФ. Из Коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН нами были получены следующие эпителиоподобные клеточные линии карцином человека: легкого А549, печени HepG2, почки ОКР-GS, кишечника Сасо-2, шейки матки М-HeLa. С помощью конфокальной микроскопии было показано, что в ряду апо-ЛФ→холо-ЛФ→ЛФ-ОК чувствительность клеток к данным веществам возрастает (т.е. холо-ЛФ проникает в клетки карцином в большей степени, чем апо-ЛФ), что, вероятно, объясняет лучшее цитотоксическое действие ЛФ-ОК не только *in vitro*, но и *in vivo*. При этом в меньшей степени апо-ЛФ проникает в клетки А549, что согласуется с данными, полученными на животной модели (в легких мыши апо-ЛФ накапливается в наименьшем количестве). Таким образом, клеточные культуры являются достоверной моделью для оценки действия различных веществ.

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Д.Е. Бобков^{1,2}, А.В. Полянская¹,
Д.Ф. Гончарова², Р.Б. Тагаева^{1,2},
Н.М. Юдинцева^{1,2}, А.С. Мусорина¹,
Е.В. Ломерт¹, Г.Г. Полянская¹

**ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ
РАЗНЫХ ЛИНИЙ МСК ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ
РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ**

D.E. Bobkov^{1,2}, A.V. Polyanskaya¹,
D.F. Goncharova², R.B. Tagaeva^{1,2},
N.M. Yudintceva^{1,2}, A.S. Musorina¹,
E.V. Lomert¹, G.G. Poljanskaya¹

**THE STUDY OF CELL MOTILITY OF DIFFERENT HUMAN
MSC LINES IN THE PROCESS
OF REPLICATIVE SENESCENCE**

bobkov@incras.ru

МСК человека являются перспективным объектом для фундаментальных биологических исследований и для использования в биомедицинских технологиях. Клеточная подвижность лежит в основе способности МСК к миграции и тканевой репарации. Ключевыми сигнальными молекулами, регулирующими организацию актинового цитоскелета и клеточную подвижность, являются малые ГТФазы семейства Rho. Репликативное старение (РС), наступающее в процессе длительного культивирования клеточных популяций, сопровождается изменениями в характере клеточной подвижности, специфичными для разных линий МСК. Мы исследовали ассоциированные с РС изменения структуры актинового цитоскелета, внутриклеточной локализации малой ГТФазы RhoA, а также клеточной подвижности в 4-х линиях МСК человека разного происхождения: MSCWJ-1, DF-2, ADH-MSC, FetMSC. Клетки были получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных»,

поддержанного грантом Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-683). Было показано, что в процессе РС снижается ядерная локализация малой ГТФазы RhoA в клеточных линиях, выделенных из здоровых доноров (MSCWJ-1, DF-2, FetMSC), тогда как в клеточной линии ADH-MSC наблюдается обратная картина. В клеточной линии MSCWJ-1 показаны колебания средней скорости и направленности клеточного движения, наименьшая скорость и наибольшая прямолинейность движения наблюдаются в активной стадии РС (пассаж 36). Было изучено влияние активатора (LPA) и ингибитора (Y-27632) малой ГТФазы RhoA на подвижность клеток, находящихся на разных стадиях РС. Показана зависимость реакции клеток DF-2, FetMSC и ADH-MSC на воздействие LPA и Y-27632 от стадии РС. Для изучения влияния опухолевых клеток на подвижность МСК выполнили со-культивирование МСК линии DF2, находящейся на ранней стадии РС (пассаж 8), и клеток глиобластомы человека линии U-251. Обнаружено достоверное снижение средней скорости и увеличение прямизны треков клеток DF2 под влиянием со-культивирования с U-251.

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ АААА-А19-119020-190093-9) Института цитологии РАН и поддержана грантом-субсидией № 075-15-2021-1063 (15BRC.21.0011).

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

² Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia

Д.Е. Бобков¹,
А.В. Полянская¹,
С.Б. Семенова¹

**МОДЕЛЬ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ
ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА
ГЛЮКОЗЫ**

D.E. Bobkov¹,
A.V. Polyanskaya¹,
S.B. Semenova¹

**MODEL OF THE INTESTINAL EPITHELIUM AS A TOOL
FOR STUDYING TRANSCELLULAR GLUCOSE TRANSPORT**

svsem@incras.ru

Углеводы являются основным **источником энергии** в организме. Попадая в организм, углеводы распадаются в процессе пищеварения до **глюкозы**, которая всасывается стенками тонкого кишечника и затем поступает в кровь. Транспорт глюкозы через слизистую оболочку тонкой кишки и её поступление в капилляры крови осуществляются с помощью особых транспортных систем, функция которых заключается в переносе молекул сахаров через клеточные мембраны. Расположенный на апикальной мембране кишечника Na^+ -зависимый транспортер SGLT1 обеспечивает основной вход глюкозы в клетки. Другой переносчик облегченной диффузии GLUT2 осуществляет выход глюкозы из энтероцитов в интерстициальное пространство, откуда она далее поступает в кровь. Согласно современной модели всасывания гексоз в тонком кишечнике, в условиях, когда SGLT1 не справляется с транспортом высоких концентраций глюкозы, переносчик GLUT2 может встраиваться в апикальную мембрану и также участвовать в переносе глюкозы в клетки кишечного эпителия. Последние данные указывают на фундаментальную внутриклеточную связь между

функционированием SGLT1, встраиванием в апикальную мембрану GLUT2 и входом ионизированного кальция (Ca^{2+}) снаружи внутрь клеток. Поступление Ca^{2+} в мембраны щеточной каймы кишечного эпителия осуществляется в основном через высокоселективные эпителиальные Ca^{2+} -каналы TRPV5 и TRPV6, относящиеся к суперсемейству TRP. Однако о роли этих каналов в регуляции SGLT1 и GLUT2 и, следовательно, в абсорбции глюкозы практически ничего не известно.

Мы использовали клетки Caco-2, чтобы получить модель кишечного эпителия, которая позволяет оценивать способность различных веществ преодолевать кишечный барьер, а также изучать механизмы их переноса. *Используя нагрузку различными концентрациями глюкозы, на 2D-модели культивируемого кишечного эпителия мы исследовали роль кальциевых каналов TRPV6 в регуляции GLUT2.* Предварительные результаты указывают на то, что использование данной модели позволит выявить молекулярные механизмы, лежащие в основе процессов, связанных с поступлением Ca^{2+} , функционированием глюкозных транспортеров и абсорбцией глюкозы клетками кишечного эпителия. Поэтому полученные результаты можно будет с уверенностью применять для прогнозирования всасывания глюкозы у человека.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ (№ 22-25-003).

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

Л.В. Болдырева^{1,2},
А.А. Огиенко²,
К.М. Ачасова^{1,2},
С.С. Сайдакова^{1,2},
Е.Н. Кожевникова^{1,2}

**ПРИЖИЗНЕННЫЙ ИМИДЖИНГ ЭКСПЛАНТОВ
ЭПИТЕЛИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВА
ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ДИАГНОСТИКИ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА**

L. V. Boldyreva^{1,2},
A. A. Ogienko²,
K. M. Achasova^{1,2},
S. S. Saydakova^{1,2},
E. N. Kozhevnikova^{1,2}

**EX VIVO LIVE IMAGING AS A PERSPECTIVE FOR
PERSONALIZED DIAGNOSTICS OF INFLAMMATORY
BOWEL DISEASES**

boldyrevalv@neuronm.ru

Молекулярно-генетические исследования демонстрируют высокую гетерогенность и индивидуальность механизмов протекания воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), поэтому актуален персонализированный поиск подходов в терапии ВЗК, в частности — к восстановлению барьерной функции кишечника. Наш проект направлен на разработку и стандартизацию моделей *ex vivo* для диагностики и подбора модуляторов патогенеза синдрома «дырявого кишечника». Целевые параметры моделей: 1) возможность адаптации для работы с образцами кишечника человека; 2) сохранение клеточных и тканевых структур; 3) сохранение фенотипа «дырявого кишечника», возникшего в результате ВЗК. В качестве модели ВЗК используются мыши с мутацией гена *Muc2*. Ранее

мы показали повышенную проницаемость кишечного барьера и нарушение структуры цитоскелета и плотных контактов в энтероцитах этих животных. Получены экспланты и органоиды кишечного эпителия и выполнен сравнительный прижизненный анализ динамики цитоскелета с использованием лентивирусной системы LifeAct-tdTomato и красителя SiRActin. Органоиды, полученные от Muc2⁻, длительно сохраняют увеличенную пролиферацию и морфологию, отличную от дикого типа, но утрачивают характерное для ВЗК нарушение плотных контактов и цитоскелета уже через 48 ч. Время сохранения нативной структуры цитоскелета и межклеточных контактов энтероцитов в эксплантах фрагментов и изолированных крипт толстого кишечника контрольных животных ограничивается 5 часами. Отработан метод сравнительного анализа с использованием прижизненного имиджинга динамики цитоскелета энтероцитов, позволяющий выполнять прижизненный анализ образцов в пределах 3-5 ч., и метод иммунофлуоресцентного сравнительного анализа структуры плотных контактов в образцах эксплантов с использованием фиксации в нескольких временных точках.

Работа выполнена в рамках Гос. задания № 122042700001-9 и проекта РФФ № 20-74-10022.

Авторы благодарны ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

¹ Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

Scientific-Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

² Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

А.С. Гончарова¹, М.В. Миндарь¹,
Г.Ю. Егоров¹, Е.Н. Колесников¹,
А.В. Галина¹, Д.В. Ходакова¹

**ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРЕХ ПРОТОКОЛОВ
КРИОСОХРАНЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ
КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ ОПУХОЛЕЙ
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА**

A.S. Goncharova¹, M.V. Mindar¹,
G.Yu. Egorov¹, E.N. Kolesnikov¹,
A.V.Galina¹, D.V. Khodakova¹

**INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS
OF THREE CRYOPRESERVATION PROTOCOLS
IN RELATION TO XENOGRAFTS OF TUMORS
OF THE GASTROINTESTINAL TRACT**

fateyeva_a_s@list.ru

Актуальность. Для более эффективного проведения современных исследований в области онкологии все более актуальным является использование опухолевого материала и его производных (парафиновый блок, первичная клеточная линия, ткань ксенографта), полученные от одного донора. Для осуществления данной задачи необходимо создание биологических коллекций опухолевого материала и разработка наиболее подходящих к каждому типу тканей протоколов криосохранения.

Материалы и методы. В работе были использованы ксенографты злокачественных образований желудочно-кишечного тракта (рак пищевода, желудка, толстого кишечника). Эксперимент выполняли на 90 мышах Balb/c Nude и оценивали эффективность 3 протоколов криосохранения тканей:

1.Среда для криосохранения: 80 % питательной среды RPMI 1640; 10% FBS; 10% диметилсульфоксида (ДМСО).

2. Среда для криосохранения: 90 % FBS; 10 % ДМСО. Для замораживания проб использовали контейнер Mr.Frosty™ (Thermo Fisher).

3. Среда для криосохранения: 80 % питательной среды RPMI 1640, 10 % FBS, 10 % ДМСО. Для замораживания проб использовали контейнер для криоконсервации Mr.Frosty™, (Thermo Fisher).

Контейнер Mr.Frosty™, наполненный изопропиловым спиртом, обеспечивал скорость замораживания близкую к $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Температурный режим для заморозки и хранения всех проб составил -80°C . Через 90 суток от момента заморозки образцы размораживали согласно стандартным протоколам и имплантировали животным, отмечали количество прижившихся имплантатов и регистрировали начало роста опухолевых узлов у животных. По окончании эксперимента проводили статистический анализ полученных данных с использованием STAISTICA 10.

Результаты. По результатам анализа полученных данных протокол №1 является наименее подходящим для сохранения опухолевой ткани всех исследованных нами локализаций. В протоколах № 2 и №3 отмечали более эффективную приживаемость ксенографтов рака пищевода и толстого кишечника.

Выводы. Для криосохранения ксенографтов рака пищевода и толстой кишки возможно использовать протестированные нами протоколы № 2 и № 3, где ключевой особенностью является медленное замораживание образцов.

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия
National Medical Research Centre for Oncology of the Russian Ministry of Health, Rostov-on-Don, Russia

Д.А. Грехнёв¹, В.А. Вигонт¹, О.С. Лебедева^{2,3},
Ю.В. Новикова¹, А.А. Кручинина¹, Л.Д. Беликова^{2,4},
С.А. Ключников^{1,5}, Е.В. Казначеева¹

**ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫЕ МОДЕЛИ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ
КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ**

D.A. Grekhnev¹, V.A. Vigont¹, O.S. Lebedeva^{2,3},
Yu.V. Novikova¹, A.A. Kruchinina¹, L.D. Belikova^{2,4},
S.A. Klushnikov^{1,5}, E.V. Kaznacheeva¹

**PATIENT-SPECIFIC MODELS OF NEURODEGENERATIVE
DISEASES AS A TOOL FOR STUDYING THE PATHOLOGICAL
CALCIUM SIGNALING**

dima.grehnyov@yandex.ru

Открытие индуцированной плюрипотентности и разработка технологий направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в различные типы нейронов дало начало новым клеточным моделям нейродегенеративных заболеваний. Данные модели получили название пациент-специфичных, поскольку отражают фенотип конкретного больного с определенной патологией. В последние годы наблюдается лавинообразный рост числа публикаций с использованием пациент-специфичных моделей нейродегенеративных заболеваний, включая исследования кальциевой сигнализации [1]. Наша лаборатория имеет большой опыт исследования пациент-специфичных моделей болезни Хантингтона [2, 3, 4] и в настоящее время работает с целой палитрой пациент-специфичных моделей нейродегенеративных заболеваний (болезни Хантингтона, Паркинсона и спинозжечковых атаксий 1 и 17 типов). Основной фокус наших исследований сосредоточен на изучении механизмов кальциевой сигнализации и разработке способов её коррекции при

патологии. В докладе продемонстрированы ключевые преимущества использования пациент-специфичных моделей нейродегенеративных заболеваний в контексте исследования кальциевой сигнализации. Во-первых, моделирование заболеваний с учетом нейрональной специфичности. Во-вторых, использование пациент-специфичных клеток для скрининга потенциальных лекарств. В-третьих, создание изогенных систем на основе пациент-специфичных моделей для детального анализа влияния мутации на патологический фенотип. В-четвертых, исследование генетически обусловленных спорадических форм нейродегенеративных заболеваний.

Работа поддержана Грантом Минобрнауки РФ № 075-15-2020-795 (Соглашение 13.1902.21.0027) и Грантом РНФ № 22-14-00218.

Литература:

1. **Grekhnev DA., Kaznacheyeva EV., Vigont VA.** Patient-Specific iPSCs-Based Models of Neurodegenerative Diseases: Focus on Aberrant Calcium Signaling. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):624.

2. **Vigont VA., Grekhnev DA., Lebedeva OS.** et al. STIM2 Mediates Excessive Store-Operated Calcium Entry in Patient-Specific iPSC-Derived Neurons Modeling a Juvenile Form of Huntington's Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:625231.

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия
Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine FMBA, Moscow, Russia

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ ФХМ ФМБА, Москва, Россия
Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine FMBA, Moscow, Russia

⁴ Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Научный центр неврологии, Москва, Россия
Research Center of Neurology, Moscow, Russia

3. **Vigont V., Nekrasov E., Shalygin A. et al.** Patient-Specific iPSC-Based Models of Huntington's Disease as a Tool to Study Store-Operated Calcium Entry Drug Targeting. *Front Pharmacol.* 2018;9:696.

4. **Nekrasov ED., Vigont VA., Klyushnikov SA. et al.** Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol Neurodegener.* 2016;11:27.

doi:10.18720/SPBPU/2/id22-109

И.А. Гривенников¹, Д.М. Шимченко¹,
Е.В. Новосадова¹, С.А. Антонов¹,
Н.Ф. Мясоедов¹, В.З. Тарантул¹

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА: ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ СВОЙСТВ И ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

I.A. Grivennikov¹, D.M. Shimchenko¹,
E.V. Novosadova¹, S.A. Antonov¹,
N.F. Myasoedov¹, V.Z. Tarantul¹

HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS: PLURIPOTENCY OF PROPERTIES AND PLURIPOTENCY OF APPLICATION

igorag@img.ras.ru

Разработка технологии репрограммирования соматических клеток и получение индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток человека, открыла новые перспективы в трансплантологии и изучении молекулярных и клеточных основ тяжелых болезней человека. Способность ИПС клеток к дифференцировке в разнообразные клетки органов и тканей человеческого организма создала новые возможности для моделирования ряда тяжелых патологий человека, исследования молекулярных и клеточных механизмов их развития *in vitro*. Кроме того, технология ИПС клеток

позволила создать тест-системы, с помощью которых в настоящее время можно проводить масштабный скрининг и выяснять свойства потенциальных лекарственных средств, направленных на лечение конкретных заболеваний, учитывая при этом индивидуальные особенности пациента. Тот факт, что технология репрограммирования позволяет получать ИПС клетки из индивидуальных дифференцированных соматических клеток больных и здоровых пациентов, создает ей существенные преимущества перед технологией эмбриональных стволовых клеток, что, в свою очередь, открывает большие перспективы в развитии персонализированной медицины. В настоящей работе с помощью созданной многоуровневой тест-системы, основанной на ИПС клетках человека, полученных от здоровых доноров и пациентов с болезнью Паркинсона, проведен скрининг соединений на наличие нейропротекторной активности. На культурах нейрональных предшественников и терминально дифференцированных нейронов, полученных из соответствующих ИПС клеток, продемонстрировано нейропротекторное действие ряда пептидов семейства меланокортинов, а также представителей семейства каннабиноидов. На основе проведенных экспериментов обсуждаются возможности и ограничения использования ИПС клеток и их дифференцированных в нейрональном направлении производных для оценки цито- и эмбриотоксических, также нейропротекторных и нейротоксических свойств соединений различной природы. Таким образом, использование ИПС клеток и их дифференцированных производных позволяет существенным образом сократить эксперименты по тестированию перспективных для фармакологии соединений на клетках животных, а осуществлять их сразу на клетках человека.

Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда (№ 21-15-00103).

¹ Институт молекулярной генетики Научного исследовательского Центра «Курчатовский институт», Москва, Россия
Institute of Molecular Genetics of National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

Т.М. Гринчук¹,
М.А. Шорохова¹,
Н.А. Пуговкина¹

**ПРОДОЛЖИТЕЛЬНАЯ КРИОКОНСЕРВАЦИЯ
КАК ВОЗМОЖНЫЙ ФАКТОР ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ
КЛЕТОЧНОГО ГЕНОМА *IN VITRO***

T.M. Grinchuk¹,
M.A. Shorohova¹,
N.A. Pugovkina¹

**LONG-TERM CRYOPRESERVATION AS A POSSIBLE
DESTABILIZATION FACTOR OF THE CELL GENOME
*IN VITRO***

grintat@bk.ru

Использование различных по происхождению клеточных линий в научных и прикладных исследованиях требует долгосрочного поддержания их физиологического и генетического статуса в исходном состоянии. Одним из важнейших и активно используемых для этих целей методов является процедура криоконсервации, в основе которой лежит низкотемпературная заморозка живых биологических объектов с сохранением их функций.

