

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИНЦ РАН)

УДК 576.5  
№ госрегистрации АААА-А17-  
117072510077-0  
Инв. № 71

«УТВЕРЖДАЮ»  
директор ИНЦ РАН  
доктор биологических наук

22.12.2017



ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Программа фундаментальных научных исследований  
государственных академий наук на 2013–2020 годы  
60. Клеточная биология, теоретические основы клеточных технологий

СОХРАНЕНИЕ И РАЗВИТИЕ КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ПОЗВОНОЧНЫХ,  
ВКЛЮЧАЯ ЧЕЛОВЕКА, ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И  
ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ И  
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ  
(заключительный)

Номер проекта в ИСГЗ ФАНО 0124-2017-0004

Протокол Ученого совета  
№ 224/935 от 01.12.2017

Научный руководитель:  
д-р биол. наук, г.н.с.

Полянская 22.12.2017  
подпись, дата

Г.Г. Полянская


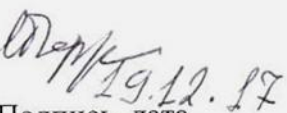
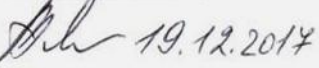
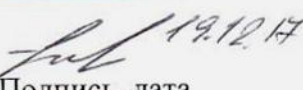
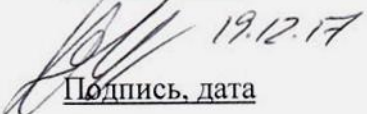
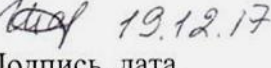
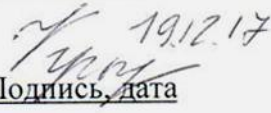
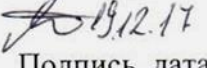
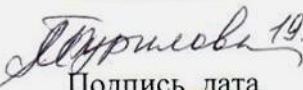
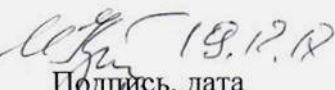

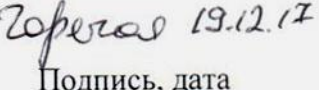
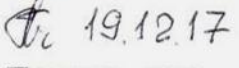
Нормоконтролер:  
ученый секретарь ИНЦ РАН,  
к.б.н.

Тюрева 22.12.2017  
подпись, дата

Тюрева И.И.

Санкт-Петербург - 2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный Руководитель г.н.с., д.б.н.	 <u>Подпись, дата</u>	Г.Г.Полянская
Исполнители темы:		
с.н.с., к.б.н.	 <u>Подпись, дата</u>	Т.Н.Ефремова
с.н.с., к.б.н.	 <u>Подпись, дата</u>	Т.К.Яковлева
н.с., к.б.н.	 <u>Подпись, дата</u>	А.М.Кольцова
н.с., к.б.н.	 <u>Подпись, дата</u>	Н.Б. Бильдюг
н.с., к.б.н.	 <u>Подпись, дата</u>	Н.С. Шарлаимова
н.с.	 <u>Подпись, дата</u>	Т.А.Крылова
м.н.с.	 <u>Подпись, дата</u>	А.С.Мусорина
м.н.с.	 <u>Подпись, дата</u>	Турилова В.И.
инженер-лаборант 1 категории	 <u>Подпись, дата</u>	И.В.Кропачева
ведущий инженер-лаборант	 <u>Подпись, дата</u>	Н.А.Шубин
инженер-лаборант 2 категории	 <u>Подпись, дата</u>	Т.С. Горячая
ведущий инженер	 <u>Подпись, дата</u>	А.И. Гусева А.И.

## РЕФЕРАТ

Отчет 98 с., 4 табл., 26 источников, 5 приложений

КОЛЛЕКЦИОННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ, КАТАЛОГ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР, СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ, МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ПРОЛИФЕРАЦИЯ, КАРИОТИПИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА

Объект исследования: биоресурсная коллекция «Коллекция культур клеток позвоночных».

Цель работы: Поддержание и развитие коллекции культур клеток позвоночных для проведения фундаментальных и прикладных исследований в области клеточной биологии и регенеративной медицины.

Результаты: 1) Создан технологический паспорт «Коллекция культур клеток позвоночных» (КККП) ИНЦ РАН, включающий в себя: (а) описание полного набора ключевых стандартных операционных процедур (СОП), обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; (б) научно-техническое обоснование смет СОПов коллекции КККП ИНЦ РАН. 2) Проведена экспериментальная верификация четырех СОПов. 3) Общие положения технологического паспорта и результаты верификации СОПов размещены в составе отчета о научно-исследовательской работе в электронной базе КККП ИНЦ РАН. 5) Электронный каталог коллекции КККП ИНЦ РАН пополнен информацией о двух коллекционных линиях клеток, согласно формату унифицированной сетевой коллекции клеточных культур. 6) Подготовлены две статьи в рецензируемый журнал на основе материалов коллекции; одна статья опубликована (Scopus), а вторая принята в печать (Scopus). 7) Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания. 8) Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте коллекции КККП ИНЦ РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания (007-ГЗ/С4101/124/2 от 08.11.2017).

