

Матеріали конференцій

Обзор материалов Международного симпозиума “Биология клетки в культуре” (17-19 октября 2006 г., г.Санкт-Петербург, Россия)

Семенова В.М.

Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев, Украина

17–19 октября 2006 г. в Институте цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург) состоялся очередной Всероссийский симпозиум “Биология клетки в культуре”, организованный правлением Российской ассоциации специалистов по клеточным культурам, Научным советом по клеточной биологии и иммунологии РАН, Институтом цитологии, Обществом клеточной биологии.

На симпозиуме обсужден широкий круг вопросов: дифференцировка и пролиферация клеток в культуре; молекулярные механизмы регуляции функций клеток; ростовые дифференцировочные и трансформирующие факторы; роль микроокружения и межклеточные взаимодействия, адгезивные свойства и белки внеклеточного матрикса, структура и функция цитоскелета клетки при различных воздействиях. Отдельное заседание было посвящено биологии стволовых клеток и их клиническому применению, широко обсуждались проблемы и перспективы заместительной клеточной терапии при различных заболеваниях.

В работе симпозиума приняли участие ученые из 30 научных учреждений Москвы, 15 научных учреждений Санкт-Петербурга и городов России: Архангельска, Владимира, Владивостока, Новосибирска, Иркутска, Пущино, Сочи, Уфы. Как и в предыдущие годы, к работе симпозиума проявили живой интерес исследователи, работающие с клеточными культурами в странах СНГ (Украине, Белоруссии, Прибалтике) и дальнего зарубежья (США, Франции, Швеции, Швейцарии, Финляндии, Чехии).

На 6 пленарных заседаниях симпозиума ведущие специалисты России представили 22 программных доклада, посвященных биологии культивированных клеток различного гистогенеза и их морфофункциональным характеристикам, тестированным с использованием современных методов молекулярной генетики, биофизики, иммуноцитохимии, видеомикроскопии, флуоресцентной микроскопии, электронной микроскопии. В материалах 139 стендовых сообщений отражены следующие проблемы:

рост и дифференцировка клеток в культуре, регуляция функций клеток, старение клеток и апоптоз, стволовые клетки, клеточная терапия, влияние физических и химических факторов на культивируемые клетки, методы анализа и сохранения клеточных линий и др.

Большое внимание уделено изменчивости ультраструктуры, цитоскелета, рецепторного аппарата и метаболизма культивируемых клеток, изменениям адгезивных свойств их мембран под влиянием различных цитотоксических и цитопротекторных воздействий, а также при использовании различных субстратов для культивирования.

Особое внимание уделено биологии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) млекопитающих и человека. ЭСК мыши впервые выделены в 1981 г. из внутренней клеточной массы предимплантационных бластоцист, в 1989 г. ЭСК получены от обезьяны, в 1998 г. — от человека. Они обладают неограниченным потенциалом деления без дифференцировки, содержат полный диплоидный набор хромосом и сохраняют плюрипотентность. К настоящему времени получены 17 постоянных линий плюрипотентных ЭСК человека, в США создан специализированный банк для линий этих клеток. В Новосибирском институте цитологии и генетики СО РАН также создана коллекция из 9 линий ЭСК человека (М.А. Лагарькова и соавт., Новосибирск).

ЭСК рассматривают как уникальную экспериментальную модель для изучения фундаментальных механизмов регуляции раннего развития млекопитающих, гистогенеза, процессов репрограммирования генома соматических клеток, канцерогенеза (О.Ф. Гордеева и соавт., Москва). Исследуются молекулярные и клеточные механизмы поддержания плюрипотентности ЭСК в течение длительного периода культивирования, а также изучаются условия получения монодифференцировки путем применения различных экзогенных факторов и/или методов генетической модификации.

Показано, что направление развития ЭСК можно регулировать путем изменения ионного состава среды, использования активаторов и блокаторов кальциевых каналов. ЭСК чувствительны к изменениям в среде культивирования ионного баланса свободного кальция, который рассматривают как потенциальный индуктор пролиферации и поддержания ЭСК *in vitro* в плюрипотентном состоянии (М.А. Осипенко и соавт., Пушино).