Целью настоящей работы было на примере двух клеточных линий различного видового происхождения и генетического статуса проанализировать, что происходит с клеточным геномом *in vitro* в результате низкотемпературной (-196°C) продолжительной криоконсервации. В качестве объектов исследования были использованы трансформированные клетки фибробластов легкого китайского хомячка (линия CHL V-79 RJK – пребывание в жидком азоте 10 лет) и эндометриальные мезенхимные клетки (ЭМСК, линия 23 – 04 – пребывание в жидком азоте 7 лет). Обе линии на момент заморозки имели стабильный кариотип.

Цитогенетический анализ G-бандированных метафазных хромосом клеток обеих линий на 3-4 пассаже после криоразморозки выявил повышенный уровень кариотипической нестабильности, связанный с анеуплоидизацией клеток и повышенной ломкостью их хромосом, затрагивающей прицентромерные и терминальные районы с делетированием или сохранением хромосомного материала. Уровень кариотипической нестабильности в разных клеточных линиях был различным. Трансформированные клетки китайского хомячка характеризовались повышенной морфологической нестабильностью только одной хромосомы набора. Изменения были связаны с ее повышенной ломкостью разной локализации и носили неслучайный характер, так как были выявлены в 30 % кариотипированных клеток. Кариотип эМСК оказался более подвержен хромосомным поломкам: они выявлялись с равной вероятностью в большинстве хромосом набора.

Сделан вывод, что длительная низкотемпературная криоконсервация разных по происхождению клеток сопровождается однотипными нарушениями кариотипической стабильности — повышенной ломкостью хромосом и нарушением их копийности, что опосредовано повышенной ломкостью ДНК и сбоем в программе клеточного деления. На каком этапе криоконсервации/декриоконсервации происходят данные изменения и какой из процессов криоконсервации оказывает на клетки «катастрофическое» воздействие — пока не ясно.

Работа выполнена в рамках РФФ № 22-24-20122.

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

Н.Г. Гурская¹, Н.А. Евтушенко¹,
А.К. Бейлин¹, А.К. Косых^{1,2},
Е.В. Алпеева², Е.А. Воротеляк²

**ЛИНИИ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ВБЭ,
КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ
ПАТОГЕНЕЗА И ПОДБОРА МЕТОДА ГЕНОТЕРАПИИ**

N.G. Gurskaya¹, N.A. Evtushenko¹,
A.K. Beilin¹, A.K. Kosykh^{1,2},
E.V. Alpeeva², E.A. Vorotelyak²

**EPIDERMOLYSIS BULLOSA PATIENT SPECIFIC CELL LINES
AS A MODEL FOR STUDY MECHANISMS OF PATHOGENESIS
AND SEARCH FOR GENOTHERAPY METHODS**

ngurskaya@mail.ru

Врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) является группой неизлечимых генодерматозов, к созданию этиотропной терапии которого привлечено много внимания. Линии клеток, несущие специфические для ВБЭ мутации, являются полезным инструментом для тестирования терапевтических средств, а также для изучения особенностей каждого из заболеваний, входящих в группу ВБЭ [1].

Первичные клеточные линии от пациентов получали на основе биоптата кожи пациентов, проводили секвенирование. Часть линий несла новые мутации, в других случаях это были варианты, описанные для Европейской популяции. Секвенирование дает нам возможность подобрать метод генотерапии, в том числе выбрать между различными подходами редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9 или осуществить генозамещение с помощью лентивирусной трансдукции. Первичные линии фибробластов и кератиноцитов подвергали иммортализации по адаптированному нами протоколу [2].

Анализу и сравнению подвергались транскриптомы и протеомы иммортализованных фибробластов и кератиноцитов от больных и здоровых доноров. Внимание привлекли гены, специфичные для фибробластов, кодирующие белки внеклеточного матрикса, протеазы и факторы воспаления. Анализ секретируемых белков иммортализованных кератиноцитов показал, что в случае РДБЭ (одна из форм ВБЭ) увеличивается секреция белков адгезии, некоторых ингибиторов протеаз и белков, которые участвуют в ранозаживлении и ремоделировании внеклеточного матрикса.

В результате работы собрана коллекция клеточных линий, содержащая несколько форм ВБЭ: РДБЭ, ВБЭ простого типа и синдрома Киндлер.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-29-04044.

Литература:

1. **Varki R., Sadowski S., Uitto J., et al.** Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. *J Med Genet.* 2007; 44(3):181–92.

2. **Tátrai P., Szepesi Á., Matula Z. et al.** Combined introduction of Bmi-1 and hTERT immortalizes human adipose tissue-derived stromal cells with low risk of transformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 20.

¹ Российский Национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

Д.М. Дарвиш^{1,2},
Е.С. Лапина¹

ФИБРИЛЛЯРНЫЕ КОЛЛАГЕНОВЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

D.M. Darvish^{1,2},
E.S. Lapina¹

FIBRILLAR COLLAGEN MATERIALS FOR CELL CULTURE

darvishdi@mail.ru

Среди всех материалов для клеточного культивирования материалы на основе коллагена занимают особое место. Коллаген является основным белком внеклеточного матрикса, который во многом определяет поведение клеток в живом организме. Благодаря уникальной способности коллагена образовывать нативные фибриллы *in vitro*, существует возможность создавать материалы, имитирующие структуру внеклеточного матрикса, обеспечивая тем самым условия для клеток, приближенные к нативным.

Для формирования фибриллярных коллагеновых материалов необходимо учитывать ряд параметров, среди которых одним из наиболее важных является метод экстракции коллагена. Только кислая экстракция позволяет получать коллаген с полностью сохраненной молекулярной структурой и формировать из него плотные коллагеновые гели даже при весьма низких концентрациях (1-2 мг/мл). В Институте цитологии РАН на основании метода кислой экстракции отработана оригинальная методика, позволяющая получать коллаген I типа, который может быть использован для формирования плотных коллагеновых гелей, а также фибриллярных коллагеновых полотен и пленок для клеточного культивирования.

Для инициации образования фибрилл *in vitro* необходимо создать определенные условия: физиологическую ионную силу, ней-

тральный pH и оптимальную температуру. Для этих целей могут быть использованы как нейтрализующие солевые растворы, так и культуральная среда.

Фибриллярные коллагеновые материалы имеют ряд преимуществ по сравнению с молекулярными формами: они обладают более высокими механическими характеристиками и проявляют большую устойчивость к действию коллагеназы. Однако при использовании таких материалов в составе биомедицинских клеточных продуктов зачастую даже их параметры прочности и биологической устойчивости оказываются недостаточными. В этом случае возникает необходимость их модификации сшивающими агентами.

Нами отработаны методы, позволяющие повысить устойчивость коллагеновых материалов к деградации. Стабилизация проводится с использованием сшивающих агентов с низкой цитотоксичностью: карбодиимидом, рибофлавином и галловой кислотой. Наибольший эффект выявлен при использовании карбодиимида, а также совместного применения карбодиимида с галловой кислотой. Сшивание галловой кислотой и рибофлавином также является весьма эффективным.

1 Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

2 Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, Россия
Saint-Petersburg State University of Industrial Technologies and Design, St. Petersburg, Russia

Н.И. Дергачева¹, И.О. Сучкова¹,
Л.К. Сасина¹, Т.В. Баранова¹,
Е.Л. Паткин¹

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ТОКСИКОЭПИГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

N.I. Dergacheva¹, I.O. Suchkova¹,
L.K. Sasina¹, T.V. Baranova¹,
E.L. Patkin¹

HUMAN CELL CULTURES IN TOXICO-EPIGENOME STUDIES

natalia-9999@mail.ru

В связи с усугубляющейся экологической обстановкой являются актуальными исследования влияния различных поллютантов на живые организмы. Воздействие экотоксикантов приводит к генетическим повреждениям структуры ДНК и изменениям в эпигеноме (метилированию ДНК, модификации гистонов, изменению компактизации хроматина), что в свою очередь влияет на экспрессию генов. Различные клетки, ткани и органы обладают индивидуальным эпигенетическим ответом на воздействие экотоксикантов, при этом наиболее чувствительными мишенями являются недифференцированные стволовые клетки организма. Эпигеном других типов клеток также подвержен влиянию поллютантов в различной степени, что вызывает интерес у исследователей.

Цель работы – изучение влияния бисфенола А (БФА) и хлорида кадмия (CdCl_2) на полногеномное метилирование ДНК и компактизацию хроматина на 4 культурах клеток человека различного происхождения.

В работе исследованы линии мезодермального (HEK293 – эмбриональная почка и FetMSC – мезенхимные стволовые клетки

костного мозга 5-6 недельного эмбриона), энтодермального (Нер G2 – карцинома печени) и эктодермального (IMR-32 – нейробластома) происхождения. Клетки культивировали в присутствии экотоксикантов (БФА либо CdCl_2) в течение 72 часов. Уровень полногеномного метилирования ДНК определяли с помощью метил-чувствительной рестрикции MspI и HpaII, а степень компактизации хроматина – с помощью обработки ядер ДНКазой I. Денситометрирование шлейфов фрагментированной ДНК на электрофореграммах агарозных гелей анализировали в программе ImageJ.

Во всех клеточных культурах была обнаружена нелинейная зависимость «доза-эффект» при воздействии как БФА (дозы 0,25; 0,5; 1 и 10 мкМ), так и CdCl_2 (дозы 0,5; 1; 2; 5 и 10 мкМ). Были выявлены 5 типов эпигеномной реакции клеток в зависимости от клеточной линии, дозы и типа токсиканта:

- 1) повышение уровня метилирования ДНК при снижении степени компактизации хроматина (17 случаев);
- 2) одновременное повышение (либо снижение) уровня метилирования ДНК и компактизации хроматина (6 случаев);
- 3) изменение только степени компактизации хроматина (7 случаев);
- 4) изменение только уровня метилирования ДНК (4 случая);
- 5) воздействие экотоксикантов не привело к изменению ни степени компактизации хроматина, ни уровня метилирования ДНК (2 случая).

Таким образом, данные клеточные культуры человека являются удобным биологическим объектом исследования влияния экотоксикантов на эпигеном.

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

А.С. Жданова¹, И.Н. Стручкова¹,
И.С. Владимиров¹, Е.И. Радион¹,
В.Е. Мухин¹

**ПОЛУЧЕНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ
КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ
ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ДВОЙНОГО
ИНГИБИРОВАНИЯ SMAD**

A.S. Zhdanova¹, I.N. Struchkova¹,
I.S. Vladimirov¹, E.I. Radion¹,
V.E. Mukhin¹

**METHOD FOR NEURAL PROGENITOR CELLS GENERATION
FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS
BY DUAL INHIBITION OF SMAD SIGNALING**

AJdanova@cspfmba.ru

Клеточные модели являются многообещающим инструментом изучения нейродегенеративных заболеваний, однако получение соматических клеток нервной системы человека для *in vitro* исследований является затруднительным. Нейральные прогениторные клетки (НПК) как перспективный источник получения дифференцированных нейрональных и глиальных клеток, в свою очередь, предоставляют возможность исследовать различные стадии процесса нейродегенерации и могут обладать терапевтическим потенциалом для лечения различных неврологических заболеваний. Важной задачей является разработка простого и масштабируемого протокола получения НПК.

В данной работе мы представляем альтернативный протокол дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) в НПК посредством двойного ингибирования

сигнального пути SMAD с помощью селективных ингибиторов SB431542 и LDN193189.

Для получения iPSC использовали фибробласты кожи здорового донора. Репрограммирование осуществляли с помощью коммерческого набора на основе Сендай вируса CytoTune-iPS 2.0, несущего полицистронные Klf4–Oct3/4–Sox2, cMyc и Klf4, без использования фидерных клеток. Спустя 28 дней после трансдукции сформировавшиеся колонии iPSC были отобраны и перенесены в покрытые rhVTN-N культуральные планшеты. После 6 пассажа iPSC были охарактеризованы иммуноцитохимически по экспрессии поверхностного маркера стволовых клеток TRA-1-60, а также транскрипционных факторов OCT4, SOX2, SSEA-4 и Nanog.

Для получения активно пролиферирующих нейрональных клеток-предшественников iPSC культивировали в течение 8 дней в среде для индукции НПК с селективными ингибиторами SMAD. Далее НПК вели в среде для поддержания с SB431542, а также EGF и bFGF в качестве факторов выживания нейронов и CHIR99021 для ингибирования передачи сигналов GSK3.

Валидацию фенотипа НПК осуществляли иммунохимически по экспрессии нестина и транскрипционных факторов SOX1 и PAX6.

Важной особенностью нашего протокола является возможность экспансии НПК при высокой плотности без потери фенотипических свойств и их криоконсервация. Данный метод позволяет быстро получить большое количество клеток-предшественников нейронов, необходимых для фундаментальных исследований, скрининга лекарственных средств и токсикологических исследований.

¹ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью ФМБА России, Москва, Россия
Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, Russia

doi:10.18720/SPBPU/2/id22-115

И.И. Захаров¹, П.А. Веселова¹,
А.А. Саидова¹, М.А. Савицкая¹,
Г.Е. Онищенко¹

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ФЕНОТИПА КЛЕТОК НАСАТ И А431 ПРИ ПОМОЩИ CELLPROFILER

I.I. Zakharov¹, P.A. Veselova¹,
A.A. Saidova¹, M.A. Saviskaya¹,
G.E. Onishchenko¹

PHENOTYPE CHANGE ANALYSIS OF HACAT AND A431 CELLS USING CELLPROFILER SOFTWARE

work.zakharovilya@gmail.com

Исследование клеток под микроскопом является ключевым методом клеточной биологии. Различные типы микроскопии, такие как световая микроскопия в широком поле или трансмиссионная электронная микроскопия, позволяют оценить строение клетки и ее составляющих. Мечение специфическими маркерами дает возможность наблюдать отдельные белки и их локализацию. Это разнообразие методов служит для получения качественных результатов и иллюстративного материала, однако использование полученных изображений для статистической оценки часто затруднено отсутствием инструментов для автоматизации этого процесса.

В данной работе продемонстрирована методика анализа фенотипа клеток в программе CellProfiler с последующей обработкой в RStudio. С помощью этой методики изучено изменение морфологии и ploидности кератиноцитов человека HaCaT и клеток карциномы человека A431 *in vitro* во время и после снятия воздействия индукторами стресса ЭПР бортезомибом (БТЗ) и дитиотреитолом (ДТТ). Индукция стресса ЭПР подтверждена методом ПЦР —

данными о повышении уровня экспрессии генов маркёров стресса ЭПР (GRP78, ATF4 и CHOP). Также показано, что экспрессия генов маркёров сохраняется и после снятия воздействия. Для анализа фенотипа клеток проведено окрашивание актиновых филаментов клеток фаллоидин-TRITC и ДНК ядер DAPI. На полученных фотографиях проведено измерение таких параметров, как площадь, эксцентриситет и формфактор клеток, а также плоидность ядер клеток.

Обнаружено, что в обеих культурах площадь снижается при воздействии БТЗ и ДТТ и возрастает после снятия воздействия обоими индукторами. Доля веретенovidных клеток в обеих культурах снижается при воздействии БТЗ и возрастает после снятия воздействия; доля веретенovidных клеток в обеих культурах также возрастает при воздействии ДТТ и снижается после снятия воздействия. Плоидность ядер клеток обеих культур возрастает во время и после снятия воздействия БТЗ; при воздействии ДТТ на клетки обеих культур плоидность ядер снижается, а после снятия воздействия ДТТ возрастает в клетках HaCaT и снижается в клетках A431.

Таким образом, использование CellProfiler позволило выявить изменения фенотипических параметров клеток HaCaT и A431, а также провести оценку распределения этих изменений в составе популяций клеток. В дальнейшем это позволит определить причины фенотипического разнообразия, вызванного стрессом ЭПР.

Работа выполнена в рамках НИР №121032300098-5.

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**ВЛИЯНИЕ С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА ГИСТОНА H3
НА МИГРАЦИОННУЮ И АДГЕЗИВНУЮ АКТИВНОСТЬ
ФИБРОБЛАСТОВ**

**THE EFFECT OF THE C-TERMINAL FRAGMENT
OF HISTONE H3 ON THE MIGRATION
AND ADHESION OF FIBROBLASTS**

valet@iephb.ru

Направленная регуляция перехода клеток определенных типов от неподвижного (фиксированного) статуса к мигрирующему состоянию и наоборот все еще остается на стадии разработки. Перспективными инструментами, способными блокировать у неопластических клеток свойственную им увеличенную миграционную активность, а также активировать (включать) заблокированную у трансформированных клеток способность прикрепляться и распластываться на внутриклеточном матриксе с последующим переходом к дифференцировке, могут быть препараты пептидных регуляторов.

Мезенхимальные клетки, к которым относятся и фибробласты, способны мигрировать одиночно, покидая места постоянной дислокации в тканях. Морфогенетические свойства фибробластов не только определяют регенеративные процессы в организме, но и важны для создания новых полимерных материалов, используемых в качестве субстрата для колонизации мигрирующими клетками, включая фибробласты, с последующим их прикреплением к подложке и переходу к дифференциации и пролиферации.

Исследовали влияние синтетического пептида, С-концевого фрагмента гистона H3, на процессы распластывания и мигра-

ции эмбриональных фибробластов. Установлено, что пептид увеличивает количество распластанных клеток в популяции по сравнению с контрольными клетками, а также стимулирует направленную миграцию фибробластов в зону повреждения клеточного монослоя (метод «зарастания раны»). Миграция клеток, как и распластывание, связана с процессами формирования фокальных адгезий, протрузий и ремоделирования актинового цитоскелета. Основное отличие этих клеточных процессов состоит в скорости динамических перестроек фокальных адгезий, скорости ремоделирования актиновых филаментов и способах образования протрузий.

Стимулирующий эффект исследованного пептида на распластывание и миграцию фибробластов, вероятно, связан с его влиянием на структурную и функциональную организацию фокальных адгезий. При этом если в ходе клеточного распластывания пептид обеспечивает стабилизацию фокальных адгезий, ограничивая тем самым число протрузий у фибробластов, то в случае направленной клеточной миграции пептид ускоряет динамику формирования адгезионных комплексов в лидирующем крае фибробластов, обеспечивая увеличение протрузионной активности, а значит и скорости перемещения клеток.

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, Russia

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ЧЕЛОВЕКА
И ЖИВОТНЫХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КЛЕТОЧНОГО
ОТВЕТА**

**USING HUMAN AND ANIMAL CELL CULTURES
IN THE MODELING OF CELL RESPONSE**

valet@iephb.ru

Разработка способов направленной регуляции функциональной активности клеток различного происхождения относится к важнейшим задачам практической медицины. В этой связи использование клеточных культур с заданным набором физиологических характеристик в качестве экспериментальной модели для изучения активности определенных клеточных мишеней под воздействием различных внешних факторов (природные или синтетические регуляторные соединения, генные продукты и т.д.) является абсолютно оправданным.