В дальнейшем планируются работы по поддержанию коллекции, расширению ее фондов за счет получения и характеристики новых коллекционных линий; обеспечение образцами коллекционных клеточных линий разные учреждения России и оказание консультативных услуг по методам культивирования разных клеточных линий.

## СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения	5
Введение	6
Основная часть	10
1 Общая информация о коллекции	10
2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания	11
3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование	12
4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания	12
4.1 Создание технологического паспорта КККП ИНЦ РАН	12
4.2 Экспериментальная верификация 4-х СОП	14
4.3 Обновление электронного каталога КККП ИНЦ РАН	16
4.4 Получение и сравнительная характеристика новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из крайней плоти двух доноров одного возраста.	19
4.5 Соответствие работы утвержденному календарному плану	21
Заключение	22
Список использованных источников	24
Приложение А Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы	27
Приложение Б Стандартная операционная процедура «Поддержание единиц хранения и подготовка клеточных образцов к выдаче учреждениям РФ»	30
Приложение В Стандартная операционная процедура «Контроль качества единиц хранения»	45
Приложение Г Стандартные операционная процедура «Методы расширения фондов коллекции. Получение и характеристики неиммортизированных (диплоидных) клеточных линий»	63
Приложение Д Стандартные операционная процедура «Кариологический анализ коллекционных клеточных линий»	84

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БРК	Биоресурсная коллекция
ИП	Индекс пролиферации
КККП	Коллекция культур клеток позвоночных
МСК	Мезенхимные стволовые клетки
СОП	Стандартная операционная процедура
ЭСК	Эмбриональные стволовые клетки
DF-1	Название клеточной линии дермальных фибробластов
MSCWJ -1, MSCWJ -2,	Названия линий мезенхимных стволовых клеток

## ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение методы изолирования и поддержания жизнеспособности разных клеток *in vitro* началось с середины 50-х годов. В настоящее время культивируемые клетки, имеющие разное организменное происхождение, широко используются для решения фундаментальных и прикладных проблем биологии, медицины и сельского хозяйства. Клеточные культуры порой являются единственной моделью для изучения процессов, происходящих в целом организме. В такой широкой области знаний как клеточная биология, основные исследования проводятся на клеточных культурах

При переводе клеток в состояние *in vitro* существенно нарушаются условия их существования и, прежде всего, исключается контроль со стороны систем организма. Таким образом, клеточные популяции *in vitro* являются динамичными системами, и лишившись многоступенчатого организменного контроля, они в значительной степени подвержены влиянию внешних факторов.

В связи с возможной значительной изменчивостью разных клеточных свойств, необходимо соблюдать по возможности те условия, к которым клеточная культура была адаптирована при ее получении, т.е. соблюдать стабильные условия культивирования. Таким образом, для успешного сохранения исходных или направленно измененных свойств, а также для получения воспроизводимых экспериментальных результатов необходимо зафиксировать данное состояние культивируемых клеток. Функцию поддержания исходных свойств клеточных культур и проведения контроля за их состоянием осуществляют Коллекции клеточных культур, сохраняющие эталонные клеточные линии, которые содержатся в криоконсервированном состоянии.

Таким образом, перед каждой Коллекцией и, в частности перед КККП, постоянно стоит задача использования не только одинаковых (стандартных) условий культивирования для каждой коллекционной клеточной линии, но и использования стандартных процедур работы с клеточным материалом. Поэтому весьма актуальным является разработка и описание стандартных операционных процедур (СОП), которые должны быть использованы при работе с коллекционным клеточным материалом.

Каждая коллекционная клеточная линия имеет паспорт, в котором представлены основные характеристики, согласно международным требованиям, предъявляемым к коллекционным линиям. Паспорт является важнейшим документом, регламентирующим методы, которые необходимо использовать для принятия клеточной культуры в фонды коллекции и присвоения ей статуса коллекционной линии.

Типовой паспорт коллекционной клеточной линии человека или животного.

## ПАСПОРТ КОЛЛЕКЦИОННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ

Аббревиатура линии

Происхождение: \_\_\_\_\_

Морфология: \_\_\_\_\_

Способ культивирования: \_\_\_\_\_

Условия культивирования: \_\_\_\_\_

Жизнеспособность после криоконсервации: \_\_\_\_\_

Контроль контаминации: \_\_\_\_\_

Контроль видовой идентичности: \_\_\_\_\_

Кариология: \_\_\_\_\_

ДНК –профиль (STR) (для линий человека) \_\_\_\_\_

Другие характеристики: \_\_\_\_\_

Область применения: \_\_\_\_\_

Коллекции: (на усмотрение конкретной Коллекции) \_\_\_\_\_

Для некоторых линий авторы приводят еще 2 характеристики: эффективность клонирования и туморогенность. Кроме перечисленных основных характеристик в паспорте каждой линии приводят конкретные данные, представляющие большую важность для исследователей, пользующихся коллекционными линиями. Эти характеристики определяют возможную область применения конкретной линии.