ЭСК используют также в качестве тест-системы для изучения эмбриотоксичности и тератогенности различных факторов. В связи с этим большое внимание уделено разработке и совершенствованию эффективных и безопасных технологий получения ЭСК, апробации различных условий их культивирования (на фидере и без него, на фибронектине человека, различных молекулярных комплексах внеклеточного матрикса). Испытываются также разновидности композиционного состава питательных культуральных смесей с использованием того или иного набора ростовых факторов. Важное значение имеют оптимальные способы криоконсервирования ЭСК.

Вместе с тем, по данным широкомасштабных исследований механизмов самообновления и дифференцировки плюрипотентных линий ЭСК, при их получении и дальнейшей экспансии в культуре *in vitro* изменяется программа их детерминации по сравнению с таковой плюрипотентных клеток эмбрионов *in vivo*. Неконтролируемые генетические и эпигенетические модификации генома культивируемых ЭСК обуславливают появление клеток с неизвестными свойствами и потенциалом на любой стадии нормальной дифференцировки с образованием тератом. Помимо этого, на экспрессию маркерных генов ЭСК оказывают влияние условия культивирования, вызывающие многовариантность дифференцировки. Поэтому необходим постоянный контроль генетической стабильности линий ЭСК в культуре (М.А. Прохорович и соавт., Новосибирск).

В связи с этим неоднократно подчеркивалась особая актуальность разработки стандартных протоколов мониторинга линий ЭСК, который должен включать их цитоструктурные и молекулярно-генетические характеристики с определением маркеров экспрессии ключевых генов, оценку способности ЭСК к формированию и самоподдержанию эмбрионидных телец. Рекомендовано также проводить мониторинг состояния генома ЭСК на этапах их пассирования с регистрацией состояния кариотипа и экспрессии маркерных генов, специфичных для плюрипотентных клеток, а для практического применения следует использовать только попу-

ляции ЭСК, прошедшие контролируемую дифференцировку (С.Л.Киселев и соавт., Москва).

Все шире используют культивируемые клетки из постнатальных органов и тканей человека для получения плюрипотентных стволовых клеток. Разработка биомедицинских клеточных технологий обуславливает необходимость тестирования культур ЭСК на наличие инфекционных агентов для обеспечения безопасности при работе с ними, что требует разработки соответствующей нормативной базы. В соответствии с законами РФ: “Об охране здоровья населения Российской Федерации”, “О трансплантации органов и тканей человека”, “О развитии клеточных технологий в Российской Федерации”, “Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям” составлен список инфекционных агентов, подлежащих обязательному тестированию на культурах фибробластов кожи и крови из пуповины человека после нормальных родов, а также в культурах клеток стромы костного мозга человека. В этих культурах необходимо проводить ПЦО-анализ для выявления провирусной ДНК и РНК ВИЧ-1, ВИЧ-2, РНК вируса гепатита С, ДНК вируса гепатита В, ДНК вирусов простого герпеса 1–2 типов, ДНК цитомегаловируса, ДНК вируса Эпштейна-Барр, ДНК микоплазмы и ДНК токсоплазмы (В.В. Бурунова и соавт., Москва).

На симпозиуме активно обсуждались также биологические особенности нейральных стволовых клеток (НСК) в культуре ткани, в частности, их дифференцировка в составе нейросфер, которые используют для анализа клеточных фенотипов и генетических маркеров, геной инженерии и трансплантации в ЦНС (М.А. Александрова и соавт., Москва). Показано, что клетки, выделенные из закладки неокортекса плода человека в возрасте 9,5 нед, в условиях культивирования в бессывороточной среде в присутствии факторов роста формируют нейросферы диаметром от 50 до 200 мкм, которые при цитофлуориметрическом анализе маркеров дифференцировки (виментина, бета-III-тубулина, ГРФБ, NeuN) обнаруживают гетерогенный клеточный состав, меняющийся в процессе культивирования. С увеличением размеров нейросфер наблюдают тенденцию к уменьшению количества пролиферирующих нестин-положительных нейроцитов и дифференцировку прогениторных клеток, причем нейрональная дифференцировка опережает глиальную. Установлено, что нейросферы являются гетерогенной клеточной микросистемой, в которой рекапитулируется программа дифференцировки, сходная с таковой в норме. При этом в таких условиях культивирования НСК

не способны к длительному самоподдержанию и мультипотентности, а дифференцированные клетки дегенерируют в сроки до 1 мес.