К основным преимуществам использования клеточных культур при моделировании клеточного ответа можно отнести:

1) проведение анализа краткосрочного и долгосрочного влияния различных регуляторов на морфологические, биохимические и генетические характеристики клеток;

2) дифференцированное использование флуоресцентных красителей, антител и т.д. для вычленения основных внутриклеточных, ядерных комплексов, определяющих конечный биологический эффект;

3) подбор ингибиторов/антагонистов с определенным спектром действия для ингибирования/блокировки активности белка/гена через регистрацию промежуточных форм;

4) отработка методов трансформации клеток для подбора способов устранения/минимизации последствий перерождения здоровой ткани;

5) изучение степени заряженности/гидрофобности нано- и микрочастиц (как средств доставки лекарственных препаратов или с диагностическими целями) на конечное взаимодействие с клетками с последующим проникновением в клетку/ядро и выделением во внутриклеточное пространство транспортируемого препарата;

6) использование методов трансфекции для создания клеточных линий, продуцирующих в значимых количествах соединения с иммунной, ферментативной, противоопухолевой и др. активностью;

7) поиск новых компонентов в известных белковых комплексах с использованием современных методов инструментального анализа.

Большой выбор клеточных культур и их модификаций позволяет ограничить ресурсные затраты и сузить круг задач при анализе исследуемого феномена.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-0152-22-00.

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, Russia

Н.А. Калинина¹,
А. А. Мальченкова¹,
Е.Н. Кособокова¹

**СТРАТЕГИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ В БИОРЕСУРСНОЙ
КОЛЛЕКЦИИ**

N.A. Kalinina¹,
A.A. Malchenkova¹,
E.N. Kosobokova¹

**THE QUALITY CONTROL STRATEGY OF HUMAN
AND ANIMAL CELL LINES IN THE BIORESOURCE
COLLECTION**

pronskey@yandex.ru

Ошибочная идентификация, межвидовая и внутривидовая клеточная контаминация культуры, также как вирусная и микоплазменная, являются частыми и общеизвестными проблемами, широко обсуждаемыми в научном сообществе.

В нашей работе представлена стратегия контроля качества клеточных линий биоресурсной коллекции НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, созданной в рамках проекта «Создание и развитие биоресурсной коллекции генетически и фенотипически охарактеризованных клеточных линий и первичных опухолей человека», поддержанного грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1060 от 28.09.2021 г.).

При поступлении линии в коллекцию сначала она направляется в карантинный бокс, в котором культивируется до завершения всех этапов контроля качества. Только при полном соответствии критериям «чистоты и качества» образец передается для наращивания и формирования лотов.

Для подтверждения подлинности и проверки на контаминацию клетками других линий применяется метод профилирования на основе коротких tandemных повторов (short tandem repeat, STR) с использованием набора COrDIS «ЭКСПЕРТ 26» (Гордиз, Россия), валидированного для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦР-анализа. Полученный профиль сравнивается с результатами открытых баз данных (ЕСАСС, АТСС).

Присутствие бактерий и грибов оценивается визуальным методом при микроскопическом исследовании.

Метод выявления микоплазменной контаминации – полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием набора MycoReport (Евроген, Россия) и последующей электрофоретической детекцией – обладает высокой чувствительностью, специфичностью, воспроизводимостью и быстротой проведения анализа.

Для определения вирусной контаминации в лабораторной диагностике эффективно применяется быстрый и точный метод ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

При принятии решения о перечне вирусов, на которые следует тестировать клеточную линию, в нашей работе мы ориентировались на вирусный тропизм, происхождение клеточной линии, применяемую модель культивирования.

Комплексный подход к оценке качества образца позволяет обеспечивать высокий уровень материала и гарантировать соответствие международным стандартам.

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия
Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

М.В. Каримова¹

**ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ
И ПОСТНАТАЛЬНЫХ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ
МЫШИ**

M.V. Karimova¹

**ISOLATION, CELL CULTURE, AND CRYOCONSERVATION
OF EMBRYONIC AND ADULT MURINE PANCREATIC ISLETS**

maryanna_karimova@mail.ru

Разработка методов выделения, длительного поддержания в культуре и криоконсервации панкреатических островков представляет особый интерес в связи с ростом заболеваемости сахарным диабетом и поиском методов его терапии.

В данной работе были использованы эмбриональные и постнатальные островки мыши (линии C57Bl/6 и GFP) как более легкодоступный модельный объект. Был разработан метод выделения эмбриональных панкреатических островков мыши на стадии E18,5 с помощью коллагеназы IV. Стадия E18,5 была выбрана, исходя из того, что к этому дню развития происходит дифференцировка всех типов клеток островков. Постнатальные островки были выделены из пятимесячных мышей с помощью перфузии поджелудочной железы смесью коллагеназ I и II типов. Эмбриональные и постнатальные островки можно поддерживать в культуре на протяжении более 30 дней, при этом островки прикрепляются к пластику. После этого периода времени остаются единичные живые клетки. Для оценки синтеза инсулина проводилась окраска специфическим хелатирующим цинк красителем — дитизоном (DTZ). DTZ окрашивает функциональные эмбриональные островки примерно через 24 часа после выделения, что скорее всего связано с активацией

собственного синтеза, и сразу после выделения в постнатальных островках.

Криоконсервация панкреатических островков является актуальной проблемой, так как клетки островков трудно поддерживать в культуре длительное время, при этом они не пролиферируют. Криоконсервация островков является непростой задачей в связи с тем, что островки представляют собой 3D кластеры размером 100–200 мкм. В данной работе было показано, что быстрая заморозка панкреатических островков в жидком азоте с использованием смеси проникающих и непроникающих криопротекторов в каплях 60–100 мкл позволяет сохранить жизнеспособность островков. Размораживание проводилось последовательно в двух средах с разной концентрацией сахарозы для предотвращения осмотического шока — до перевода островков в стандартную среду для культивирования. Жизнеспособность островков оценивалась окраской трипановым синим, DTZ и по свечению клеток GFP.

В данной работе был разработан метод выделения и культивирования эмбриональных панкреатических островков мыши, отработаны методы для постнатальных островков и выявлен метод криоконсервации, позволяющий получить жизнеспособные островки после их размораживания. Данные методы могут быть адаптированы для панкреатических островков человека.

Поддержано Министерством высшего образования и науки РФ, соглашение № 075-15-2021-1075.

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

Д.Д. Каримов¹, Э.Р. Кудояров¹,
Т.Г. Якупова¹, Э.Ф. Репина¹,
Д.О. Каримов¹

**ПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНОГО
СОЕДИНЕНИЯ 5-ГИДРОКСИ-6-МЕТИЛУРАЦИЛА
С АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ *IN VITRO***

D.D. Karimov¹, E.R. Kudoyarov¹,
T.G. Yakupova¹, E.F. Repina¹,
D.O. Karimov¹

**PROTECTOR PROPERTIES
OF 5-HYDROXY-6-METHYLURACIL COMPLEX
WITH ASCORBIC ACID *IN VITRO***

lich-tsar@mail.ru

В настоящее время актуальным направлением является поиск соединений, повышающих устойчивость организма в условиях воздействия экстремальных факторов окружающей среды, в т. ч. химической природы. Изучены протективные свойства комплексного соединения 5-гидрокси-6-метилурацила с аскорбиновой кислотой *in vitro* на культуре клеток гепатомы мыши. 5-гидрокси-6-метилурацил ранее исследовался как антиоксидант, антигипоксикант и гепатопротектор, антиоксидантные свойства аскорбиновой кислоты также хорошо известны. Ранее проведены исследования, направленные на изучение протекторных свойств комплексного препарата 5-гидрокси-6-метилурацила с аскорбиновой кислотой, по результатам проведенных исследований получен Патент РФ.

Материалы и методы. Эксперимент проведён на культуре клеток гепатомы мыши МН22А. Культивирование осуществлялось в среде Игла (ИМЕМ) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота. Анализ протективных свойств производился по отношению к генотоксичности акриламида в концентрации 10 мМ. Акриламид

растворяли до нужной концентрации в среде Игла без добавления сыворотки, полученный раствор стерилизовали фильтрованием. Экспозиция в среде, содержащей токсикант, проводилась в течении 20 часов.

Для проведения исследований выбрано 3 концентрации исследуемого комплексного соединения: 260 мкМ, 130 мкМ и 65 мкМ. Препарат растворяли до нужной концентрации в среде Игла без добавления сыворотки, полученный раствор стерилизовали фильтрованием. Экспозиция в среде с препаратом проводилась сразу после экспозиции с токсикантом в течение 2 часов. В качестве отрицательного контроля использовали клоны той же культуры, экспонированные в среде Игла без добавления сыворотки и токсиканта в течение 20 часов, и затем экспонированные в среде Игла без добавления сыворотки и препарата в течение 2 часов. В качестве положительного контроля использованы клоны той же культуры, экспонированные в среде, содержащей 10 мМ акриламида в течение 20 часов, и после этого экспонированная в среде Игла без добавления сыворотки и препарата в течение 2 часов.

Анализ генотоксичности проводился методом ДНК-комет согласно методическим рекомендациям МР 4.2.0014-10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет IN VITRO». Микропрепараты исследовали под 100-кратным увеличением на флуоресцентном микроскопе Zeiss Axio Imager.D2 с камерой Axio Cam MRc5, подключенной к компьютеру для сохранения изображений. Уровень повреждений ДНК оценивали по показателю «% ДНК в «хвосте кометы». Оценку процентной доли (среднего содержания) ДНК в хвосте кометы проводили с использованием программы Casplab v.1.2.3b2. Для выявления различий был использован непараметрический критерий Краскала-Уоллиса, апостериорный анализ проводился методом Данна с поправкой на множественность сравнений FDR. Статистическая обработка результатов проводилась в среде R с использованием пакета «dunn.test».

Показатель коэффициента репарации ДНК (КР) основан на оценке количества повреждений ДНК, вызванных пероксидом водорода после двухчасовой восстановительной инкубации

в питательной среде, и сравнении их с количеством повреждений до инкубации. Таким образом, КР показывает степень восстановления повреждений, что позволяет напрямую количественно оценить состояние систем репарации ДНК.

КР рассчитывался по следующей формуле:

$$КР = (TD_{120} / TD_0) \times 100 \%,$$

где TD_0 представляет собой процент ДНК в хвосте кометы после воздействия перекиси водорода, а TD_{120} представляет собой процент ДНК в хвосте кометы после 120-минутной восстановительной инкубации.

Результаты. При воздействии комплексного соединения в течении 2 часов получены следующие данные: в отрицательном контрольном образце средний уровень ДНК в хвосте составил $1,134 \pm 0,073 \%$, в положительной контрольной группе – $2,183 \pm 0,123 \%$, при восстановительной экспозиции в 260 мкМ растворе – $3,637 \pm 0,186 \%$, в 130 мкМ растворе – $2,311 \pm 0,126 \%$, в 65 мкМ растворе – $1,771 \pm 0,127 \%$. При проведении анализа Крускала-Уоллиса получено значение $W = 304,567$, $p \ll 0,001$, что говорит о значимых различиях между группами. При проведении попарных сравнений исследованных групп методом Данна с поправкой на множественность сравнения Бенджамина-Якутелли выявлены статистически значимые различия между всеми исследованными группами. Установлено, что среди выбранных концентраций препарата наиболее эффективно показала себя концентрация 65 мкМ. При анализе коэффициента репарации выявлено, что наибольший коэффициент репарации имела культура, экспонированная в 130 мкМ концентрации препарата.

Таким образом показано, что наибольшее снижение степени повреждения ДНК наблюдается при концентрации препарата в 65 мкМ, а наиболее эффективно репарировались повреждения после воздействия препарата в концентрации 130 мкМ.

¹ Уфимский НИИ Медицины труда и экологии человека, Уфа, Россия
Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia

Д.А. Костина¹, А.А. Лобов^{1,2},
Р.М. Тихилов³, С.А. Божкова³,
А.П. Середа³, В.В. Карелкин³,
А.Б. Малашичева¹

**МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА
И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК
ОСТЕОБЛАСТОВ ИЗ КОСТИ ЧЕЛОВЕКА**

D.A. Kostina¹, A.A. Lobov^{1,2},
R.M. Tikhilov³, S.A. Bozhkova³,
A.P. Sereda³, V.V. Karelkin³,
A.B. Malashicheva¹

**METHOD OF ISOLATION, CHARACTERISATION
AND PROSPECTS FOR USE OF PRIMARY CELL CULTURES
OF OSTEOBLASTS ISOLATED FROM HUMAN BONE**

kostinadariaspb@gmail.com

Остеобласты – специализированная популяция клеток кости, которая ответственна за продукцию внеклеточного матрикса и минерализацию. В то же время эти клетки способны к пролиферации и дальнейшей дифференцировке в остеокласты и остеоциты. За счет остеобластов происходит репарация и регенерация костной ткани.

Цель работы заключалась в получении и характеристике первичных клеточных культур остеобластов человека.

Из фрагментов бедренной кости человека, удаляемой в ходе протезирования суставов, методом выделения из эксплантов ткани были получены жизнеспособные клетки. Полученные клетки способны к пролиферации и пригодны для *in vitro* исследований. Согласно результатам иммуноцитохимического окрашивания и ПЦР в реальном времени, они экспрессируют характерные для остеобластов маркеры, в том числе Runx2, Vmp2, остеокальцин.

Остеобласты сохраняют высокую способность к остеогенной дифференцировке: при культивировании в дифференцировочной среде они позитивно окрашиваются ализариновым красным уже на 14-й день.

Чтобы оценить, как меняется профиль экспрессии белков при остеогенной дифференцировке остеобластов, был проведен скорострельный протеомный анализ. Мы обнаружили неожиданно мало различий на уровне протеома между дифференцированными и контрольными остеобластами, несмотря на то, что минерализация происходит только после индукции остеогенной дифференцировки.

Таким образом, процессы остеогенной дифференцировки в остеобластах отличаются от процессов в клетках, которые находятся на более ранних стадиях дифференцировки. Клеточная культура остеобластов может служить моделью для изучения функциональных свойств клеток взрослой кости.

Работа выполнена в рамках работы над грантом РФФИ 19-29-04082.

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

² Ресурсный Центр молекулярных и клеточных технологий Санкт-Петербургского Государственного университета, Санкт-Петербург, Россия
Resource Centre for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

³ Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
Vreden Russian Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics of the Russian Ministry of Health, St. Petersburg, Russia

П.Д. Котова¹

**МОНОКЛОНАЛЬНАЯ ЛИНИЯ КЛЕТОК,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ СЕНСОРЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ
сАМР И Ca²⁺**

P.D. Kotova¹

**MONOCLONAL CELL LINE EXPRESSING SENSORS
OF CYTOSOL cAMP AND Ca²⁺**

polinakotova88@gmail.com

Сигналы, получаемые клеткой от GPCR-рецепторов, усиливаются в основном посредством аденилатциклазного и фосфолипидного путей трансдукции сигнала, активация которых приводит к значительному изменению концентрации их вторичных посредников, сАМР и Ca²⁺, соответственно. Методы исследования внутриклеточных сигнальных процессов основаны на мониторинге именно вторичных посредников. Мониторинг внутриклеточного Ca²⁺ традиционно осуществляется методом микрофотометрии (Ca²⁺-imaging) с помощью синтетических флуоресцентных Ca²⁺-зондов. Способность таких зондов проникать через плазматическую мембрану и накапливаться внутри живой клетки дает возможность изучать Ca²⁺-процессы в динамике и на уровне одиночных клеток. Классическим методом измерения сАМР является радиоиммунный анализ (radioimmunoassay, RIA), позволяющий измерять концентрацию сАМР в лизате клеток. Поскольку синтетических флуоресцентных сАМР-зондов не разработано, мониторинг сАМР внутри живой клетки стал возможен только с появлением генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров. Первые сенсоры сАМР работали на основе Фёрстеровского переноса энергии (FRET) и позволяли проводить ратиометрический мониторинг внутриклеточного сАМР в динамике. Однако методика измерения FRET крайне сложна и требует специализированного

оборудования для регистрации эмиссии флуоресценции на двух длинах волн поочередно. Недавно были созданы одноволновые генетически кодируемые сенсоры cAMP, сделавшие мониторинг этой молекулы более доступным. Для внутриклеточного Ca²⁺ также разработаны генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры, обладающие различными спектральными характеристиками.

Путем липофекции клеток линии НЕК293 плазмидными векторами, содержащими гены cAMP-сенсора Pink Flamindo и Ca²⁺-сенсора GEM-GECO1 нами была получена моноклональная линия клеток, стабильно и на высоком уровне экспрессирующих эти сенсоры внутриклеточных cAMP и Ca²⁺. Клетки полученной линии позволяют проводить неинвазивный оптический мониторинг внутриклеточных cAMP и Ca²⁺ и могут использоваться как для фундаментальных исследований внутриклеточной сигнализации, так и для доклинического тестирования потенциальных лекарственных соединений, являющихся лигандами GPCR-рецепторов.

Работа поддержана грантом Президента РФ МК-67.2021.1.4.

¹ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия
Institute of Cell Biophysics RAS – Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research RAS”, Pushchino, Russia

Н.В. Кошелева^{1,2}, М.А. Пешкова¹,
П.Ю. Бикмулина¹, П.И. Котенева¹,
Ю.М. Ефремов¹, А.И. Шпичка^{1,3},
И.М. Зурина^{1,2}, И.Н. Сабурина²,
Син-Цзе Лянь^{1,4,5}

СФЕРОИДЫ ИЗ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

N.V. Kosheleva^{1,2}, M.A. Peshkova¹,
P.Y. Bikmulina¹, P.I. Koteneva¹,
Y.M. Efremov¹, A.I. Shpichka^{1,3},
I.M. Zurina^{1,2}, I.N. Saburina²,
Xing-Jie Liang^{1,4,5}

SPHEROIDS FROM HUMAN SOMATIC CELLS IN BASIC AND APPLIED RESEARCH

kosheleva_n_v@staff.sechenov.ru

Сфероиды – трехмерные самоорганизующиеся в силу природных адгезивных свойств сферические кластеры клеток с реализацией межклеточных взаимодействий, плотностью упаковки и микроокружением приближенными к условиям *in vivo*. Наши исследования посвящены механизмам сфероидогенеза и применению сфероидов в регенеративной медицине. Мезенхимные сфероиды получали из МСК из различных источников (пупочный канатик, жировая ткань, десна), эпителиальные – из клеток буккального и ретинального пигментного эпителиев, а также линии ARPE-19. В сфероидах из соматических клеток человека отсутствует пролиферация. Фенотип клеток влияет на сфероидогенез, а также на структуру, биомеханические свойства, реактивацию и слияние сфероидов. Компактизация мезенхимных сфероидов происходит за 7 суток с уменьшением диаметра в 3 раза, а эпителиальных – за 3 суток с уменьшением диаметра

в 2 раза. В сформированных сфероидов внутренней и поверхностной зоны различаются по строению: поверхность мезенхимных сфероидов состоит из 3–5 слоев плотноупакованных черепицеобразно расположенных клеток, а во внутренней зоне полигональные клетки окружены большим количеством внеклеточного матрикса. Поверхностное натяжение выше в мезенхимных сфероидов. Реактивация мезенхимных сфероидов с миграцией единичных клеток происходит в 6 раз быстрее, чем у эпителиальных, клетки из которых мигрируют по адгезивной поверхности фронтом. Слияние эпителиальных сфероидов происходит в 2 раза быстрее, чем мезенхимных. Эпителиальные сфероиды позволяют быстро реконструировать многослойные эпителиальные выстилки, например, в уже успешно проходящем клинические испытания биоэквиваленте уретры. Мезенхимные сфероиды позволяют васкуляризовать биоэквиваленты. Сфероиды из соматических клеток человека находят широкое применение и как тест системы в скрининге лекарственных препаратов, и как «строительные блоки» в тканевой инженерии.