Стандартные операционные процедуры должны описывать все действия, совершаемые с коллекционным клеточным материалом. К СОП должны относиться процедуры, необходимые для получения паспортных характеристик клеточных линий, а также процедуры, связанные с расширением коллекционных фондов и оказания основных услуг, характеризующих Коллекцию как Центр коллективного пользования (ЦКП).

Основным способом расширения фондов КККП в настоящее время является получение из разных источников новых неиммортизированных клеточных линий человека, имеющих статус МСК.

Анализ характеристик МСК человека, выделенных из разных источников, является весьма актуальной проблемой. Важность таких исследований вытекает из особенностей взаимодействия МСК, выделенных из разных тканей, со свойственным каждой ткани характерным микроокружением. Происхождение или источник получения МСК могут определять их функциональные характеристики. Под разными источниками надо понимать как разные ткани одной стадии онтогенеза, так и разные или одинаковые ткани разных стадий онтогенеза. Стадии онтогенеза условно можно разделить на взрослые, эмбриональные и внезародышевые. Сравнительное изучение характеристик, являющихся определяющими в поддержании статуса МСК, а также других характеристик, ответственных за важнейшие клеточные процессы, способствует углублению фундаментальных знаний о МСК человека. Это важно, как для понимания механизмов

биологических процессов в клетке, так и для расширения возможностей использования МСК в регенеративной медицине. Надо подчеркнуть, что МСК, являясь неиммортизированными, диплоидными клетками, служат наиболее адекватной моделью для изучения биологических процессов в здоровом организме.

Следует подчеркнуть, что при работе с неиммортизированными клеточными культурами необходимо соотносить сроки культивирования с появлением существенных признаков клеточного (репликативного) старения. Появление значительных признаков старения, безусловно, отвергает использование этих линий для прикладных задач, но расширяет возможности для фундаментальных исследований.

Известно, что репликативное старение – комплексный процесс. Есть ряд работ, где исследованы признаки и механизмы старения МСК человека. Репликативное старение МСК включает многие процессы: остановку пролиферации, морфологические изменения, увеличенную активность SA-β-галактозидазы, повышение уровня экспрессии туморсупрессорных генов, укорочение теломер, уменьшение дифференцировочного потенциала, эпигенетические изменения и др. Показано, что процесс клеточного старения в МСК может начинаться от первых пассажей и постепенно усиливаться в процессе культивирования. [1, 2, 3, 4, 5]. Важно подчеркнуть, что старение МСК, может быть связано не только с репликативным старением, которое прослеживается при длительном культивировании клеток в условиях *in vitro*, но и с внешними по отношению к МСК факторами, т.е. с микроокружением.

Старение организма обусловлено несколькими механизмами, в частности, укорочением теломер вследствие выключения теломеразы, что является основой репликативного старения; генетическими и митохондриальными повреждениями ДНК; увеличением содержания активных форм кислорода. Эти механизмы затрагивают как МСК, так и микроокружение. В связи с этим именно взаимодействие МСК и микроокружения обеспечивает возрастные характеристики МСК [6, 7]. Показано, что репликативное старение *in vitro* и старение клеток *in vivo* имеют сходные механизмы [1, 8].

Сравнительный анализ характеристик, как определяющих статус МСК, так и ряда других, ответственных за важнейшие клеточные процессы, способствует углублению знаний о МСК человека, необходимых для понимания механизмов биологических процессов в клетке и для расширения возможностей для использования МСК в регенеративной медицине. Так, в частности, исследование процесса старения диплоидных клеточных линий, с одной стороны углубляет фундаментальные знания о процессах,



происходящих в клетках, а с другой – вносит возрастные ограничения по использованию МСК в регенеративной медицине.

Согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК разного происхождения определяется рядом общих характеристик. К таким характеристикам относятся: адгезивность к культуральному пластику, активная пролиферация, экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, CD44, HLA ABC и отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA DR, способность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях [9, 10]. Существует много сравнительных исследований свойств МСК, выделенных из разных источников; приведем несколько последних работ [11, 12, 13, 14, 15,16]. Ранее нами также подробно были исследованы МСК, выделенные из разных источников, включая разные ткани взрослых, эмбриональных и внезародышевых тканей человека [17, 18, 19, 20, 21, 22]. Поскольку клеточные популяции каждого донора являются генетически уникальным материалом, одним из объектов для сравнения характеристик МСК являются одинаковые ткани разных индивидуумов близкого возраста. Представляет существенный интерес исследование генетического вклада индивидуального донора в разные характеристики МСК. Есть ряд данных, указывающих на вариации характеристик МСК между разными донорами [3, 23, 24, 25, 26]. Удачными моделями является крайняя плоть детей одного возраста.