При оценке энергетического потенциала нейроклеток в составе культивируемых нейросфер, различающихся по величине, установлена гетерогенность их митохондриального потенциала (Е.Ю. Плотникова и соавт., Москва). Обнаружено, что истинные стволовые клетки обладают высоким потенциалом, а их количество уменьшается по мере роста нейросфер, что может быть следствием начала дифференцировки части нейроклеток в более зрелые нейроклетки.

З.Б. Квачева и соавторы (Минск) исследовали различные условия культивирования стволовых/прогениторных клеток (СПК), выделенных из биоптатов коры большого мозга оперированных пациентов в возрасте от 25 до 30 лет. Наилучшая генерация нейросфер и наращивание в них клеток отмечены при культивировании СПК в составе двух сред (DMEM + F/10) с добавлением ростовых факторов (FGF-b и hEGF) и гепарина. При фенотипировании нейроклеток в монослое с использованием флуоресцирующих антител обнаружена гетерогенность клеточного состава, включающего нестин-положительные (стволовые) клетки, MAP-2-положительные (предшественники нейронов), клетки с маркером 04 (незрелые олигодендроциты), а также ГФКБ-положительные клетки (астроциты). В работе Е.В. Мироновой и соавторов (С-Петербург) представлены результаты методической отработки получения первичной культуры нейронов из коры головного мозга эмбрионов крыс пренатального возраста. Важно подчеркнуть, что во всех исследованиях для комплексной визуализации внутриклеточных маркеров в нейроклетках широко использовали метод лазерной сканирующей конфокальной микроскопии клеток, маркированных флуоресцентными метками, ассоциированными со специфическими антителами, с последующей трехмерной реконструкцией изображения.

В ряде сообщений рассмотрены молекулярные механизмы генеза некоторых нейродегенеративных заболеваний ЦНС и методические подходы к их коррекции в эксперименте. Механизм возникновения хорей Геттингтона обусловлен мутацией элонгации триплетта, кодирующего глутамин в N-концевой части молекулы хантинтина, что способствует накоплению в нейронах мутантного белка и возникновению апоптоза. На модели линии клеток из нейробластомы SK-N-SH, содержащих ген белка теплового шока (BTШ70), установлено его протекторное действие, предотвращающее или замедляющее процесс формирования нерастворимых внут-

ринейрональных агрегатов (М.В. Ипполитова и соавт., С-Петербург).

Во многих докладах представлены результаты экспериментальных и клинических исследований по разработке оптимальных режимов практического использования клеток различного генеза для заместительной клеточной терапии при различных заболеваниях. С этой целью в предварительных экспериментах изучены пролиферация и специфическая дифференцировка кардиомиоцитов и сателлитных мышечных клеток крысы в культуре путем количественной оценки концентрации ионов внутриклеточного Ca^{2+} в ответ на воздействие ряда агонистов рецепторов наружной мембраны и саркоплазматического ретикулула: ацетилхолина, KCl, кофеина, мезатона, АТФ (Г.Б. Белостоцкая и соавт., С-Петербург; И.В. Захаров и соавт., С-Петербург). Исследованы пролиферация, жизнеспособность и фенотип культивируемых мезенхимальных предшественников при гипоксии (Л.В. Буравкина и соавт., Москва). Установлен полный восстановительный эффект ишемизированного миокарда после интрамиокардиальной аутотрансплантации животным (кролям) мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК) и ядродержащей фракции костного мозга (ЯСК) (Н.В. Цупкина и соавт., С-Петербург). Предполагают, что трансплантированные ММСК влияют в основном на процесс неогенеза за счет их дифференцировки в сосудистые структуры и выработки ангиогенных факторов, а ЯСК — за счет секреции ростовых факторов.

В отношении использования СК у взрослых лиц наиболее подробно разработаны методы клеточной терапии при повреждении кожи. Культивируемые базальные кератиноциты и дермальные фибробласты успешно применяют в клиниках и специализированных центрах России для восстановления дефектов кожи при ожогах (М.И. Блинова и соавт., С-Петербург, А.В. Васильев и соавт., Москва). Новым биотехнологическим методом восстановления кожи после термических ожогов является трансплантация эквивалента дермы из эпителия и фибробластов, выращенных в культуре на специальной подложке (М.И. Блинова и соавт., С-Петербург).