Исследования строения сфероидов в Сеченовском Университете профинансированы Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения №075-15-2021-596. Работы выполнены при поддержке РФФИ грант №20–04–60063 (культуры клеток) и НИР FGFU–2022–0009 (ангиогенез).

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Sechenov First Moscow State Medical University of The Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

² Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

³ Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Национальный центр нанонауки и технологий Китая, Пекин, Китай
National Center for Nanoscience and Technology of China, Beijing, China

⁵ Университет Китайской академии наук, Пекин, Китай
University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

В.В. Куделькина¹,
А.И. Алексеева¹,
А.С. Халанский¹,
А.М. Косырева¹

**КОЛЛЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ – ТКАНЕВЫЕ ШТАММЫ
И КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ**

V.V .Kudelkina¹,
A.I. Alekseeva¹,
A.S. Khalansky¹,
A.M. Kosyreva¹

**THE COLLECTION OF EXPERIMENTAL TUMORS
OF THE NERVOUS SYSTEM – TISSUE AND CELL LINES**

verakudelkina8047@gmail.com

Клеточные модели опухолей нервной системы применяются в экспериментальной онкологии. Однако данные о тканевых моделях опухолей практически отсутствуют. На базе лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека создана коллекция тканевых и клеточных моделей опухолей нервной системы лабораторных животных. В 1967 году профессор Л.Я. Яблоновская одна из первых в мире индуцировала опухоли головного мозга мышей с помощью интрацеребрального введения ДМБА (Яблоновская, 1968 г.). Большая группа опухолей головного мозга и невриномы были получены в первом поколении крыс после однократного введения беременным животным канцерогена этилнитрозомочевины. Тканевые модели опухолей поддерживаются путем перевивки животным-реципиентам и хранятся в криобанке коллекции. Трансплантация небольшого количества опухолевой ткани ($8-10 \times 10^5$ клеток) образует как подкожные, так и внутримозговые опухоли у крыс Вистар, мышей С57BL/6

($4-6 \times 10^5$ клеток) и кроликов ($8-10 \times 10^6$ клеток). Тканевые модели перевиваемых опухолей обладают рядом преимуществ перед клеточными линиями: тканевые модели имеют высокую воспроизводимость (98-100%), диффузный характер роста в пределах черепной коробки, по морфологии более соответствуют опухолям ЦНС человека (Авцын А.П., 1988 г.): опухоли характеризуются высокой плотностью сосудов, наличием псевдопалисадообразных некрозов, опухолевые клетки тканевых штаммов имеют высокую митотическую активность с патологическими формами митозов. В настоящее время в коллекции находится 27 перевиваемых тканевых штаммов опухолей нервной системы лабораторных животных разной степени злокачественности: астроцитомы 4 степени и глиобластомы – 11 штаммов, астроцитомы 3 степени – 4 штамма, олигодендроглиомы – 4 штамма, эпендимобластомы – 6 штаммов, невриномы – 4 штамма и др. Подробная информация о коллекции представлена на сайте «Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации» <https://ckp-rf.ru/usu/498710/> и открыта для свободного пользования. Тканевые модели опухолей ЦНС эффективно применяются для изучения этиологии, патогенеза и противоопухолевых эффектов различных терапевтических методов.

¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Center of Surgery”, Moscow, Russia

А.Ю. Кулибин¹,
Е.А. Малолина¹

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ СЕРТОЛИ-ПОДОБНЫХ
КЛЕТОК СЕТИ ЯИЧКА МЫШИ ПОДДЕРЖИВАТЬ
РАЗВИТИЕ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO***

A.Yu. Kulibin¹,
E.A. Malolina¹

**INVESTIGATION INTO THE ABILITY OF MOUSE
SERTOLI-LIKE CELLS FROM THE RETE TESTIS
TO SUPPORT THE DEVELOPMENT OF GERM CELLS
*IN VITRO***

Kulibin.a.bkrj@gmail.com

По данным ВОЗ, в мире около 15% пар страдает бесплодием, причем в 20–30 % случаев его причиной являются нарушения развития мужских половых клеток. Для выяснения механизмов бесплодия и разработки методов его терапии необходимы адекватные модельные системы сперматогенеза. Одной из таких моделей является искусственный гаметогенез. Эта процедура уже отработана в нескольких лабораториях, но одной из причин, тормозящих ее практическое применение, является использование в методиках неонатальных клеток Сертоли (КС), необходимых для поддержания развития половых клеток. Использование КС взрослых животных ограничивается их слабой пролиферацией *in vitro*. В недавних исследованиях мы показали, что у половозрелых мышей в сети яичка есть популяция Сертоли-подобных клеток (СПК), способных к активной пролиферации в культуре. В настоящем исследовании мы изучили возможность использования СПК в качестве фидера для поддержания развития половых клеток в 2D культуре. В качестве

контроля использовались культура соматических клеток семенных канальцев взрослых мышей и культура мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ). Последние были использованы и в качестве фидеров для культивирования сперматогониальных стволовых клеток (ССК) – источника половых клеток для дифференцировки. СПК и клетки семенных канальцев выращивали в 2D культуре 6 суток, обрабатывали митомицином, превращая в фидер, и наносили на них ССК. Дифференцировку ССК проводили в два этапа: на первом этапе их размножали на фидерах в течение 3 суток в культуральной среде для ССК при 37°C; на втором этапе запускали дифференцировку, снижая температуру до 34°C и добавляя ретиноевую кислоту. Сбор данных проводили по окончании первого этапа, а также на 2, 5 и 11 сутки культивирования при 34°C. Подсчеты числа половых клеток показали, что на фидерах из СПК их количество на все сроки фиксации было достоверно выше, чем в контрольных культурах, причем на последнем сроке фиксации более чем в два раза. Уровень и динамика экспрессии генов дифференцирующихся сперматогониев и мейоцитов *Stra8* и *Scp3*, соответственно, были примерно одинаковыми как в культуре СПК, так и в культуре клеток семенных канальцев, в то время как на МЭФ доля SCP3⁺ клеток на последнем сроке фиксации была в 9 раз ниже. Окраска на лектин – маркер гаплоидных половых клеток, не выявила лектин-положительных половых клеток во всех вариантах культуры. Вероятно, это связано с блоком мейоза, для преодоления которого необходимо отработать оптимальные условия культивирования.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

А.К. Лейберова¹,
Ю.С. Храмцова¹

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

A.K. Leyberova¹,
Y.S. Khramtsova¹

OPPORTUNITY FOR THE USE OF MAST CELL CULTURE

hramtsova15@mail.ru

Из-за своей неоднозначной роли в физиологических механизмах, высокой специализации и практически повсеместной встречаемости в органах и тканях тучные клетки являются актуальными объектами для исследования. Чистая культура тучных клеток позволит изучать свойства этих клеток, использовать их в экспериментах по изучению новых материалов в тканевой инженерии, в доклинических испытаниях, в фибротизации тканей. При этом мастоциты занимают не более 10 % от всех соединительнотканых клеток организма, что усложняет их выделение из ткани.

Цель данного исследования – разработка методики культивирования перитонеальных тучных клеток и оценка возможности их использования как экспериментальной модели. Клетки получали из перитонеальной жидкости мышей линии СВА внутрибрюшинным лаважем с предварительной стимуляцией прозеринном. Идентификацию тучных клеток производили окраской толуидиновым синим, альциановым синим с сафранином, которые связываются с протеогликанами (главным образом с гепарином) и являются специфическими красителями для этих клеток. Тучные клетки выращивали в асептических условиях в среде РМС с добавлением SCF и IL-3. На всех этапах культивирования проводили подсчет числа клеток, их морфологическое описание и морфометрические

измерения. Оценку жизнеспособности культуры клеток проводили с помощью трипанового синего и МТТ теста. Для оценки возможности использования полученной культуры в качестве экспериментальной модели был проведен эксперимент с препаратом кетотифен – стабилизатором мембран тучных клеток.

В ходе исследования было показано, что предварительное введение животным прозерина внутримышечно увеличивает количество клеток, вышедших в перитонеальную жидкость, в 2 раза. Снятие культуры с подложки культурального флакона нужно производить только промыванием раствором Дульбекко. Использование трипсина при этом не допустимо, т. к. в культуре помимо тучных клеток появляются и фибробласты. Основное время снижения жизнеспособности приходится на первое время культивирования, что может быть связанным с адаптацией клеток к новым условиям. После 9 суток жизнеспособность клеток снижается незначительно. Культура остается жизнеспособной в течение месяца. Тучные клетки в культуре реагируют на введение кетотифена. Так, низкие концентрации препарата не вызывают изменений жизнеспособности клеток, средние концентрации повышают ее, а высокие, наоборот, снижают.

Таким образом, разработанная методика позволяет получить чистую культуру тучных клеток, которая может быть использована в дальнейших исследованиях, в частности, для проведения доклинических испытаний лекарственных препаратов.

Работа выполнена в рамках ГЗ ИИФ УрО РАН, № проекта 122020900136-4.

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия
Institute of immunology and physiology UB RAS, Yekaterinburg, Russia

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕТАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛОНИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ
СВИНЕЙ**

A.V. Lopukhov¹

**USE OF FETAL FIBROBLASTS FOR PRODUCTION
OF PORCINE CLONED EMBRYOS**

vubi_myaso@mail.ru

Сущность соматического клонирования (somatic cell nuclear transfer, SCNT) заключается в удалении ядра зрелой яйцеклетки с получением энуклеированного ооцита (цитопласт) и замене его на ядро соматической клетки (кариопласт). С точки зрения практической целесообразности наиболее предпочтительным типом соматических клеток являются фетальные фибробласты. Цель настоящей работы состояла в моделировании метода получения клонированных эмбрионов свиней с использованием фетальных фибробластов и оценке его эффективности. Источником фетальных фибробластов служили 30-дневные плоды, полученные *post mortem* от предварительно осемененной свиньи с диагностированной супоросностью. Плоды разрезали на мелкие фрагменты, для дезагрегации ткани обрабатывали 0,25% трипсином-ЭДТА. Первичную культуру наращивали до монослоя, однократно пассажировали и замораживали в жидком азоте до использования. Перед SCNT клетки размораживали и культивировали до конфлюэнтного монослоя с последующей синхронизацией клеточного цикла методом контактного ингибирования в течение 48 часов. На всех этапах культивирования использовали среду ДМЕМ с высоким (4,5 г/л) содержанием глюкозы и 10% фетальной бычьей сыворотки. В качестве цитопластов (n=77) использовали ооциты,

выделенные из яичников убитых свиней, созревшие *in vitro* в модифицированной среде ТС-199 с 0,5 мкг/мл ФСГ и 0,5 мкг/мл ЛГ в течение 22 часов и в последующие 22–24 часа – в той же среде без гормонов. Энуклеацию созревших ооцитов проводили путем отбора первого полярного тельца и 20 % ооплазмы на микроманипуляторе Narishige. Кариопласт переносили в перивителлиновое пространство цитопласта через отверстие в зоне пеллюцида, сформированное при энуклеации. Слияние цитопласта с кариопластом и активацию полученных цитогридов осуществляли одновременно 2 импульсами постоянного тока напряжением 25 В и продолжительностью 30 мкс. Активированные цитогриды культивировали до стадии бластоцисты. Нами было выявлено 54 ($70,0 \pm 1,6$ %) комплекса цитопласт-кариопласт с признаками слияния, из которых 42 ($78,1 \pm 3,5$ %) достигли стадии двухклеточного эмбриона. Было получено 13 клонированных бластоцист, развившихся из цитогридов с эффективностью $23,8 \pm 1,4$ %. Таким образом, предложенный метод может использоваться для получения клонированных эмбрионов свиней.

¹ Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Подольск, Московская область, Россия
Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Podolsk, Moscow Region, Russia

А. А. Мальченкова¹,
Е.Н. Кособокова¹

**ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ
МЕТОДОМ ПРОФИЛИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ КОРОТКИХ
ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ**

A.A. Malchenkova¹,
E.N. Kosobokova¹

**THE AUTHENTICATION OF CELL LINES BY THE PROFILING
METHOD BASED ON SHORT TANDEM REPEATS**

nastya.malchenkova@yandex.ru

Внедрение новых подходов в молекулярно-биологические исследования позволяет обнаружить устоявшиеся заблуждения в накопленном знании. Результаты части опубликованных в международных литературных источниках работ подвергаются сомнению в связи с отсутствием подтверждения подлинности и чистоты использованной клеточной линии, а также с достоверными фактами выявления кросс-контаминаций и перерождений.

Целью данной работы стало апробирование набора COrDIS (Гордиз, Россия) для подтверждения подлинности клеточных линий в биобанках методом профилирования на основе коротких tandemных повторов (STR).

Исследование включает постановку мультиплексной ПЦР-реакции с праймерами для ряда полиморфных STR-локусов и анализ ампликонов методом капиллярного электрофореза с использованием автоматической детекции флуоресценции. Результатом является простой числовой код, соответствующий длинам продуктов ПЦР, амплифицированных в каждом локусе. Применяя этот метод к клеточным линиям, лаборатория может как проверить подлинность коммерческих клеточных линий, так и сформировать базу профилей своих линий.

В работе мы использовали набор отечественного производителя COrDIS «ЭКСПЕРТ 26» (Гордиз, Россия), валидированный для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦР-анализа 26-ти высоко полиморфных локусов геномной ДНК человека. Среди них представлены как маркеры стандартных международных панелей локусов: CODIS (Combined DNA Index System), EXPANDED CODIS (Expanded Combined DNA Index System), Европейских баз данных на основе ESS (European standard set), включая страны, использующие SE33 как обязательный маркер, так и собственные уникальные маркеры Гордиз.

В рамках проекта «Создание и развитие биоресурсной коллекции генетически и фенотипически охарактеризованных клеточных линий и первичных опухолей человека», поддержанного грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2021-1060 от 28.09.2021), проведено профилирование 36 клеточных линий, из которых 21 анонсированы в международных базах данных и 15 уникальных, полученных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Полученные STR-профили позволили подтвердить подлинность коммерческих клеточных линий, сформировать базу профилей используемых в исследованиях уникальных линий коллекции, а также оценить частоту встречаемости артефактов анализа (шипы, побочные пики, шум, статтеры и капли краски) и определить возможные варианты работы с ними.

¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия
Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

А.Г. Мензоров^{1,2}

**КОЛЛЕКЦИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА И МЛЕКОПИТАЮЩИХ
ОБЩЕБИОЛОГИЧЕСКОГО И БИОМЕДИЦИНСКОГО
НАПРАВЛЕНИЯ ИЦИГ СО РАН**

A.G. Menzorov^{1,2}

**COLLECTION OF PLURIPOTENT HUMAN AND MAMMALIAN
CELL CULTURES FOR BIOLOGICAL AND BIOMEDICAL
RESEARCH OF ICG SB RAS**

menzorov@bionet.nsc.ru

Коллекция специализируется на плюрипотентных клетках млекопитающих (<https://ckp.icgen.ru/cells/>; http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL).

Основа Коллекции – 37 линий эмбриональных стволовых (ЭС) клеток мыши, в том числе с генетическими модификациями. ЭС клетки дают вклад в зародышевый путь в тесте на химеризм и пригодны для получения трансгенных мышей [1]. Также есть 6 линий гибридных клеток мыши [2]. 10 линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека с нормальным генотипом, с различной копийностью гена *CNTN6* и от пациентов с кольцевыми хромосомами – основа для изучения нейрогенеза и синдрома кольцевых хромосом [3]. 6 линий ЭС клеток и 13 линий ИПСК американской норки позволяют изучать плюрипотентность этого уникального модельного объекта [4]. Также в Коллекции есть генетически модифицированные клетки лимфомы, фибробласты человека и представитель протист *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii* [5].

В ближайшее время планируем добавить линии ИПСК и глиом человека.

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063, и бюджетным проектом № FWNR-2022-0019.

Литература:

1. **Menzorov A.G., Orishchenko K.E., Fishman V.S. et al.** Targeted genomic integration of EGFP under tubulin beta 3 class III promoter and mEos2 under tryptophan hydroxylase 2 promoter does not produce sufficient levels of reporter gene expression. *J Cell Biochem.* 2019; 120(10):17208–18.

2. **Matveeva N.M., Fishman V.S., Zakharova I.S. et al.** Alternative dominance of the parental genomes in hybrid cells generated through the fusion of mouse embryonic stem cells with fibroblasts. *Sci Rep.* 2017; 7(1):18094.

3. **Nikitina T.V., Kashevarova A.A., Gridina M.M. et al.** Complex biology of constitutional ring chromosomes structure and (in)stability revealed by somatic cell reprogramming. *Sci Rep.* 2021; 11(1):4325.

4. **Menzorov A.G., Matveeva N.M., Markakis M.N. et al.** Comparison of American mink embryonic stem and induced pluripotent stem cell transcriptomes. *BMC Genomics.* 2015; 16(Suppl 13):S6.

5. **Konstantinov D.K., Menzorov A., Krivenko O., Doroshkov A.V.** Isolation and transcriptome analysis of a biotechnologically promising Black Sea protist, *Thraustochytrium aureum* ssp. *Strugatskii*.