Таким образом, основными задачами данного исследования, проводимого по теме дополнительного государственного задания № 0124-2017-0004, являются: 1. Описание 4-х СОПов, обеспечивающих развитие и поддержание коллекционного фонда КККП ИНЦ РАН; 2. Научно-техническое обоснование смет СОПов; 3. Экспериментальная верификация СОПов; 4. Обновление электронного каталога КККП ИНЦ РАН; 5. Сравнительная характеристика новых линий мезенхимных стволовых клеток из разных источников: завершение сравнительного исследования репликативного старения в линиях MSCWJ-1 и MSCWJ-2; получение и сравнительный анализ МСК, выделенных из крайней плоти доноров одного возраста. Планируемая работа будет способствовать как поддержанию, так и расширению коллекционных фондов КККП ИНЦ РАН. Планируется публикация одной статьи в рецензируемом журнале (Scopus) и сдача в печать еще одной статьи (Scopus).

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1. Общая информация о коллекции

#### 1.1 Коллекция культур клеток позвоночных (КККП)

#### 1.2 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН

#### 1.3 124

#### 1.4 Направление ФНИ: 60. Клеточная биология, теоретические основы клеточных технологий

#### 1.5 Полянская Галина Георгиевна, г.н.с., д.б.н.; [poljansk@incras.ru](mailto:poljansk@incras.ru)

раб.тел. (812) 297 44 20; +7 921 774 68 59

1.6 Назначение коллекции: Поддержание исходных свойств клеточных культур разного происхождения, получение новых клеточных линий и проведение контроля за состоянием всего коллекционного биологического материала с целью сохранения биоразнообразия генофонда. Выдача многочисленным учреждениям РФ образцов коллекционных клеточных линий, депонирование авторских клеточных линий в связи с процедурой патентования, проведение консультаций (стажировок) методам культивирования клеточных культур обеспечивают проведение многосторонних качественных фундаментальных и прикладных исследований в различных областях клеточной и молекулярной биологии.

#### 1.7 Есть

#### 1.8 ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» зарегистрирована на сайте

<http://ckp-rf.ru/ckp/3029/>

1.9. Всесоюзная (Российская) коллекции клеточных культур была создана в 1978 году решением Государственного комитета Совета Министров СССР по науке и техники и Президиума Академии наук СССР. 13 февраля 1981 года постановлением № 24/25/13 Государственный комитет СССР по науке и технике, Госплан СССР и Президиум Академии наук СССР утвердили решение о создании Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур. Головной организацией был утвержден Институт цитологии АН СССР. Центральным банком РККК была утверждена Коллекция культур клеток позвоночных ИНЦ РАН.

1.10 Пункты из Устава ФГБУН Института цитологии РАН: 21.1 – биология клетки в культуре, стволовые клетки, создание новых клеточных линий; 23.5 – организация центров коллективного пользования Института; 23.6 – оказание услуг по производству и хранению клеточных материалов, в том числе осуществляемых в рамках деятельности центра коллективного пользования Института.

1.11 Положение о Коллекции утверждено на заседании Ученого совета ИНЦ РАН – протокол № 160/871 от 02.11.2011 г.

1.12 Адрес WEB-сайта: [www.incras.ru](http://www.incras.ru)

2. Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания.

2.1 Текст отчета представлен на: 98 с.

а) WEB сайт организации: [www.incras.ru](http://www.incras.ru) (Институт цитологии РАН)

Информация о коллекции представлена на электронном портале организации: адрес страницы: [www.cytspb.rssi.ru/lab\\_ckp/ckp\\_lab\\_ru.htm](http://www.cytspb.rssi.ru/lab_ckp/ckp_lab_ru.htm)

б) Информационный портал БРК <http://brk.forge.sccc.ru/kollekcii/kollekcii-kultur-kletok/kolleksiya-kultur-kletok-pozvonochnyh-obshchebiologicheskogo-i>