Установлена эффективность лечения субдермальных ожогов у 53 пострадавших путем раннего применения (в 1–2-е сутки после ожоговой травмы) биологической повязки на основе живых аллогенных фибробластов. Это способствовало полноценному безрубцовому восстановлению послышной эпителизации ожоговых ран на 5–7-е сутки, что подтверждено данными морфологических исследований (В.С. Бочарова и соавт., Москва). Показано, что клиническая

эффективность аллогенной трансплантации кератиноцитов, фибробластов и мезенхимальных клеток костного мозга сопоставима и способствует неспецифической стимуляции регенерации эпителия путем выделения в раневую среду пересаженными клетками факторов роста и молекул межклеточного матрикса. При этом состояние ожоговых ран и прогнозирование их течения контролируется активностью в раневом экссудате матриксных металлопротеиназ, участвующих в заживлении и эпителизации раневой поверхности (И.В. Воронкина и соавт., С-Петербург).

Большой интерес вызвал новый метод комбинированной трансплантации органных и клеточных культур эндокринных желез, разработанный в эксперименте для клеточной терапии различных видов эндокринопатии (И.С. Турчин и соавт., Киев). Реципиенту вводят “основной” и “вспомогательный” ксенотрансплантаты, при этом вспомогательный выполняет роль иммунодепрессанта. Установлено, что трансплантация животным, у которых смоделировали эндокринопатию, органный трансплантат одной железы, предварительно культивированного с эндокринными клетками другой железы, оказывает более выраженный лечебный эффект, чем трансплантация клеток только одной железы, что подтверждено данными морфологических и клинических исследований.

Модель культивируемых клеток использована также для поиска путей преодоления химиорезистентности клеток карциномы гортани человека путем комбинированного воздействия на культуры нескольких химиопрепаратов в сочетании с витаминными комплексами (М.Е. Соловьева и соавт., Пущино). Рассмотрены возможные механизмы этого феномена.

На культурах двух линий опухолей печени исследована степень активации транскрипционных факторов после инкубации клеток с бензпиреном (Н.А. Соломатина и соавт., Москва). Предполагают, что этот процесс реализуется через образование активного метаболита бензпирена или взаимодействие с Ah-рецептором.

Изучена также экспрессия белков, принимающих участие в апоптозе, в опухолевых клетках (гепатомы и саркомы мышей) и спленocyтaх при их совместном культивировании, что позволило выявить способы взаимодействия клеток опу-

холи и клеток иммунной системы (Л.Б. Гинкул, И.Н. Швембергер, С-Петербург).

Большой интерес вызвали сообщения о радиационно-индуцированном эффекте микропучкового облучения культивируемых клеток, тканевых эксплантатов, а также искусственных тканевых моделей кожи малыми и сверхмалыми дозами ионизирующей радиации (О.В. Беляков, Хельсинки, Финляндия). Впервые установлен феномен повреждения необлученных клеток вокруг облученных, обозначенный как немишенный радиационно-индуцированный коммунальный эффект и рассматриваемый как механизм тканевой защиты от последствий облучения. Изучено влияние 26S-протеасом ядра и цитоплазмы на индукцию коммунального эффекта в клетках эпидермоидной саркомы A431 после рентгеновского облучения (А.Г. Миттенберг и соавт., С-Петербург, Хельсинки, Финляндия).

Следует отметить высокий методический уровень представленных на симпозиум исследований. Их высокая результативность в большой мере обеспечивается широким сотрудничеством биологов и цитологов с учеными различных специальностей технического профиля, что существенно оптимизирует методическую базу и оснащенность экспериментов современной аппаратурой. Важно отметить также, что более половины исследований по биологии культивируемых клеток выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по программе Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

Работы Института нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова АМН Украины продемонстрированы в 2 презентациях: 1) пролиферативные и дифференцировочные свойства культивированных нейроклеток обонятельной луковицы человека в динамике длительного наблюдения (В.М. Семенова и соавт.); 2) исследование моделирующего действия аллогенных эмбриональных нейроклеток на клетки опухоли головного мозга человека *in vitro* (Л.Д. Любич, Н.И. Лисяный).

В обсуждении докладов и на общем совещании Российской Ассоциации специалистов по клеточным культурам высказано единодушное мнение о высокой научно-практической значимости проведенного симпозиума.