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Л.С. Миленина¹,
З.И. Крутецкая¹,
В.Г. Антонов²

**НЕЙРОЛЕПТИК ГАЛОПЕРИДОЛ ПОДАВЛЯЕТ
Ca²⁺-ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ГЛУТОКСИМОМ
И МОЛИКСАНОМ, В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ
ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ КРЫСЫ**

L.S. Milenina¹,
Z.I. Krutetskaya¹,
V.G. Antonov²

**NEUROLEPTIC HALOPERIDOL SUPPRESSES
Ca²⁺-RESPONSES INDUCED BY GLUTOXIM AND MOLIXAN
IN CULTIVATED RAT PERITONEAL MACROPHAGES**

l.milenina@spbu.ru, z.krutetskaya@spbu.ru

Галоперидол относится к первому поколению типичных нейролептиков и имеет долгую историю использования в клинике для терапии шизофрении и других психических заболеваний. Известно многогранное влияние галоперидола на клеточные процессы. Так, выявлено высокое сродство галоперидола к рецепторам сигма-1 (σ -1 receptors, σ 1R). σ 1R – повсеместные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, имеющие уникальную структуру и фармакологический профиль. Для выявления участия σ 1R в регуляции процессов Ca²⁺-сигнализации в макрофагах исследовали влияние антагониста σ 1R галоперидола на Ca²⁺-ответы, вызываемые иммуномодуляторами глутоксимом[®] (динатриевая соль окисленного глутатиона с нанодобавкой платины, «ФАРМА-ВАМ», Россия) и моликсаном[®] (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина, «ФАРМА-ВАМ», Россия) в культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крысы.

Для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, использовали автоматизированную установку на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B и флуоресцентный Ca^{2+} -зонд Fura-2AM.

Обнаружено, что преинкубация макрофагов с 30 мкг/мл галоперидола в течение 6 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводила к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (на $50,3 \pm 8,4 \%$, $n = 7$; $P < 0,05$), так и последующего депо-зависимого входа Ca^{2+} в клетки (на $54,5 \pm 9,5 \%$, $n = 7$, $P < 0,05$), индуцируемых глутоксимом. Сходные данные были получены в опытах по влиянию 30 мкг/мл галоперидола на Ca^{2+} -ответы, вызываемые 100 мкг/мл моликсана.

Показано также, что добавление 50 мкг/мл галоперидола на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного глутоксимом или моликсаном, вызывает значительное (на $51,4 \pm 9,0 \%$, $n = 12$; $P < 0,05$) подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

Полученные данные свидетельствуют о возможном участии $\sigma 1R$ в комплексном сигнальном каскаде, вызываемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах, а также об участии $\sigma 1R$ в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Работа выполнена в рамках Договора СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 05/03 от 12.03.2020.

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

Е.И. Моргун¹, А.Г. Золкин²,
А.С. Микаелян¹, Н.О. Дашенкова¹,
Е.А. Воротеляк^{1,3}

ЭКСПРЕССИЯ ПРОТЕИНКИНАЗ RIPK1 И RIPK3 В КУЛЬТУРЕ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ НАСАТ

E.I. Morgun¹, A.G. Zolkin²,
A.S. Mikaelyan¹, N.O. Dashenkova¹,
E.A. Vorotelyak^{1,3}

EXPRESSION OF RIPK1 AND RIPK3 PROTEIN KINASES IN HUMAN KERATINOCYTE CULTURE OF HACAT

Lady.morgun2016@yandex.ru

Известно, что канонической функцией RIPK-1 и RIPK-3 является участие в таком типе запрограммированной клеточной гибели, как некроптоз. Кроме того, RIPK-1 и RIPK-3 имеют ряд неканонических функций, например, участие в апоптозе и воспалительных процессах.

В ходе работы были использованы 2 модели *in vitro*: модель воспалительного микроокружения и модель дедифференцировки эпидермальных клеток линии HaCaT (депонированной в УНУ «Коллекция клеточных культур» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН). В модели воспалительного микроокружения клетки подвергались воздействию цитокинов TNF- α и интерферона- γ . В модели дедифференцировки клетки инкубировали в низкокальциевой среде Cnt-VM. Анализ динамики изменения морфологии клеток в присутствии провоспалительных цитокинов показал, что через 48 часов после воздействия наблюдались изменения морфологических признаков: образование отростков, приобретение веретеновидной формы, распластывание и утрата межклеточных контактов, а также признаки клеточной гибели. Через 48 часов после начала эксперимента мы наблюдали повышение

частоты TUNEL-позитивных клеток в экспериментальной группе в сравнении с клетками в контрольной группе.

Методом qПЦР показано увеличение экспрессии *RIPK3* в группе «TNF- α^+ , интерферон- γ^+ » через 48 часов после воздействия по сравнению с контролем, что согласуется с результатами, полученными методом TUNEL, указывающими на активацию запрограммированной клеточной гибели. Вместе с тем динамика экспрессия *RIPK-1* и *RIPK-3* в контрольных группах позволяет предположить, что роль этих протеинкиназ в эпидермальных клетках не ограничивается запрограммированной клеточной гибелью и может быть связана с дифференцировочным статусом клеток НаСаТ. Для проверки этого предположения мы провели эксперимент по дедифференцировке кератиноцитов в низкокальциевой среде Cnt-VM. Через 48 часов после начала культивирования в низкокальциевой среде клетки претерпели морфологические изменения, сходные с морфологическими изменениями, наблюдаемыми в модели воспалительного микроокружения. Было показано возрастание экспрессии *RIPK3* в модели дедифференцировки через 48 часов после начала культивирования в среде Cnt-VM по сравнению с контролем.

Таким образом, мы предполагаем, что роль *RIPK-3* может быть связана не только с клеточной гибелью кератиноцитов, но и иметь другие функции, такие как участие в процессах, связанных с дифференцировкой клеток.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия
Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

А.В. Моршнева¹, О.О. Гнедина¹,
Д.Н. Киндт¹, С.Д. Лосев¹,
М.В. Иготти¹

**ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЫВОРОТКИ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КАЧЕСТВЕ
АЛЬТЕРНАТИВЫ ТЕЛЯЧЬЕЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ
СЫВОРОТКЕ (FCS) ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ A549 И HCT 116**

A.V. Morshneva¹, O.O. Gnedina¹,
D.N. Kindt¹, S.D. Losev¹,
M.V. Igotti¹

**POSSIBILITY OF USING ADULT BOVINE SERUM AS AN
ALTERNATIVE TO FETAL CALF SERUM FOR CULTIVATION
OF CANCER CELL LINES A549 AND HCT 116**

amorshneva@incras.ru

Выбор подходящей сыворотки является одним из ключевых факторов успешного культивирования линий клеток. Мы рассмотрели возможность использования сыворотки крупного рогатого скота (сКРС) в качестве более доступной альтернативы телячьей эмбриональной сыворотке (FCS) для культивирования клеточных линий A549 и HCT 116, широко используемых в онкологических исследованиях. Для проверки возможности замены FCS на сКРС мы параллельно культивировали клетки в присутствии той или иной сыворотки и сравнивали в этих параллелях такие клеточные параметры, как пролиферативный индекс (кривые роста), распределение по клеточному циклу (проточная цитометрия) и метаболическая активность клеток (п-тест). Также провели сравнение ответа опухолевых клеток на действие ряда цитотоксических агентов (МТТ-тест).

Клетки культивировали при 37°C и 5 % CO₂ в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 2 mM L-глутамин (Биолот,

Россия) и 40 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия), дополненной 10 % сыворотки FCS (Gibco, США) или сыворотки КРС (Биолот, Россия).

Согласно данным кривых роста, скорость пролиферации клеток А549 при культивировании на сКРС ниже, чем при культивировании на FCS, тогда как клетки НСТ 116 демонстрируют сопоставимую скорость пролиферации. Так, к 72 ч культивирования на сКРС размер популяции клеток А549 и НСТ 116 был меньше, чем при культивировании на FCS, на 40 % и 10 %, соответственно. Соответствующая динамика наблюдается в МТТ-тестах по оценке жизнеспособности клеток. По данным проточной цитометрии, замена FCS на сКРС не приводит к существенному изменению распределения по клеточному циклу в обеих исследованных линиях. Ответ клеток НСТ 116 на действие цитостатиков был одинаков при культивировании на FCS или сКРС.

Однако клетки А549, культивируемые на сКРС, оказались менее чувствительными к некоторым из исследованных цитостатиков вследствие снижения их пролиферативного потенциала по сравнению с А549, культивируемыми на FCS.

Таким образом, сыворотка КРС может быть использована для линии НСТ 116 как для культивирования, так и в экспериментах. Клетки А549 способны пролиферировать на сыворотке КРС, однако возможность ее использования в экспериментах имеет ограничения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 22-25-20229.

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of cytology RAS, St. Petersburg, Russia

М.И. Мурашева¹,
О.П. Кисурина-Евгеньева¹,
Д.М. Поташникова¹,
Г.Е. Онищенко¹

**ЭЛИМИНАЦИЯ КЛЕТОК С МИКРОЯДРАМИ
В КУЛЬТУРЕ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ
КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА НАСАТ**

M.I. Murashova¹,
O.P. Kisurina-Evgenieva¹,
D.M. Potashnikova¹,
G.E. Onishchenko¹

**ELIMINATION OF CELLS WITH MICRONUCLEI
IN A CULTURE OF IMMORTALIZED HUMAN
KERATINOCYTES НАСАТ**

evgengeva@mail.ru

Иммортиализованные кератиноциты НаСаТ считаются условно нормальными и служат модельной системой для изучения дифференцировки и дисфункций кожи человека. При этом в популяции встречаются клетки разной ploидности и клетки с микроядрами (МЯ). МЯ являются причиной генетической нестабильности, однако НаСаТ сохраняют нетрансформированный статус с 1988 г. По-видимому, в культуре реализуются механизмы, позволяющие избегать трансформации. Цель работы: выяснение пути образования клеток с МЯ и их дальнейшей судьбы в культуре НаСаТ. МЯ окрашивали DAPI, для прижизненных исследований использовали ПО Vision Bio «West Medica». Оценку ploидности проводили в программе Fijі и с помощью проточной цитофлуориметрии.

В популяции НаСаТ число клеток с МЯ на 1 сутки после пересева составляет 4,5 %, к 3 суткам их число увеличивается до 12,1 % и снижается к 6 суткам до 10,1 %. Было выделено 5 типов клеток

с МЯ: клетки с мелкими (до 4 мкм²) одиночными и множественными МЯ, клетки с крупными одиночными и множественными МЯ и клетки с множественными МЯ, не содержащие основного ядра. Число клеток с мелкими одиночными МЯ в процессе культивирования не меняется. Увеличение числа клеток с МЯ на 3 сутки происходит за счет остальных 4 типов. Уменьшение числа клеток с МЯ к 6 суткам происходит за счет снижения числа клеток с мелкими множественными и одиночными крупными МЯ. Число клеток с множественными крупными МЯ и клеток без основного ядра продолжает увеличиваться.

Клетки с множественными МЯ формируются в результате патологических митозов полиплоидных клеток. В культуре НаСаТ число клеток с повышенной ploидностью увеличивается с 3,9 % (1 сутки) до 16,5 % (3 сутки). Число патологических митозов при этом составляет около 0,7 %. К 6 суткам культивирования число полиплоидных клеток возвращается к исходному уровню; число патологических митозов также снижается до 0,2 %, при этом митотический индекс в популяции не меняется и составляет около 3,5 %. Апоптотический индекс возрастает с 1,6 % на 1 сутки до 1,9% на 3 сутки и 3,7 % на 6 сутки.

Прижизненные наблюдения показали, что 60 % клеток с множественными МЯ гибнут путем апоптоза. Клетки с крупными (предположительно полиплоидными) ядрами на 3–4 сутки культивирования вступают в патологический митоз (10 из 15), заканчивающийся образованием 2–5 клеток с МЯ; 60 % дочерних клеток вступают в апоптоз.

Возможно, в культуре НаСаТ спонтанно возникающие полиплоидные клетки вступают в патологический митоз, завершающийся образованием клеток с МЯ, которые элиминируются путем апоптотической гибели.

Исследование выполнено в рамках НИР 121032300098-5.

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Д.Д. Новак^{1,2}, О.С. Троицкая²,
А.А. Нуштаева², М.Е. Варламов^{1,2},
О.А. Коваль^{1,2}

**3D-МОДЕЛЬ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК MCF7,
ГИПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩИХ EGFR, КАК ИНСТРУМЕНТ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ
ТАРГЕТНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

D.D. Novak^{1,2}, O.S. Troitskaya²,
A.A. Nushtaeva², M.E. Varlamov^{1,2},
O.A. Koval^{1,2}

**3D MODEL BASED ON EGFR-OVEREXPRESSING MCF7
CELLS AS A TOOL FOR THE TARGETED ANTITUMOR
DRUG RESEARCH**

d.novak@g.nsu.ru

Факторы роста и их рецепторы регулируют автономный рост раковых клеток. Хотя рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) присутствует на поверхности нормальных клеток, показана его гиперэкспрессия в различных опухолях эпителиального происхождения. Моделью, позволяющей исследовать эффективность противоопухолевых препаратов, таргетных к EGFR, может стать пара клеточных линий, отличающихся только экспрессией EGFR.

Целью работы являлось получение и характеристика линии клеток аденокарциномы молочной железы MCF7, гиперэкспрессирующей EGFR человека. На основе линии клеток MCF7 дикого типа с низким уровнем EGFR методом ретровирусной трансдукции была получена линия клеток MCF7-EGFR. Показано, что уровень EGFR в клетках MCF7-EGFR увеличился в 6,5 раз по сравнению с клетками дикого типа. Установлено, что гиперэкспрессия EGFR в клетках MCF7 приводит к спонтанному сферообразованию

в стандартных условиях культивирования. Сфероиды MCF7-EGFR характеризуются округлой формой с четко выраженной внешней границей и медианным диаметром 100 мкм. Крупные сфероиды могут достигать размера более 400 мкм.

Гистологический анализ показал наличие некротического ядра в центре крупных сфероидов. В сфероидах MCF7-EGFR хорошо визуализируются белок плотных контактов ZO-1 и белок межклеточной адгезии E-кадгерин, которые участвуют в негативной регуляции клеточной миграции. Показано, что часть клеток сфероидов MCF7-EGFR теряют рецепторы HER2 и HER3. Установлено, что в сфероидах MCF7-EGFR увеличивается популяция клеток с фенотипом CD24^{-/low}/CD44^{-/low} и уменьшается популяция клеток с фенотипом CD24⁺/CD44⁺ по сравнению с клетками дикого типа. Применение таргетного к EGFR цитотоксического препарата цетуксимаб снижало жизнеспособность клеток сфероидов.

Таким образом, сфероиды MCF7-EGFR являются 3D-моделью для исследования таргетных к EGFR препаратов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-74-10039 и частично грантом Правительства НСО за 2022 г. (№ Гр-7).

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk,
Russia

Ю.А. Новикова¹, О.С. Роговая²,
А.Н. Попова², А.Д. Финошин²,
Е.А. Воротеляк²

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КРИОХРАНЕНИЯ
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК КОЖИ И ДИНАМИКУ
ПОПУЛЯЦИИ ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

Yu.A. Novikova¹, O.S. Rogovaya²,
A.N. Popova², A.D. Finoshin²,
E.A. Vorotelyak²

**INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF CRYOSTORAGE
ON THE VIABILITY OF SKIN CELLS AND THE DYNAMICS
OF THE POPULATION OF EPIDERMAL CELLS**

yula1308@mail.ru

Эпидермальные стволовые клетки играют важную роль в регенеративной медицине, в особенности при лечении ожогов и хронических кожных ран. Криоконсервация эпидермальных кератиноцитов человека является важным этапом в технологиях их медицинского применения. Однако криосохранение кератиноцитов в суспензии стимулирует процессы терминальной дифференцировки и апоптоза, приводящие к массивной потере пула стволовых и прогениторных кератиноцитов. Нашей целью было исследовать структуру и динамику гибели кератиноцитов человека, а также проследить динамику экспрессии маркеров стволовых клеток эпидермиса кератиноцитов после криосохранения. Клетки были заморожены нами по разработанному ранее протоколу замораживания суспензии кератиноцитов на базе УНУ «Коллекция клеточных культур ИБР РАН» и выдержаны в условиях криохранилища в течение минимум 2 недель.

Методом проточной цитометрии был проведен анализ на определение доли апоптоза в суспензиях клеток до и после заморозки.

Показано, что в суспензии кератиноцитов сразу после размораживания высокий уровень клеток в позднем апоптозе – 38 %, к 7 суткам их доля снижается до 23 %. При этом количество некротических клеток менее 1 % во всех вариантах. Иммунофлуоресцентным методом были выявлены доли пролиферирующих клеток и клеток, положительных по маркеру стволовых и ранних прогениторных клеток эпидермиса р63, в динамике роста первичной культуры и культуры, полученной из размороженных клеток. Уровни экспрессии интегрина $\beta 4$, специфического для стволовых клеток, а также уровень экспрессии сигнального белка фосфо-YAP оценивали методом вестерн-блот анализа. В результате было выявлено, что доля пролиферирующих клеток в культуре на 3 сутки после посева на пластик максимальна, причем эта тенденция сохраняется и после криохранения (73 % и 81 % ki67-положительных клеток, соответственно), а к 7 суткам снижается в обоих вариантах (35 % и 45 %). Доля р63 положительных клеток увеличивается к 3 суткам культивирования до 89 % в кератиноцитах до замораживания и 82 % в культуре размороженных клеток и остается высокой к 7 суткам (86 % и 84 %, соответственно). Экспрессия интегрин $\beta 4$ была выявлена в клетках до заморозки, однако сразу после размораживания культуры и через 1 сутки после размораживания она практически не детектируется, а к 7 суткам происходит восстановление экспрессии. Экспрессию фосфо-YAP детектировали во всех культурах до заморозки, сразу после размораживания, на 1 сутки и 7 сутки. Таким образом, мы можем сделать вывод, что при криоконсервации эпидермальных кератиноцитов пул стволовых клеток заметно снижается, однако полностью восстанавливается к 7 суткам после размораживания.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ 21-74-30015.

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

А. А. Нуштаева¹, М.М. Абдурахманова^{1,2},
М.С. Ермаков¹, В. А. Рихтер¹,
Т.А. Гайнер¹, О. А. Коваль^{1,2}

**СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ КУЛЬТУР КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ
И РАЗРАБОТКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ**

A. A. Nushtaeva¹, M. M. Abdurakhmanova^{1,2},
M.S. Ermakov¹, V.A. Richter¹,
T.A. Gainer¹, O. A. Koval^{1,2}

**PRIMARY CELL CULTURES AS MODEL SYSTEMS
IN BREAST CANCER RESEARCH**

nushtaeva.anna@gmail.com

На сегодняшний день не существует единой клеточной и опухолевой модели на животных, адекватно отражающей опухолевую прогрессию. Иммутиализованные клеточные линии опухолей молочной железы являются моделью для исследования биологических процессов, связанных с этими заболеваниями, а также платформой для поиска потенциальных терапевтических маркеров и стратегий лечения. Тем не менее, только совокупность линий опухолевых клеток может моделировать гетерогенность опухолей человека. В связи с этим, обеспечение разнообразия клеточных и опухолевых моделей злокачественных новообразований остается актуальной задачей.

Целью настоящей работы являлась разработка методов получения первичных культур клеток из опухолевой ткани молочной железы как моделей для изучения специфических молекулярных маркеров и фенотипических особенностей, обеспечивающих создание опухолевых и метастатических моделей на животных.