2.2 Закончена работа по сравнительному анализу 2-х клеточных линий, для которых ранее был подтвержден статус МСК. В результате сопоставления результатов кариологического анализа с результатами, полученными по другим характеристикам в линии MSCWJ-2, обнаружена корреляция между часто встречающейся клональной хромосомной перестройкой на раннем пассаже и ранним репликативным старением с большой долей стареющих клеток, значительным снижением ИП при длительном культивировании, уменьшением уровня экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК, снижением дифференцировочного потенциала. Учитывая наличие метаболической кооперации между клетками, можно предположить, что изменения в MSCWJ-2 связаны с запуском клеточных процессов, которые продолжают уже в отсутствие часто встречающейся на раннем пассаже клональной хромосомной абберации. Основная часть исследовательской работы была посвящена выделению и сравнительному анализу характеристик 2-х неиммортизированных (диплоидных) клеточных линий из крайней плоти 2-х доноров одного возраста. В работе был использован ряд методов: выделение клеток из крайней плоти доноров – кожа 2-х детей 2.5 лет (материал взят в один день); морфологический анализ; количественный анализ процесса репликативного старения; эффективность клонирования; анализ пролиферативной активности; количественный и структурный кариотипический анализ; определение экспрессии поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии, подтверждающих статус МСК; иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров ранней дифференцировки ЭСК; индукция остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки при длительном культивировании с целью определения дифференцировочного потенциала линий. В результате проведенных исследований для обеих линий, названных FRSN-1 и FRSN-2, был подтвержден статус

МСК. Тем не менее, был обнаружен ряд межлинейных различий по ростовым характеристикам и характеру репликативного старения клеток. Эти различия могут быть обусловлены как непосредственно влиянием на механизмы пролиферативной активности и репликативного старения генетически разных доноров, так и опосредовано разным микроокружением, которое детерминировало свойства клеток еще до выделения их из организмов доноров.

### 3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование

3.1 Регистрационный номер ДГЗ по БРК в информационной системе «Парус» ФАНО России: 0124-2017-0004

3.2 Регистрационный номер ДГЗ по БРК в информационной системе ЦИТИС: АААА-А17-117072510077-0

3.3 Отчет по ДГЗ № 0124-2017-0004 подготовлен и загружен в систему Парус

3.4 Отчет по ДГЗ № АААА-А17-117072510077-0 подготовлен и загружен в систему ЦИТИС

3.5 Объем финансирования, выделенного на выполнение ДГЗ из средств ФАНО России в 2017 году – 5000.1 тыс. руб. Соглашение: № 007-ГЗ/С4101/124/2 от 08.11.2017

3.6 Объем финансирования, выделенного на приобретение крупного оборудования из средств ФАНО России в 2017 году (свыше 500000 тыс. руб.) – 5000 тыс. руб. Соглашение № 03-02/С4101/124/2 от 12.09.2017

### 4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания

#### 4.1 Создание технологического паспорта КККП ИНЦ РАН

##### 4.1.1 «Описание стандартных операционных процедур»

Выполнено описание стандартных операционных процедур – СОП № 1, 2, 3 и 4 обеспечивающих развитие и поддержание коллекционного фонда КККП ИНЦ РАН (ПРИЛОЖЕНИЯ Б, В, Г, Д).

- Приложение Б Стандартная операционная процедура (СОП № 1) «Поддержание единиц хранения и подготовка клеточных образцов к выдаче учреждениям РФ».

- Приложение В Стандартная операционная процедура (СОП № 2) «Контроль качества единиц хранения».

- Приложение Г Стандартная операционная процедура (СОП № 3) «Методы расширения фондов коллекции. Получение и характеристики неиммортизованных (диплоидных) клеточных линий».

- Приложение Д Стандартная операционная процедура (СОП № 4) «Кариологический анализ коллекционных клеточных линий».

#### 4.1.2 Научно-техническое обоснование смет СОП.

Научно-техническое обоснование смет СОП проведено на основании формы расчетов, разработанных Рабочей группой БРК. Расчеты были проведены на основе данных об оплате труда, приобретении материалов, расходах на содержание оборудования, коммунальных и иных затратах, необходимых для выполнения работ по следующим направлениям:

- 1) Выполнение стандартных операционных процедур (СОП).
- 2) Выполнение научно-исследовательских работ.
- 3) Общее содержание коллекции.

Обобщенные данные по расчету стоимости однократного (1 единица хранения) выполнения СОП представлены в таблицах 1 – 4.

Таблица 1 – расчет стоимости СОП № 1 «Поддержание единиц хранения и подготовка клеточных образцов к выдаче учреждениям РФ»

Тип затрат	Сумма
Оплата труда	3 258,93
Приобретение материалов	3 464,19
Иные затраты	37,54
Затраты на содержание оборудования	24 598,62
Итого:	31 359,27

Таблица 2 – расчет стоимости СОП № 2 «Контроль качества единиц хранения»

Тип затрат	Сумма
Оплата труда	2 181,46
Приобретение материалов	2 062,35
Иные затраты	338,84
Затраты на содержание оборудования	2 855,39
Итого:	7 438,03

Таблица 3 – расчет стоимости СОП № 3 «Методы расширения фондов коллекции.

Получение и характеристики неиммортизированных (диплоидных) клеточных линий»

Тип затрат	Сумма
Оплата труда	6 514,74
Приобретение материалов	23 823,18

Иные затраты	54 231,94
Затраты на содержание оборудования	3 236,73
Итого:	87 806,59

Таблица 4. Расчет стоимости СОП № 4 «Кариологический анализ коллекционных клеточных линий»

Тип затрат	Сумма
Оплата труда	15 318,90
Приобретение материалов	3 311,54
Иные затраты	52, 14
Затраты на содержание оборудования	39,18
Итого:	18 721,76

Итоговый объем требуемого годового финансирования коллекции рассчитан на основе предполагаемого плана работ и расчета накладных расходов в течение последних 12 месяцев и составил 7 437 570,22 и 1 225 131,03. Таким образом, общая сумма запланированных расходов составляет 8 662 701,25 руб.

Расчеты проводили в соответствии с моделью и методикой оценки, разработанными ИЦиГ СО РАН в рамках выполнения дополнительного государственного задания по теме: «Разработка модели финансового управления сохранением и рациональным использованием биоресурсов в рамках функционирования биоресурсных научных коллекций» ([http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_finance/report](http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/report)). Полный набор данных представлен на портале «Биоресурсные коллекции ФАНО России» ([http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_finance/collections/15](http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/collections/15)).

## 4.2. Экспериментальная верификация 4-х СОПов

### 4.2.1 Верификация СОП № 1

За период III и IV квартал 2017 года подготовлено и выдано 96 образцов разных клеточных линий по внутриинститутским и сторонним заявкам. С целью поддержания единиц хранения, т.е. коллекционных клеточных линий, обновлен пул 35 клеточных линий человека и разных видов животных. За указанный период СОП № 1 в полном объеме была использована 115 раз. Приведен перечень клеточных линий, пул которых были обновлен за отчетный период.

16 линий человека: 293 (HEK-293) – почка эмбриона, клетки, трансформированные ДНК аденовируса типа 5; RD – эмбриональная рабдомиосаркома; AsPC-1 – метастатическая аденокарцинома поджелудочной железы; T 98G – глиобластома; DF-1 – дермальные фибробласты (мезенхимные стволовые клетки) из кожи век 37-летнего донора; DF-2 – дермальные фибробласты (мезенхимные стволовые клетки) из кожи век 45-летнего донора; U-937 – гистиоцитарная лимфома; SW 837 – аденокарцинома прямой кишки; HT-1080 – фибросаркома; XPA – фибробласты больного пигментной ксеродермой, трансформированные SV40; CFTE 290<sup>+</sup> – трахеальный эпителий, трансфецированный pSVori-плазмидой; T-24 – карцинома мочевого пузыря; HN – гипернефрома; KG-1 – острая миелоидная лейкемия; FRSN – мезенхимные стволовые клетки из крайней плоти трехлетнего ребенка; MSCWJ-1 – мезенхимные стволовые клетки из Вартонова студня пупочного канатика.

1 линия обезьяны: Vero 76 – почка африканской зеленой мартышки.

5 линий мыши: F9 – тестикулярная тератокарцинома; PA 317 – фибробласты эмбриональные (линия мыши NIH/3T3 TK<sup>-</sup>); NS0/1 – клон миеломы P3X63Ag8; BALB/3T3 clone A31 - мышь BALB/c, эмбрион; Sp2/0-Ag14 – миелома, гибрид P3X63Ag8 и спленоцитов мышей BALB/c.

4 линии крысы: C6 – глиома крысы; GH3 – опухоль гипофиза; XCr – саркома крысы; RBL-1 – базофильная лейкемия.

1 линия быка: FBT – трахея эмбриона.

2 линии кенгуровой крысы: NBL-3-11 – почка; NBL-3-17 – почка.

3 линии хомячка: CHO-K1 – яичник; B14-150 – фибросаркома; V79 – легкое.

1 линия кролика: RK13 – почка.

1 линия курицы: MDCC-MSB1 – лимфобластома.

#### 4.2.2 Верификация СОП № 2

Все 35 новых закладок, полученных в связи с обновлением пула коллекционных клеточных линий (СОП № 1) прошли процедуру проверки контроля качества (СОП № 2). Была проверена жизнеспособность после декриоконсервации новых закладок, проведена визуализация морфологии и проведен контроль микробной контаминации (бактерии, грибы, микоплазмы). Все показатели качества новых закладок соответствовали паспортным данным конкретной клеточной линии.

#### 4.2.3 Верификация СОП № 3

За отчетный период были получены и охарактеризовано 2 новые линии из крайней плоти 2-х доноров одного возраста. Для получения этих линий были использованы процедуры, описанные в СОП № 3. Клетки обеих линий были выделены ферментативным

методом. На раннем этапе после выделения клеток необходимо проведение работ, используя сочетание СОП № 3 с СОПами № 1, 2 и 4. В результате полученные характеристики вновь полученной линии представляют собой основные и необходимые пункты паспорта любой коллекционной клеточной линии. Далее необходимо исследовать характеристики, определяющие особый статус линии; документ, регламентирующий такие характеристики, представлен в пункте паспорта «другие характеристики». В данном случае необходимо получить основные характеристики, подтверждающие статус МСК человека. К таким характеристикам относятся: экспрессия определенных поверхностных маркеров, характерных для МСК человека и индукция и идентификация дифференцировки в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Эти характеристики получены, согласно описанию СОП № 3. Описана процедура подготовки клеточных культур к определению экспрессии поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии, осуществляемой в Группе Проточной Цитометрии ИИЦ РАН, а также описана процедура анализа дифференцировочного потенциала в указанных направлениях полученных неиммортизированных клеточных культур.