Разработан метод получения и получены персональные культуры клеток из опухолевой и здоровой ткани молочной железы человека

с эпителиоподобным или мезенхимальноподобным фенотипами. Получено и охарактеризовано 12 новых культур клеток молочной железы человека.

Разработан метод «импульсной гипоксии», индуцирующий мезенхимально-эпителиальный переход в культуре опухолевых клеток молочной железы *in vitro* с представленностью специфических молекулярных маркеров мезенхимально-эпителиального перехода и эпителиальных клеток.

Впервые показано, что базовый уровень мРНК IFIT3 в клетках культур молочной железы человека может отражать чувствительность клеток к иммуностимулирующим препаратам.

Получены новые модели метастазирующей и химиорезистентной опухолей молочной железы человека.

Разработанные клеточные и опухолевые модели онкопролиферативных заболеваний человека могут быть использованы исследователями, работающими в области клеточной биологии и канцерогенеза, для исследования механизмов опухолевой прогрессии и скрининга новых противоопухолевых агентов.

Работа выполнена в рамках проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки РФ (№ АААА-А17-117020210023-1) и Российского научного фонда (проект № 20-74-10039).

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

П.А. Поляков¹,
А.В. Артемов²,
Ю.А. Нащекина²

**СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ КРАСНОГО ПИГМЕНТА
ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE***

P.A. Polyakov¹,
A.V. Artemov²,
Yu.A. Nashchekina²

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS
OF THE RED PIGMENT OF *S. CEREVISIAE* YEAST**

art04@list.ru

Предлагается к рассмотрению полимерное соединение, выделяемое из дрожжей *S. cerevisiae*.

Данное соединение — красный пигмент, представляет собой гетерогенный по составу и молекулярной массе полимер бурого цвета весом 2-8кДа. Пигмент накапливается в вакуолях дрожжей при возникновении мутаций в биосинтезе аденина, в результате чего колонии клеток приобретают красную окраску.

Основу полимера составляют имидазольные кольца, ковалентно сцепленные атомами углерода C2-, C4-, а также присоединенный в положении N1 рибозильный радикал и в положении C5 — аминокислотные остатки. Изучение пигмента с помощью ВЭЖХ показало высокое содержание в его структуре пролина, аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Электронная микроскопия показала, что добавление очищенного пигмента к сформированным фибриллам инсулина и лизоцима приводит к образованию крупных фибриллярных агрегатов.

Пигмент сорбируется на анионообменной колонке, растворяется в воде и в спиртах, не смешивается с хлороформом.

Добавление очищенного пигмента в жидкие питательные среды увеличивает продолжительность жизни дрожжевых штаммов, экспрессирующих белковый продукт первого экзона гена мутантного гентингина с удлинённым полиглутаминовым трактом, содержащим 25 или 103 остатка глутамина (Htt25Q-GFP, Htt103Q-GFP) и α -синуклеин человека (α Syn-GFP) в условиях хронологического старения, увеличивает среднюю интенсивность флуоресценции GFP.

Интересным свойством пигмента является его способность флуоресцировать, что может служить дополнительным маркером при изучении биологических объектов с помощью люминесцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

Проверка биосовместимости пигмента с клеточной линией глиобластомы T98G с помощью МТТ-теста показала отсутствие токсичности пигмента в концентрациях до 10 мг/мл.

¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия
St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

Г.Г. Полянская¹

**НАУЧНАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ
КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ПОЗВОНОЧНЫХ ИНЦ
РАН НА ПРОТЯЖЕНИИ 45 ЛЕТ СВОЕГО СУЩЕСТВОВАНИЯ**

G.G. Poljanskaya¹

**SCIENTIFIC AND PRACTICAL ACTIVITY
OF THE COLLECTION OF VERTEBRATE CELL CULTURES
OF THE INC RAS FOR 45 YEARS OF ITS EXISTENCE**

gpolanskaya@gmail.com

Клеточные культуры человека, животных и растений широко используются для исследований в разных областях биологии. В 1978 году была создана Всесоюзная (Российская) коллекции клеточных культур (РККК), в которую вошло 9 коллекций. Коллекция культур клеток позвоночных (КККП) была утверждена Центральным Банком РККК. В последние годы РККК перестала существовать. Составляющие ее коллекции работают самостоятельно. В фондах КККП содержится 155 клеточных линий человека и животных и 674 депонированных клеточных линии. Принципы работы КККП: 1. Создание, поддержание и развитие фондов коллекции; 2. Разработка единых требований к качеству коллекционного материала, создание паспортов клеточных линий согласно международным требованиям; 3. Совершенствование методов работы с клеточными линиями на основе проведения исследований, посвященных изучению влияния условий культивирования на генетическую изменчивость клеточных линий; расширение и углубление фундаментальных исследований по биологии клетки в культуре; 4. Проведение активной научно-информационной деятельности; 5. Депонирование клеточных линий и гибридом в связи с процедурой патентования; 6. Обеспечение образцами коллекционного клеточного материала учреждений РФ;

7. Оказание научно-методической помощи сотрудникам по методам культивирования и анализа клеточных линий. За время существования КККП были проведены научные исследования по 6 направлениям: 1) получение и характеристика гибридом; 2) изучение влияния условий культивирования, криоконсервации и контаминации на кариотипическую изменчивость клеточных линий; 3) получение и характеристика новых линий эмбриональных стволовых клеток человека; 4) получение и характеристика новых линий мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека; 5) сравнительная характеристика активности матриксных металлопротеиназ в процессе дифференцировок и репликативного старения (РС) разных МСК; 6) изучение реорганизации цитоскелета в процессе РС МСК. По направлениям 1–3 работа завершена; по направлениям 4–6 исследования продолжаются. В частности, проведен сравнительный цитогенетический анализ МСК разного происхождения. Таким образом, КККП является активно работающей научной структурой, поддерживающей развитие фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований в РФ.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ по проекту 15.БРК.21.0011 (Соглашение № 075-15-2021-1063).

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

О.А. Рогачевская¹

**ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЭКЗОГЕННЫЕ GPCR
И ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ СЕНСОРЫ**

О.А. Rogachevskaya¹

**DEVELOPMENT OF MONOCLONAL CELL LINES
WITH EXOGENOUS GPCR AND GENETIC ENCODED
SENSORS**

o.rogachevskaja@gmail.com

Гетерологическая экспрессия разнообразных белков в клетках перевиваемых линий широко используется для изучения различных аспектов рецепции и внутриклеточной сигнализации. Подобные работы можно выполнять на клетках, временно экспрессирующих целевой белок, однако при длительных экспериментах более логично получение моноклональных клеточных линий с постоянным высоким уровнем экспрессии белка интереса в большей части клеток. Для этого нами используется поэтапное улучшение модифицированных клеток: 1) наращивание/отбор в присутствии селективного антибиотика после химической трансфекции; 2) отбор клеток с помощью клеточного сортера по интенсивности флуоресценции (1 клетка в одну лунку 96 луночного планшета); 3) визуальный отбор и наращивание выбранных клонов; 4) отбор лучших клонов с помощью физиологических экспериментов. Данный подход достаточно длителен, однако полученные в процессе моноклональные клеточные линии характеризуются не только высоким уровнем экспрессии белка интереса, но и высокой степенью однородности клеточной популяции, что является немаловажным аспектом в эксперименте.

Используя описанную методику, ранее нами было получено несколько клеточных линий, в частности клетки СНО, экспрессирующие серотониновый рецептор 5HT_{2C}, которые использовались

в качестве биосенсора для детекции серотонина, секретирующего вкусовыми клетками. 5HT_{2C}R сопряжен с фосфолипазной системой, и клетки СНО/5HT_{2C} реагировали на серотонин повышением внутриклеточного Ca²⁺, что визуализировалось с помощью флуоресцентных Ca²⁺-зондов и микрофотометрии. Оказалось, что этот биосенсор реагирует на появление нейромедиатора по принципу «все или ничего», что не удовлетворяло нашим требованиям. Мы предположили, что активация серотонинового рецептора, сопряженного с аденилатциклазным сигнальным каскадом (например, 5HT₄), будет приводить к клеточным ответам с более выраженной дозозависимостью. Online визуализация аденилатциклазного каскада в физиологическом эксперименте стала возможна с появлением генетически кодируемых сенсоров, в частности белка rFlamindo, флуоресценция которого зависит от концентрации cAMP в клетке. Мы получили клетки НЕК293/rFlamindo+5HT₄, обладающие высокой степенью селективности и выраженным наклоном кривой доза-ответ в диапазоне 2–20 нМ, что позволило нам более детально исследовать секрецию серотонина из вкусовых клеток в разных физиологических условиях и при различных вариантах стимуляции.

Работа выполнена в рамках РФФИ №20-04-01035.

¹ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия
Institute of Cell Biophysics RAS – Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research RAS”, Pushchino, Russia

А.А. Рябинин¹,
Е.П. Калабушева¹,
Е.А. Воротеляк¹

**МОРФОГЕНЕЗ КОЖИ В МОДЕЛИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛЕЦ ИЗ ИПСК ЧЕЛОВЕКА В КОЖНЫЕ
ОРГАНОИДЫ**

A.A. Ryabinin¹,
E.P. Kalabusheva¹,
E.A. Vorotelyak¹

**SKIN MORPHOGENESIS IN THE MODEL OF EMBRYOID
HIPSCS-DERIVED BODIES INTO SKIN ORGANOIDS**

andrey951233@mail.ru

На текущий момент для современной регенеративной медицины и клеточной биологии важной задачей является разработка технологий получения *in vitro* и пересадки живых эквивалентов кожи (ЖЭК), которые можно применить для ускоренной регенерации повреждений кожи, а также в качестве модели для изучения морфогенеза кожи и для тестирования различных препаратов и физических воздействий в фармакологии. Современным подходом к получению ЖЭК является создание кожных органоидов из ИПСК человека, которые могут быть получены из любых аутологичных соматических клеток.

Целью нашей работы было получение кожных органоидов, содержащих в своей структуре волосяные фолликулы (ВФ), *in vitro* без использования сыворотки, инструментов генетической модификации и антибиотиков – в результате направленной дифференцировки эмбриональных телец из ИПСК – и изучение активности белка YAP в различных структурах кожных органоидов в ходе их морфогенеза. В процессе дифференцировки на разных временных точках (15 дней, 30 дней, 110 дней после начала дифференцировки)

органойды фиксировали и использовали для выявления маркеров различных субпопуляций клеток, характерных для конкретной стадии развития кожи, при помощи иммуногистохимических методов. После почти 4 месяцев развития органойдов были выявлены ВФ, клетки в составе которых экспрессировали маркер стержня волоса АЕ13, маркер волосяного влагалища К71, маркеры эпителиальных клеток Е-кадгерин. Также в составе структуры ВФ по экспрессии α ГМА были выявлены гладкомышечные клетки, участвующие в подъеме волоса. Помимо этого, на всех стадиях была выявлена активность белка YAP.

При выполнении работы удалось получить кожные органойды с ВФ, а также была изучена активность белка YAP в ходе спровоцированного морфогенеза. В дальнейшем планируется продолжить изучение морфогенеза кожи на данной модели. Также из кожных органойдов на финальной стадии их развития будут выделены и охарактеризованы отдельные типы клеток.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 21-74-30015.

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

Г.Н. Сингина¹, А.В. Лопухов¹,
Н.П. Тарадайник¹, Е.Н. Шедова¹,
Т.Е. Тарадайник¹, Н.А. Зиновьева¹

**ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
КЛОНИРОВАННОГО ПОТОМСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ДОМАШНЕЙ КОРОВЫ
(BOS TAURUS TAURUS)**

G.N. Singina¹, A.V. Lopukhov¹,
N.P. Taradajnic¹, E.N. Shedova¹,
T.E. Taradajnic¹, N.A. Zinovieva¹

**PRACTICAL ASPECTS OF THE SOMATIC CELL NUCLEAR
TRANSFER TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF A CLONED
OFFSPRING IN CATTLE (BOS TAURUS TAURUS)**

g_singina@mail.ru

Технология клонирования ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) имеет широкие перспективы применения для решения задач, направленных на тиражирование и сохранение уникальных генотипов в племенном животноводстве, а также создание новых генотипов методами геномного редактирования. Целью исследования являлось моделирование условий получения SCNT-эмбрионов крупного рогатого скота с использованием фетальных фибробластов в качестве доноров ядер и оценка их развития до жизнеспособного потомства.

Для SCNT выделенные *post mortem* ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК, n = 1332) созревали в среде ТС-199, дополненной 10 % FCS, 10 мкг/мл ФСГ и 10 мкг/мл ЛГ. Через 20–24 ч созревания ОКК обрабатывали 0,1% раствором гиалуронидазы, механически удаляли кумулюсные клетки и отбирали ооциты с первым полярным тельцем (ППТ, n = 1088). Фетальные фибробласты культивировали до сформированного монослоя, контактно

ингибировали в течение 2 суток и к процедуре переноса в энуклеированный ооцит готовили в виде суспензии. Для объединения ооцитов и перенесенных в их перивителлиновое пространство клеток применяли два последовательных импульса постоянного тока напряжением 35 В продолжительностью 20 мкс (однократно или в случае отсутствия признаков объединения клеток двукратно). Полученные цитогбриды ($n = 422$, 44,5 % от числа ооцитов с ППТ) активировали иономицином через 2 ч после слияния и культивировали до стадии бластоцисты. С целью оценки жизнеспособности полученных эмбрионов часть из них ($n = 81$) была пересажена синхронизированным по циклу реципиентам. Оставшиеся бластоцисты были использованы для цитологического анализа состояния ядерного материала ($n = 16$, среднее число ядер 78,3). В качестве реципиентов использовали телок случного возраста в спонтанном и синхронизированном цикле. Пересадку эмбрионов проводили нехирургическим методом глубоко в рог матки. Было установлено, что после активации 64,5 % (272/422) цитогбридов формируют 2-клеточные эмбрионы и 23,0 % (97/422) развивается до стадии бластоцисты. Доля стельных животных после трансплантации клонированных бластоцист 31 реципиенту составила 43,8 % (14/31), доля рожденного живого потомства – 3,3 % (1/31).

Таким образом в результате проведенной работы впервые в России получено жизнеспособное клонированное потомство крупного рогатого скота. Полногеномное SNP-генотипирование подтвердило полную идентичность генотипа клонированного теленка и линии фибробластов, используемых для SCNT.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (ГЗ № 0445-2021-0004).

¹ Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московская обл., Подольск, Россия
Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Podolsk, Moscow Region, Russia

doi:10.18720/SPBPU/2/id22-142

А.Г. Соболева¹, И.В. Арутюнян²,
П.А. Вишнякова^{2,3}, А.В. Ельчанинов^{1,2,3},
В.В. Польшкин^{3,4}, М.В. Ратушный⁵,
А.П. Поляков⁵, К.Б. Гордон^{3,4},
Т.Х. Фатхудинов^{1,2,3}

***IN VITRO* МОДЕЛЬ ОПУХОЛЕЙ ОБЛАСТИ ГОЛОВЫ И ШЕИ**

A.G. Soboleva¹, I.V. Arutyunyan²,
P.A. Vishnyakova^{2,3}, A.V. Elchaninov^{1,2,3},
V.V. Polkin^{3,4}, M.V. Ratushny⁵,
A.P. Polyakov⁵, K.B. Gordon^{3,4},
T.Kh. Fatkhudinov^{1,2,3}

***IN VITRO* MODEL OF HEAD AND NECK TUMORS**

annasobo@mail.ru

Опухоли области головы и шеи занимают 6 место в структуре онкологических заболеваний человека. Согласно докладу ВОЗ, к 2030 году ожидается до 1 млн диагностируемых случаев в год. В 90 % случаев опухоли головы и шеи представлены плоскоклеточным раком, для которого характерен быстрый инвазивный рост, активное метастазирование и возможность рецидивов. В настоящее время активно развивается лучевая терапия, применение которой осложняется неопределенностью радиобиологических процессов, происходящих в опухолевых клетках и их микроокружении, а также отсутствием релевантных экспериментальных моделей опухолевого роста. Трехмерная клеточная модель наиболее полно отражает условия роста опухоли *in vivo* и может стать эффективным инструментом для выбора эффективной тактики лечения в рамках концепции персонализированной медицины. Органоиды воспроизводят фенотип первичной опухоли, что позволяет связать ответ на терапию в условиях *in vitro* с характеристиками исходных клеток.

Целью настоящего исследования было разработать релевантную трехмерную клеточную модель из образцов опухолей органов головы и шеи человека.

В ходе работы разработан протокол получения органоидов из опухолевой ткани органов головы и шеи. В полученных органоидах показана экспрессия характерных для данного типа опухоли маркеров CD44 и СК17. Экспериментальные данные подтвердили соответствие основных свойств (морфологическое строение, клеточный состав) исследованных органоидов и исходной опухолевой ткани, что говорит о релевантности полученной модели. Валидность полученных тумороидов была подтверждена при построении кривой зависимости «доза-эффект» под воздействием протонного облучения.

Разработанная методика может быть использована для подбора эффективной дозы терапевтического облучения и тестирования новых препаратов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения от 7 октября 2021 г. № 075-15-2021-1356 (внутренний номер Соглашения — 15.СИН.21.0011; идентификатор RF0951.61321X0012).

¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия
Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky NRCS”, Moscow, Russia

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. Акад. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

FSBI “Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology” of Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

³ Медицинский университет РУДН, Москва, Россия

Medical Institute of Peoples’ Friendship University of Russia, Moscow, Russia

⁴ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the National Medical Research Radiological Centre of Russian Ministry of Health, Obninsk, Russia

⁵ Московский научный исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

Hertsen Moscow Oncology Research Institute — Branch of the National Medical Research Radiological Centre of Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

Е.К. Тарасова¹,
А.Г. Масютин^{1,2},
Д.А. Самсонов²,
М.В. Ерохина^{1,2}

БИОДЕГРАДАЦИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ МАКРОФАГАМИ THP-1 И RAW264.7

E.K. Tarasova¹,
A.G. Masyutin^{1,2},
D.A. Samsonov²,
M.V. Erokhina^{1,2}

CARBON NANOPARTICLES BIODEGRADATION BY THP-1 AND RAW264.7 MACROPHAGES

shalioto6@gmail.com

Широкое использование нанотехнологий и применение углеродных наночастиц, в частности многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ, многочисленные листы графена, свёрнутые в цилиндр и вложенные друг в друга), ставит вопрос о способности макрофагов млекопитающих их разрушать. Одним из изученных путей элиминации макрофагами МУНТ является разрушение их в фаголизосомах. Контакт макрофагов с наноматериалом запускает продукцию внеклеточных АФК, но внеклеточная деградация МУНТ, в отличие от внутриклеточной, не изучена. Цель данной работы – анализ и сравнение вне- и внутриклеточной биодegradации МУНТ макрофагами человека THP-1 и мыши RAW264.7 в модели *in vitro*.