#### 4.2.4 Верификация СОП № 4

Кариологическая характеристика коллекционных клеточных линий является неотъемлемой частью паспорта. Результаты кариологического анализа составляют 2 пункта паспорта: контроль видовой идентичности и кариотипическая характеристика линии, включающая в себя: пределы изменчивости по числу хромосом, модальное число хромосом, определенный спектр маркерных (перестроенных) хромосом или их отсутствие, количество полиплоидов. Помимо рутинной окраски, наиболее часто используется дифференциальное окрашивание на G-диски. Дифференциальная окраска на G-диски является наиболее распространенным и информативным из всех методов дифференциального окрашивания. С его помощью определяют гомологи нормальных хромосом, структурно перестроенные хромосомы, а также происхождение маркерных хромосом. Проведен кариологический анализ, согласно описанию СОП № 4, 5-ти клеточных линий. Исследованы 2 линии МСК из крайней плоти 2-х доноров (6 пассаж), 2 линии МСК, полученные из Вартонова студня пупочного канатика на поздних пассажах (28 пассаж) и 1 линия глиомы человека, которая по результатам проведенного анализа, а также молекулярно-генетического анализа не была включена в разряд коллекционных линий.

Таким образом, подводя итоги стоимости проведенной работы по верификации СОП, учитывая стоимость однократного выполнения СОП (пункт 4.1.2), составляет:

СОП № 1 – 31 359,27 x 115 = 3 606 316,05руб.



СОП № 2 –7 438,03 x 35 = 260 331, 05руб.

СОП № 3 –87 806,59 x 2 = 175 613,18 руб.

СОП № 4 –18 721,76 x 5 = 93608.80 руб

#### 4.2.5 Запись результатов верификации СОПов в электронной базе КККП ИНЦ РАН

Результаты верификации СОПов внесены на сайт КККП ИНЦ РАН ([www.cytspb.rssi.ru/lab\\_ckp/ckp\\_lab\\_ru.htm](http://www.cytspb.rssi.ru/lab_ckp/ckp_lab_ru.htm)) – в составе отчета «Сохранение и развитие коллекции культур клеток позвоночных, включая человека, для проведения фундаментальных и прикладных исследований в области клеточной биологии и регенеративной медицины».

#### 4.3. Обновление электронного каталога КККП ИНЦ РАН

Электронный каталог КККП ИНЦ РАН пополнен информацией о 2-х линиях клеток, согласно формату унифицированной сетевой коллекции клеточных культур. В каталоге представлены паспорта 2-х коллекционных клеточных линий: DF-1 – человек, дермальные фибробласты (мезенхимные стволовые клетки) из кожи век 37-летнего донора женского пола; MSCWJ -1 – человек, Вартонов студень пупочного канатика человека (мезенхимные стволовые клетки). Во все паспорта коллекционных линий человека, представленных в каталогах введен пункт: ДНК профиль (STR), позволяющий аутентифицировать с помощью молекулярно-генетического анализа каждую линию. Этот пункт паспорта относится к определению контроля качества единиц хранения. В СОП он не введен, т.к. это исследование носит заказной характер. Наша функция состоит в выдаче образцов клеточных линий человека в Фирму, занимающуюся подобными исследованиями: ООО «ГОРДИЗ» («GORDIZ»), Москва. Эта характеристика введена зарубежными Коллекциями клеточных культур и является обязательной для коллекционных линий человека при условии публикации экспериментальных результатов в большинстве рецензируемых зарубежных научных журналах.

Проведен скрининг всех коллекционных клеточных линий человека и животных КККП ИНЦ РАН с целью уточнения ряда характеристик. В паспортах всех коллекционных линий включены прижизненные микрофотографии, позволяющие пользователям контролировать качество линий при самостоятельной работе с полученным клеточным материалом. Обновленные электронные версии каталога КККП представлены на странице сайта ИНЦ РАН – ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ([www.cytspb.rssi.ru/lab\\_ckp/ckp\\_lab\\_ru.htm](http://www.cytspb.rssi.ru/lab_ckp/ckp_lab_ru.htm); [http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/katalog1\\_2017\\_with\\_figs\\_new.pdf](http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/katalog1_2017_with_figs_new.pdf)), а также на сайте ИНЦ РАН ([www.cytspb.rssi.ru](http://www.cytspb.rssi.ru) или [www.incras.ru](http://www.incras.ru)) в рубрике – «Коллекции и каталоги». Помимо

русской версии каталога на сайте ИНЦ РАН представлена английская версия КККП в рубрике «Collections Catalogs».