В процессе макрофагальной дифференцировки клетки активировали по провоспалительному типу и инкубировали с МУНТ («Таунит» и «Dealtom») в течение 10 суток. Для выявления локализации МУНТ анализировали ультратонкие срезы. Для анализа разрушения МУНТ использовали нанотрубки, выделенные из внеклеточной среды и клеточного лизата. Критерии деградации

МУНТ: изменения морфологии, внутреннего и внешнего диаметров, элементного состава, структуры кристаллической решётки. Для их оценки применяли методы трансмиссионной электронной микроскопии, дифракции электронов, энергодисперсионной рентгеновской и рамановской спектроскопии, морфометрический и статистический анализ.

Внутри макрофагов МУНТ выявляются в фагосомах: в них нанотрубки распадаются до «графеновых хлопьев». В клеточном лизате нанотрубки теряют нативную морфологию — пропадает внутренний канал, стенки приобретают неравномерную электронную плотность. Внеклеточные МУНТ характеризуются расширением внутреннего канала за счёт истончения стенок нанотрубок. При всех вариантах деградации изменённые МУНТ сохраняют кристаллическую структуру и характеризуются увеличением уровня дефектов.

Оба варианта экспериментальных клеточных линий провоспалительных макрофагов вызывают схожие изменения в структуре МУНТ. Полученные данные демонстрируют способность макрофагов человека и мыши осуществлять вне- и внутриклеточную деградацию МУНТ. Это свидетельствует об универсальных свойствах макрофагов как профессиональных фагоцитов, позволяющих им утилизировать искусственный углеродный наноматериал.

¹ Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза, Москва, Россия

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

doi:10.18720/SPBPU/2/id22-144

С.В. Тимофеева¹, С.Ю. Филиппова¹,
А.О. Ситковская¹, Н.В. Гненная¹,
И.В. Межевова¹, Т.В. Шамова¹,
И.А. Новикова¹, О.И. Кит¹

**БИОРЕСУРСНАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПЕРВИЧНЫХ
ОПУХОЛЕЙ И КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ФГБУ НМИЦ
ОНКОЛОГИИ МИНЗДРАВА РОССИИ**

S.V. Timofeeva¹, S.Yu. Filippova¹,
A.O. Sitkovskaya¹, N.V. Gnennaya¹,
I.V. Mezhevova¹, T.V. Shamova¹,
I.A. Novikova¹, O.I. Kit¹

**BIORESOURCE COLLECTION OF PRIMARY TUMORS
AND CELL LINES OF THE NATIONAL MEDICAL RESEARCH
CENTRE FOR ONCOLOGY**

timofeeva.sophia@gmail.com

На сегодняшний день биобанк ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России представляет собой многоступенчатую инфраструктуру с коллекциями биологических образцов различных онкологических нозологий, дополненных аннотированными клиническими и патологическими данными о пациентах, включая молекулярно-генетический анализ, патологическую гистологию, и медицинские изображения [1].

В биобанке ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ содержатся коллекции первичных и иммортализованных клеточных линий человеческого происхождения. Коллекция первичных клеточных линий сформирована из образцов послеоперационного материала, отобранного в ходе удаления опухолей различной локализации (рак молочной железы, рак простаты, рак легкого). Все клеточные линии проходили внутренний контроль качества на отсутствие контаминантов (экзогенных вирусов, микоплазм

и L-форм бактерий), жизнеспособность и культивировались без антибиотиков.

На базе собранных образцов были выполнены следующие научные проекты: 3D-принтинг моделей опухолевого роста; исследование противоопухолевых свойств новых растительных метаболитов – цитостатической активности, способности подавлять клеточную подвижность и снижать уровень продукции АТФ на клетках первичных культур рака лёгкого, предстательной железы, глиомы; исследование цитотоксической активности онколитических вирусов на клетки опухоли и нормальной ткани; исследование энергетического метаболизма клеток опухоли различной этиологии.

Литература:

1. **Кит О.И., Тимофеева С.В., Ситковская А.О.** и др. Биобанк ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России как ресурс для проведения исследований в области персонифицированной медицины. Современная онкология. 2022;24(1) : 6–11.

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия
National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Ю. Транова¹,
М.И. Поветко¹

**КЛЕТКИ CACO-2 КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
АКТИВНОСТИ БЕЛКА УСТОЙЧИВОСТИ К РАКУ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Yu. Tranova¹,
M.I. Povetko¹

**CACO2 CELLS AS A MODEL FOR STUDYING THE ACTIVITY
OF BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN**

yulyatran@gmail.com

Caco-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека, имеющие функциональное и морфологическое сходство с энтероцитами человека и экспрессирующие белки-транспортеры, в том числе белок устойчивости к раку молочной железы (BCRP) [1]. BCRP участвует в фармакокинетике большого количества лекарственных веществ [2]. Изучение его активности позволит оценить его роль в нежелательных межлекарственных взаимодействиях.

Цель работы: разработка методики для изучения активности BCRP на клетках линии Caco-2.

Материалы и методы. С помощью гетерогенного иммуноферментного анализа (ИФА) оценивали количество BCRP методом абсолютной калибровки. Далее использовали трансвелл-системы, на которые высевали клетки Caco-2. В качестве субстратов BCRP использовали метотрексат, кверцетин и митоксантрон [2]. Изначально оценивали транспорт субстратов с концентрациями 1, 5, 10 и 50 мкМ, далее их транспорт при добавлении ингибитора резерпина (50 мкМ). Концентрацию субстратов определяли методом ВЭЖХ-МС/МС. По полученным данным рассчитывали коэффициенты кажущейся проницаемости из базолатеральной камеры трансвелл-системы в апикальную (Papp b-a)

и наоборот (Рарр а-в) и отношение этих коэффициентов (Рарр в-а/Рарр а-в). Рарр в-а/Рарр а-в более «2» характеризует участие белка в транспорте веществ, которое должно снижаться при добавлении ингибитора [3].

Результаты: Количество ВСРР, определенное методом гетерогенного ИФА, составило $4,39 \pm 0,12$ нг/мг белка. При использовании всех субстратов с концентрацией 1 мкМ и кверцетина 5–10 мкМ их содержание было ниже НПКО. При концентрации кверцетина 50 мкМ, метотрексата 10 мкМ и 50 мкМ Рарр в-а/Рарр а-в были ниже 2. Рарр в-а/Рарр а-в для метотрексата 5 мкМ составило $3,38 \pm 0,08$. Рарр в-а/Рарр а-в для митоксантрона 5 мкМ, 10 мкМ и 50 мкМ составило $2,72 \pm 0,16$, $6,18 \pm 0,08$ и $2,22 \pm 0,29$, соответственно. Резерпин снижал Рарр в-а/Рарр а-в метотрексата 5 мкМ до $1,02 \pm 0,29$ ($p = 0,0002$), митоксантрона 10 мкМ – до $1,84 \pm 0,052$ ($p < 0,0001$).

Заключение. Клеточная линия Сасо-2, гиперэкспрессирующая ВСРР, может служить моделью для изучения активности белка-транспортера. Оптимальный субстратом для изучения активности ВСРР на клетках Сасо-2 является митоксантрон (10 мкМ), а в качестве ингибитора резерпин (50 мкМ).

Литература:

1. Hilgers A.R., Conradi R.A., Burton P.S. Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa. *Pharm. Res.* 1990;7(9): 902–10.
2. Mao Q., Unadkat J.D. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport—an update. *AAPS J.* 2015;17(1):65–82.
3. Якушева Е.Н., Шулькин А.В., Черных И.В. и др. Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р *in vitro*. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2019;17(1):71–8.

¹ Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Россия
Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Е.П. Турищева¹,
Г.А. Ашниев¹,
Е.А. Смирнова¹

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНДУКТОРА СТРЕССА ЭПР ДТТ
НА МОРФОЛОГИЮ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК
СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Е.Р. Turishcheva¹,
G.A. Ashniev¹,
E.A. Smirnova¹

**EFFECT OF ER STRESS INDUCER DTT ON MORPHOLOGY
OF CONNECTIVE TISSUE CULTURED CELLS**

kitten-caterina@yandex.ru

Неправильный процессинг белков при нарушении гомеостаза эндоплазматического ретикулума (ЭПР) приводит к состоянию, которое называется стресс ЭПР. В настоящее время накоплено много данных, касающихся молекулярных механизмов последствий стресса ЭПР, однако намного меньше известно о влиянии стресса ЭПР на структурно-функциональную организацию клеток. Поэтому целью нашей работы было исследовать влияние ДТТ (дитиотреитола), как наиболее распространённого экспериментального индуктора стресса ЭПР, на морфологию и поведение человеческих культивируемых нормальных и опухолевых клеток соединительнотканного происхождения – дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы НТ-1080. С помощью сканирующей электронной микроскопии и цитохимического выявления актина было показано, что ДТТ вызывает изменение формы и микрорельефа поверхности, а также уменьшение площади расплывания дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы НТ-1080. Клетки обеих линий становятся более выпуклыми и «поджатыми», на дорзальной поверхности фибробластов появляются бугристые

и складчатые образования, а на поверхности клеток фибросаркомы отмечается появление многочисленных микроворсинок, филоподий и блеббообразных структур. Кроме того, ДТТ вызывает дезорганизацию пучков актиновых филаментов у дермальных фибробластов, но не влияет на организацию актина в клетках фибросаркомы. Поскольку некоторые пучки актиновых филаментов у фибробластов являются стресс-фибриллами, с помощью иммуоцитохимического выявления винкулина было проанализировано распределение фокальных контактов и обнаружено, что ДТТ вызывает уменьшение числа фокальных контактов. Так как изменение формы и поверхности клеток может быть связано с изменением клеточной подвижности, с помощью прижизненных наблюдений мы проанализировали движение фибробластов и клеток фибросаркомы в присутствии ДТТ. Было обнаружено замедление движения дермальных фибробластов, тогда как клетки фибросаркомы практически не изменяли скорость продвижения по субстрату. Для обеих клеточных линий отмечалось укорочение проходимого пути, а наиболее выраженные изменения наблюдались в дермальных фибробластах. Таким образом, изменения миграторной активности фибробластов носят более выраженный характер, чем у клеток фибросаркомы НТ-1080.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 19-015-00233 и 20-315-90118) в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300098-5.

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Е.В. Улас¹,
Е.С. Надеждина¹,
А.В. Бураков²

**ЭКСПРЕССИЯ МАЛОЙ ГТФАЗЫ ARL7 РЕГУЛИРУЕТСЯ
РАЗЛИЧНЫМИ СИГНАЛЬНЫМИ ПУТЯМИ В КЛЕТОЧНЫХ
ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА И ЗЕЛЕННОЙ МАРТЫШКИ**

E.V. Ulas¹,
E.S. Nadezhdina¹,
A.V. Burakov²

**SMALL GTPASE ARL7'S EXPRESSION IS REGULATED
BY DIFFERENT SIGNALING PATHWAYS IN HUMAN
AND GREEN MONKEY CELL LINES**

evgeniya.ulas@gmail.com

Архитектура сети микротрубочек (МТ) существенно варьирует в различных типах клеток млекопитающих и регулируется множеством факторов, часть из которых не до конца изучены. Малая ГТФаза Arl7, ассоциированная с альфа-тубулином, рассматривается как белок-кандидат на участие в организации системы МТ [1]. Ранее было показано, что совместная активация X-рецептора печени (LXR) и ретиноидного X-рецептора (RXR) приводит к усилению экспрессии Arl7 в культуре клеток HeLa (карцинома шейки матки человека) [2]. Мы воспроизвели данный эффект и проверили, влияет ли повышение уровня эндогенного белка Arl7 на строение сети МТ в HeLa. При инкубации HeLa с лигандами LXR и RXR концентрация белка Arl7 в клетках росла пропорционально времени воздействия. Кроме того, совместная обработка HeLa лигандами LXR/RXR также приводила к более выраженному повышению концентрации Arl7 по сравнению с обработкой лигандом LXR и лигандом RXR по отдельности. По предварительным данным, при разборке МТ нокодазолом и их дальнейшем

восстановлении в HeLa, подвергавшихся воздействию лигандов LXR/RXR, наблюдалось большее количество вновь образуемых в цитоплазме МТ по сравнению с контрольными клетками. Затем мы применили лиганды LXR/RXR к клеточной линии Vero (эпителий почки зеленой мартышки), обладающей существенно большей по сравнению с HeLa радиальностью сети микротрубочек. Мы выяснили, что активация LXR/RXR в Vero не приводит к повышению уровня Arl7. Различий в динамике восстановления МТ после их разборки в Vero, обработанных лигандами LXR/RXR, по сравнению с контрольными клетками также не было выявлено. Таким образом, активация LXR/RXR в клетках HeLa, имеющих умеренно радиальную систему МТ, запускает сигнальный каскад, приводящий к повышению экспрессии Arl7, в то время как в Vero, где система МТ строго радиальна, активация этого сигнального пути в регуляции экспрессии Arl7 не участвует.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 22-24-00578.

Литература:

1. **Wei S., Xie C., Abe Y.** et al. ADP-ribosylation factor like 7 (ARL7) interacts with alpha-tubulin and modulates intracellular vesicular transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 384: 352–356.
2. **Engel T., Lueken A., Bode G.** et al. ADP-ribosylation factor (ARF)-like 7 (ARL7) is induced by cholesterol loading and participates in apolipoprotein AI-dependent cholesterol export. *FEBS Lett.* 2004; 566: 241–246.

¹ Институт белка РАН, Пущино, Россия
Institute of Protein Research RAS, Pushchino, Russia

² Московский государственный университет им. Н.В. Ломоносова, Москва, Россия
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Ю.И. Хорольская¹, Д.А. Переплетчикова¹,
К.Э. Журенков¹, Э.И. Александер-Синклер¹,
Д.В. Качкин², И.С. Иванова¹,
Н.А. Михайлова¹, М.И. Блинова¹

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЧЕННЫХ
ЗЕЛЕНЫМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ БЕЛКОМ
ЛИМБАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ ПОТЕНЦИАЛ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ
ОФТАЛЬМОЛОГИИ**

J.I. Khorolskaya¹, D.A. Perepletchikova¹,
K.E. Zhurenkov¹, E.I. Alexander-Sinkler¹,
D.V. Kachkin², J.S. Ivanova¹,
N.A. Mikhailova¹, M.I. Blinova¹

**DERIVATION AND CHARACTERIZATION OF LIMBAL STEM
CELLS LABELED WITH GREEN FLUORESCENT PROTEIN
AND THEIR POTENTIAL FOR RESEARCH IN REGENERATIVE
OPHTHALMOLOGY**

khorolskaya@incras.ru

Разработка клеточных продуктов для восстановления поврежденной ткани роговицы глаза является актуальной задачей для современной офтальмологии. Перспективным источником клеточного материала для восстановления роговицы являются стволовые клетки лимба. Лимб — это узкая зона фиброзной оболочки глаза на границе роговицы и склеры. В стромальной зоне лимба находятся лимбальные стволовые клетки мезенхимного происхождения (Л-МСК), физиологическая функция и регенеративный потенциал которых требуют детального изучения.

В данном исследовании из биоптатов лимбальной ткани кролика получены Л-МСК, которые затем были трансдуцированы лентивирусным вектором, несущим последовательность зеленого

флуоресцентного белка EGFP. Клетки линии Л-МСК-EGFP обладали высоким пролиферативным потенциалом в условиях *in vitro*, а также экспрессировали на поверхности маркеры мезенхимальных клеток CD44, CD90, CD 105 и не экспрессировали маркеры гематопоэтических клеток CD34 и CD45. Было показано, что клетки линии Л-МСК-EGFP способны к дифференцировке в специализированные клетки мезенхимного ряда. Было продемонстрировано, что в клетках линии Л-МСК-EGFP кролика присутствуют маркеры стволовых клеток ABCG2, ABCB5, PAX6 и p63a, а также некоторые цитokerатины (3/12, 15, 19), которые характерны для эпителиальных клеток роговицы. В процессе индукции эпителиальной дифференцировки в течение 14 суток клетки линии Л-МСК-EGFP приобретали особенности, характерные для клеток эпителиального типа.

Полученная клеточная линия Л-МСК-EGFP обладает высокой клеточной пластичностью и может быть полезна для решения фундаментальных проблем клеточной биологии и регенеративной биомедицины, таких как оценка клеточной пластичности и дифференцировки, пролиферации и миграции трансплантируемых клеток в ткани реципиента.

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

И.В. Чистякова¹,
Н.И. Бакаленко¹,
А.Б. Малашичева¹

**РЕЗИДЕНТНЫЕ ЛЁГОЧНЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ:
МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ
И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

I.V. Chisyakova¹,
N.I. Bakalenko¹,
A.B. Malashicheva¹

**RESIDENT LUNG FIBROBLASTS: METHOD OF OBTAINING,
CHARACTERISTICS OF CELL CULTURE AND PERSPECTIVES
OF ITS USAGE**

itjerena7@gmail.com

Резидентные интерстициальные лёгочные фибробласты способствуют формированию каркаса для эпителиальных клеток и паракринной регуляции окружающего эндотелия, инициируя клеточную пролиферацию и дифференцировку в пре- и постнатальные периоды развития. В норме при действии повреждающих факторов лёгочные фибробласты способствуют процессам регенерации, что обуславливает их использование в восстановительной терапии, однако при патологической активации фибробласты способны дифференцироваться в миофибробласты, приводя к развитию фиброза. Таким образом, изучение свойств популяции резидентных лёгочных фибробластов имеет решающее значение в применении данной культуры в регенеративной клеточной медицине.

Цель настоящего исследования – разработать методику получения и оценки эксплантной культуры резидентных лёгочных фибробластов, выделенной в результате торакотомии.

Культуру резидентных фибробластов получали из эксплантатов, выделенных при частичной резекции лёгочной ткани.

Культивирование клеток осуществляли на среде Basal Human Lung Fibroblast medium с добавлением коктейля ростовых факторов, 2 mM L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина. Характеристику полученной культуры проводили с помощью визуальной оценки, иммуноцитохимического окрашивания и ПЦР в реальном времени на основные маркеры альвеолярных эпителиальных клеток (АЭК) 1 типа (LAMP3, SP-C), 2 типа (PDPN, HOP), базальных клеток (E-cadherin, TP63, SOX9), а также маркера миофибробластных клеток (α -SMA).

Согласно результатам визуального, иммунофенотипического и ПЦР анализа, полученная клеточная популяция характеризовалась фибробластоподобной морфологией и экспрессией маркеров АЭК 1 типа (LAMP3) и 2 типа (PDPN, HOP), а также маркера прогениторных клеток (SOX9), свидетельствующих о гетерогенности происхождения интерстициальных лёгочных фибробластов. Экспрессия α -SMA в эксплантной культуре не обнаруживалась, что позволяет предположить, что клеточная популяция не относится к клеткам, обладающим миофибробластным фенотипом.

Таким образом, нами была получена эксплантная фибробластоподобная культура лёгких, характеризующаяся эпителиальным фенотипом.

Работа выполнена при поддержке Соглашения № 075-15-2021-1075.

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of cytology RAS, St. Petersburg, Russia

А.С. Шахов¹,
П.А. Ковалева¹,
И.Б. Алиева¹

**ЛИНИЯ КЛЕТОК EA.HY926 КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР
В ЭНДОТЕЛИОЦИТЕ**

A.S. Shakhov¹,
P.A. Kovaleva¹,
I.B. Alieva¹

**EA.HY926 CELL LINE AS A MODEL SYSTEM
FOR INVESTIGATION OF CYTOSKELETAL STRUCTURES
IN ENDOTHELIOCYTES**

antshakhov@gmail.com

Эндотелий представляет собой слой уплощенных клеток, выстилающий внутреннюю поверхность сосудов. Эндотелиальный монослой служит полупроницаемым барьером, обеспечивая селективный обмен между кровью и подлежащей соединительной тканью. Монослой эндотелиальных клеток *in vitro* сохраняет все физиологические свойства, характерные для нативного эндотелия. Широко используемые культуры нормального эндотелия HUVEC и HRAEC (клетки, полученные из биоптата эндотелия вен пуповины и легочной артерии человека, соответственно) сохраняют эндотелиальную функцию *in vitro* 10–12 пассажей, реактивы для их культивирования имеют высокую стоимость. Мы использовали клетки гибридной культуры EA.hy926 (гибрид первичных эндотелиальных клеток пуповины с клоном карциномы A549). Клетки EA.hy926, согласно каталогу ATCC, способны претерпевать 100 клеточных делений и сохраняют все свойства, характерные для дифференцированного эндотелия. Для обеспечения основной

(барьерной) функции эндотелия особое значение имеют взаимодействия цитоскелетных и адгезивных структур клетки. Известно, что при нарушении эндотелиального барьера в первую очередь наблюдается деполимеризация микротрубочек, а затем изменения актиновой сети клетки. Актиновые структуры являются важнейшим компонентом, обеспечивающим поддержание формы и сокращение эндотелиальной клетки. β - и γ -цитоплазматические изоформы актина локализируются в разных структурах эндотелиоцита. Исследование взаимного расположения немышечных изоформ актина методом двойного иммунофлуоресцентного мечения и микроскопии сверхвысокого разрешения демонстрирует сходство НРАЕС и EA.hy926, что подтверждает корреляционный анализ. Обнаруживаемые различия в степени колокализации β - и γ -цитоплазматических изоформ актина обусловлено различным функциональным состоянием отдельных участков ламеллы клетки и взаимодействием с белками-регуляторами и линкерами, обеспечивающими связь с микротрубочками и промежуточными филаментами. Обе линии однотипно реагируют на воздействия, вызывающие барьерную дисфункцию эндотелия. Таким образом, EA.hy926 являются длительно культивируемой адекватной моделью для изучения барьерных свойств эндотелия *in vitro*, относительно дешевой в использовании.

Поддержано грантом РФФИ (№ 22-25-00663) и программой развития МГУ (PNR 5.13).

¹ НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology MSU, Moscow, Russia

М.А. Тихомирова^{1,2}, А.А. Валяева^{1,3},
А.А. Жарикова^{1,4}, А.Н. Богомазова⁵,
Я.Р. Мусинова^{1,2}, А.А. Миронов⁴,
Е.С. Васецкий^{2,6}, Е.В. Шеваль^{1,3}

**ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ТАТ БЕЛКА ВИРУСА
ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ**

М.А. Tikhomirova^{1,2}, А.А. Valyaeva^{1,3},
А.А. Zharikova^{1,4}, А.Н. Bogomazova⁵,
Y.R. Musinova^{1,2}, А.А. Mironov⁴,
Y.S. Vassetzky^{2,6}, E.V. Sheval^{1,3}

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF THE TAT PROTEIN
OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS USING
CELL MODELS**

sheval_e@belozersky.msu.ru

У пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), даже на фоне проводимой антиретровирусной терапии, наблюдается повышенная частота развития В-клеточных лимфом. Потенциально это может быть связано с действием вирусного Tat белка, который секретируется из ВИЧ-инфицированных клеток и способен проникать в неинфицированные клетки. Точный механизм Tat-индуцированного В-клеточного лимфомагенеза не идентифицирован. Мы экспрессировали Tat белок в клетках RPMI 8866 и провели полногеномный анализ экспрессии генов (RNA-seq). Стабильная экспрессия Tat белка приводила к существенным модификациям транскриптома хозяина, включая выраженные изменения генов противовирусного ответа и сигнальных путей, регулирующих клеточный цикл. При длительном культивировании клетки, экспрессирующие Tat, были вытеснены не экспрессирующими Tat белок клетками. Мы также обнаружили повышенную

частоту хромосомных aberrаций в клетках, экспрессирующих Tat белок. Таким образом, Tat может модифицировать экспрессию генов в культивируемых В-клетках, что приводит к модификациям клеточного роста и нестабильности хромосом.

Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда (проект 21-74-20134).

¹ НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, Москва, Россия
Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

³ Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия
Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine FMBA, Moscow, Russia

⁶ Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Вильжуиф, Франция
Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

В.О. Чагин¹, С.Н. Литвинчук¹

ПЕРВИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК АМФИБИЙ

V.O. Chagin¹, S.N. Litvinchuk¹

PRIMARY CULTURES OF AMPHIBIAN CELLS

dr.chagin@mail.ru

Амфибии предоставляют уникальную возможность исследования связи размера генома с метаболизмом организма и клетки. Существенные, на порядки, отличия размеров геномов бесхвостых и хвостатых амфибий позволяют исследовать связь структурной и функциональной организации ядерной ДНК с общим её содержанием в клетке, а также соотношением кодирующих и не кодирующих последовательностей и прочими аспектами видоспецифической организации генома.

Удобным и адекватным объектом для молекулярно-биологических исследований являются первичные культуры клеток. Однако до настоящего времени известно довольно ограниченное количество случаев получения и постановки экспериментов на культурах клеток амфибий. Соответственно, существует потребность в разработке подходов к получению первичных культур клеток амфибий с различными размерами генома, ведении культуры и её криоконсервации.

В данной работе рассматриваются подходы к получению и экспериментальному использованию культур клеток амфибий. Решаются вопросы: выбор оптимально способа для получения адгезивных культур на основе образцов тканей животного, в том числе прижизненным способом, их первичной деконтаминации. Показаны предварительные результаты экспериментов по одиночному или двойному репликативному мечению *ex vivo* и в культуре после её поддержания в течение нескольких пассажей.

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

О.Н. Шевелева¹, Т.А. Ненашева¹,
Н.Н. Буторина¹, С.П. Медведев²,
Е.В. Григорьева², Е.А. Протасова¹,
И.В. Лядова¹

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИПСК С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ TNFAIP3

O.N. Sheveleva¹, T.A. Nenasheva¹,
N.N. Butorina¹, S.P. Medvedev²,
E.V. Grigoreva², E.A. Protasova¹,
I.V. Lyadova¹

GENERATION OF GENETICALLY MODIFIED IPSCS WITH INCREASED EXPRESSION OF TNFAIP3

on_sheveleva@mail.ru

Белок A20, кодирующийся геном *TNFAIP3*, играет важную роль в контроле воспалительных и иммунных реакций в организме. Нарушения в его экспрессии приводят к развитию аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний. Основные сведения о роли этого белка в организме получены в ходе наблюдения за пациентами с недостаточностью A20, исследований на нокаутных животных и клеточных популяциях с дефицитом экспрессии *TNFAIP3*. Получение клеточной линии с оверэкспрессией A20 является важной научной задачей, решение которой приведет к лучшему пониманию функционирования этого белка и его роли в развитии различных патологий.

Целью работы было получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК) с индуцибельной экспрессией *TNFAIP3*. иПСК, полученные ранее в ИЦиГ СО РАН из моноцитов периферической крови, были подвергнуты электропорации с использованием плазмид pAAVS1-CMV-TRE-hTNFAIP3, содержащей ген *TNFAIP3*

под доксициклин-управляемым промотором, AAVS1-Neo-M2rtTA, содержащей ген трансактиватора *M2rtTA*, и pX458-AAVS1, содержащей ген *Cas9*. В результате последующей селекции и проверки трансфецированных клонов на наличие целевых и нецелевых встроек, были получены 4 клон и ПСК (мод-и ПСК), из которых 2 имели нормальный кариотип. Клетки K7.A20-1.13 демонстрировали типичную морфологию и ПСК, экспрессировали маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2) и спонтанно дифференцировались с образованием производных трех зародышевых листков, что показано иммуноцитохимическим окрашиванием на коллаген I типа, β -III-тубулин и цитокератин 18.

Индуцибельность экспрессии *TNFAIP3* подтверждена с помощью ПЦР-анализа на *TNFAIP3*. Экспрессия *TNFAIP3* в мод-ИПСК в присутствии доксициклина превышала экспрессию без добавления доксициклина в 33-88 раз. Полученные и ПСК могут применяться для изучения влияния оверэкспрессии A20 на функционирование различных клеток и регуляцию воспалительного ответа. Понимание механизма действия A20 может стать основой для разработки новых противовоспалительных терапевтических средств.

Работа осуществлялась при поддержке Минобрнауки РФ, проект № 075-15-2020-773.

¹ Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

А.И. Шевченко¹,
А.М. Арссан¹,
С.М. Закиян¹,
И.С. Захарова¹

**ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА
X-ХРОМОСОМ В КУЛЬТУРАХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА: ПРОБЛЕМЫ
И ПОДХОДЫ К РЕШЕНИЮ**

A.I. Shevchenko¹,
A.M. Arssan¹,
S.M. Zakian¹,
I.S. Zakharova¹

**HETEROGENEITY OF THE EPIGENETIC STATUS
OF X CHROMOSOMES IN CULTURES OF HUMAN
PLURIPOTENT STEM CELLS: PROBLEMS
AND APPROACHES TO THE SOLUTION**

epigene@bionet.nsc.ru

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека являются перспективной модельной системой для исследования молекулярно-генетических основ заболеваний, тестирования лекарственных препаратов и разработки методов регенеративной медицины. Одной из серьезных проблем, возникающих при культивировании ПСК, является гетерогенность эпигенетического статуса X-хромосом. Нормальные ПСК человека (46, XX) имеют одну активную и одну неактивную X-хромосомы. Однако при длительном культивировании ПСК неактивная X-хромосома теряет свое инактивированное состояние и подвергается эрозии, включающей частичную реактивацию X-сцепленных генов, а также утрату репрессивных эпигенетических модификаций и транскрипции РНК *XIST*. Такое эродированное состояние X-хро-

мосомы приводит к увеличению экспрессии ряда онкогенов и к дисбалансу дозы X-сцепленных генов, контролирующих метаболизм, эпигенетическую регуляцию и дифференцировку. Состояние эрозии процесса инактивации является очень стабильным и передается в дифференцированные производные. Возникающая гетерогенность эпигенетического статуса X-хромосом в культурах является основным препятствием для использования ПСК и их дифференцированных производных в биомедицинских исследованиях и клинических приложениях.

Для решения данной проблемы разрабатываются подходы для контроля эпигенетического статуса X-хромосом путем культивирования ПСК в средах, содержащих коктейли факторов для регуляции ряда сигнальных путей [1]. В результате нашего исследования разработан протокол, позволяющий в гетерогенной культуре эмбриональных стволовых клеток человека *регулировать* экспрессию факторов плюрипотентности, задействованных в контроле процесса инактивации, увеличить долю клеток, по своему эпигенетическому паттерну близких к бластомерам раннего эмбриона, воспроизводить процесс демпфирования транскрипции X-хромосом и переход к случайной инактивации X-хромосомы.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 21-15-00065.

Литература:

1. An C., Feng G., Zhang J. et al. Overcoming autocrine FGF signaling-induced heterogeneity in naive human ESCs enables modeling of random X chromosome inactivation. *Cell Stem Cell* 2020; 27(3): 482–97.e4.

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Е.Н. Шедова¹,
Г.Н. Сингина¹

**ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ
СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ТКАНЕВОГО МАТЕРИАЛА УХА ПОГИБШЕГО
ЖИВОТНОГО**

E.N. Shedova¹,
G.N. Singina¹

**EVALUATING OF THE POSSIBILITY TO OBTAINING
OF A SOMATIC CELL CULTURE FROM THE EAR TISSUE
OF A DECEASED ANIMAL**

shedvek@yandex.ru

Получение культуры соматических клеток (СК) в сочетании с методом соматического клонирования является эффективным и удобным способом сохранения редких и уникальных животных. В данном исследовании была предпринята попытка получить культуру СК от животного, погибшего за несколько часов до отбора у него исходного тканевого материала. Тканевой материал (уши) был получен в полевых условиях от гибрида овцы и снежного барана и доставлен в лабораторию в естественном виде. Поступивший в лабораторию материал (часть уха) освобождали лезвием от волосяного покрова и тщательно промыли под проточной водой после чего обработали 70% этиловым спиртом. Для выделения СК использовались как кусочки уха с хрящом, так и кусочки кожи, которая была отделена от хряща с помощью лезвия. Оба вида ткани (каждый отдельно) сначала многократно промыли в физиологическом растворе с антибиотиками (пенициллин — 200 МЕ/мл, стрептомицин — 100 мкг/мл), а после в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), дополненном 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина Б.

После тщательной промывки кусочки исходной ткани максимально возможно измельчили с помощью лезвий, после чего однократно отмыли центрифугированием с использованием ФСБ (7 минут при 1700 об/мин) и подвергли обработке 0,25 % раствором трипсин/ЭДТА при 37 °С. Через 20 мин жидкую фракцию и измельченную ткань поместили отдельно в пробирки, добавили для нейтрализации трипсина среду DMEM, содержащую 5% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и гентамицин (50 мкг/мл), и центрифугировали, как описано выше. Полученный осадок с кусочками ткани или клеток высевали во флаконы с ростовой средой DMEM, дополненной 15 % ФБС, 1 % non-essential amino acid и гентамицином (50 мкг/мл), для культивирования. Раз в три дня проводили частичную замену ростовой среды. Контроль роста культуры проводился ежедневно. На второй день культивирования были найдены одиночные клетки и небольшие колонии в культуре, выделенной из жидкой фракции, собранной после трипсинизации кожи. Через пять дней культивирования во всех флаконах найдены единичные закрепившиеся на культуральном пластике кусочки ткани, образовавшие центры роста клеток двух типов. Через девять дней культивирования клетки были сняты 0,25 % раствором трипсин/ЭДТА и перенесены в новые культуральные планшеты без кусочков исходной ткани. После достижения монослоя клеточная культура была заморожена и перенесена на хранение в жидкий азот.

Таким образом, показана возможность и предложен эффективный способ получения культуры СК от погибшего животного – с использованием тканевого материала уха гибрида овцы и снежного барана.

¹ Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. ак. Л.К. Эрнста, Московская обл., Подольск, Россия
Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Podolsk, Moscow Region, Russia

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАК НЕОТЪЕМЛЕМЫЙ
ЭЛЕМЕНТ ПАСПОРТИЗАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ**

**CYTOGENETIC ANALYSIS AS THE INTEGRAL PART
OF CELL LINE CERTIFICATION**

yashkus@gmail.com

Клеточные линии разного видового и тканевого происхождения можно разделить на линии, сохраняющие нормальный диплоидный кариотип донора, и линии с перестроенным кариотипом, полученные из опухолевого материала или в результате трансформации клеток *in vitro*.

Депонирование в ЦКП Коллекция культур клеток позвоночных (ЦКП КККП) требует обязательной цитогенетической характеристики, которая включает описание структуры кариотипа клеток и определение или подтверждение их видовой принадлежности. Дифференциальное окрашивание хромосом на G-диски является основным методом анализа кариотипа клеток, позволяющим установить видоспецифичность и выявить широкий спектр хромосомных аномалий от анеуплоидии до сложных структурных перестроек. Алгоритм цитогенетического анализа клеточных линий был разработан С.Е. Мамаевой [1] на основе исследования большого числа постоянных клеточных линий человека и животных и успешно используется в настоящее время.

Паспорт коллекционной клеточной линии включает нормальное диплоидное число хромосом вида, пределы изменчивости по числу хромосом, модальное число хромосом, долю полиплоидных клеток в популяции и количество маркерных хромосом в кариотипе. Этот набор характеристик был сформирован в 80-е годы 20-го столетия и остается актуальным.

Анализ и описание цитогенетических характеристик клеточных линий в значительной степени определяются сложностью нару-

шений кариотипа. Клеточные линии, полученные из нормальных тканей, депонируются в ЦКП КККП только после подтверждения сохранения нормального кариотипа в процессе культивирования клеток. Описание их кариотипа не представляет проблем. Описание сложных перестроенных кариотипов клеточных линий опухолевого происхождения на основании окрашивания хромосом на G-диски не всегда позволяет однозначно интерпретировать результаты цитогенетического анализа. Наиболее полное представление о кариотипе таких линий дает кариограмма в сочетании с ее описанием.

Клеточные линии являются автономными динамичными системами с разным уровнем кариотипической гетерогенности. В клеточных популяциях *in vitro* могут сосуществовать клетки с разными структурными вариантами кариотипа [2]. Это в первую очередь относится к линиям опухолевого происхождения и линиям трансформированных клеток, однако в ряде случаев формирование подобной кариотипической структуры можно наблюдать и при культивировании нормальных диплоидных клеток. Так, из 15 клеточных линий мезенхимных стволовых клеток, полученных в ЦКП КККП и охарактеризованных нами, две – MSC-GING и MSCWJ-2 – имели в составе популяции два структурных варианта кариотипа уже на ранних пассажах, а в двух других – ADP-MSC и MSC-PI-1 – два и более структурных вариантов кариотипа обнаружены только на поздних пассажах культивирования. По-видимому, особенности кариотипической структуры также должны найти отражение в описании цитогенетических характеристик в паспорте.

В целом, представленные в паспорте данные о кариотипе клеточных линий должны способствовать выбору адекватных моделей для решения различных исследовательских задач.

Литература:

1. **Мамаева С.Е.** Хромосомный анализ культивируемых клеток. Сб. «Методы культивирования клеток» 1988; Ленинград, «Наука»: 78–98.
2. **Poljanskaya G.G., Vakhtin Y.B.** The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system. *Tsitologiya* 2003; 45(2): 115–31.

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ: СОВРЕМЕННЫЕ ВЫЗОВЫ И СЕТЕВЫЕ РЕШЕНИЯ

Сборник тезисов докладов
Всероссийской школы-конференции
22–23 июня 2022 г., г. Санкт-Петербург

Компьютерная верстка *О. Б. Романенко*
Дизайн обложки *О. А. Костюшенко*

Налоговая льгота – Общероссийский классификатор продукции
ОК 005-93, т. 2; 95 3004 – научная и производственная литература

Подписано в печать 31.08.2022. Формат 60×84/16. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 8,5. Тираж 50. Заказ 3508.

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре
Политехнического университета.
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29.
Тел.: (812) 552-77-17; 550-40-14.