#### Паспорт клеточной линии DF-1

Происхождение: человек, дермальные фибробласты (мезенхимные стволовые клетки) из кожи век 37-летнего донора женского пола.

Цитология. 2016. 57 (11): 850-864.

Морфология: фибробластоподобная

Способ культивирования: монослойный

Условия культивирования: среда - DMEM/F12

сыворотка - эмбриональная бычья 10%

процедура посева - снятие клеток, используя трипсин 0.25%: версен 0.02% (1:3), кратность посева 1:3, оптимальная плотность  $4.0 - 5.0 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>

криоконсервация - ростовая среда, 10 % DMSO,  $1.0-1.5 \times 10^6$  клеток/мл в ампуле

Жизнеспособность после криоконсервации: 85 % (окраска трипановым синим на нулевом пассаже)

Контроль контаминации: бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены

Контроль видовой идентичности: кариологический анализ.

Кариология:  $2n=46$ , модальное число хромосом 46 (98.0 %), нормальный кариотип человека (46, X X), обнаружены неклональные структурные хромосомные перестройки (13.3 %), количество полиплоидов 0.8 %.

Эффективность клонирования: 34.5 %

ДНК профиль (STR):	Amelogenin:	X,	X
	CSF1PO:	11,	11
	D13S317:	11,	11
	D16S539:	10,	12
	D5S818:	9,	13
	D7S820:	10,	12
	THO1:	9.3,	9.3
	TPOX:	8,	9
	vWA:	15,	19

Другие характеристики:

Среднее время одного удвоения клеточной популяции 40.0 ч; время активной (логарифмической) фазы роста на 6-м пассаже составляет 72 ч.

Линия с ограниченным сроком жизни; фаза активного репликативного старения наступает на 25 пассаже, что соответствует более 50 удвоениям клеточной популяции.

Экспрессия поверхностных антигенов, характерных для мезенхимных стволовых клеток: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC; отсутствие экспрессии антигенов: CD34, CD45 и HLA-DR.

Направленная дифференцировка в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях.

Область применения: клеточная биология, биотехнология.

Коллекции: ИНЦ РАН.

#### Паспорт клеточной линии MSCWJ-1

Происхождение: человек, Вартонов студень пупочного канатика человека (мезенхимные стволовые клетки)

Цитология. 2017. 59 (5): 315 – 327, Цитология 2017. 59 (9): 574 – 587.

Морфология: фибробластоподобная

Способ культивирования: монослойный

Условия культивирования: среда - DMEM/F12

сыворотка - эмбриональная бычья 10%

процедура пересева - снятие клеток, используя трипсин 0.25%: версен 0.02% (1:3),

кратность рассева 1:3, оптимальная плотность  $4.0 - 5.0 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>

криоконсервация - ростовая среда, 10 % DMSO,  $1.0-1.5 \times 10^6$  клеток/мл в ампуле

Жизнеспособность после криоконсервации: 85 % (окраска трипановым синим на нулевом пассаже)

Контроль контаминации: бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены

Контроль видовой идентичности: кариологический анализ.

Кариология:  $2n=46$ , модальное число хромосом 46 (98.0 %), нормальный кариотип человека (46, X,X), количество полиплоидов 1.2 %.

Эффективность клонирования: 2.4 %

ДНК профиль (STR):	Amelogenin:	X,	X
	CSF1PO:	10,	12
	D13S317:	11,	11
	D16S539:	12,	12
	D5S818:	7,	11
	D7S820:	10,	11
	THO1:	6,	7
	TPOX:	8,	8
	vWA:	15,	16

Другие характеристики:

Среднее время одного удвоения клеточной популяции 26.8 ч; время активной (логарифмической) фазы роста на 6-м пассаже составляет 72 ч.

Линия с ограниченным сроком жизни; фаза активного репликативного старения наступает на 25 пассаже, что соответствует более 50 удвоениям клеточной популяции.

Экспрессия поверхностных антигенов, характерных для МСК человека: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC; отсутствие экспрессии антигенов: CD34, CD45 и HLA-DR.

Направленная дифференцировка в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях.

Область применения: клеточная биология, биотехнология.

Коллекции: ИНЦ РАН.

4.4 Получение и сравнительная характеристика новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из крайней плоти двух доноров одного возраста.

В рамках изучения биологии МСК человека представляется важным исследование генетического вклада индивидуального донора в разные характеристики МСК. Есть ряд данных, указывающих на вариации характеристик МСК между разными донорами [3. 23 – 26]. Удачной моделью является крайняя плоть детей одного возраста. Задачи данного исследования следующие. 1. Сравнительный анализ характеристик, определяющих статус МСК на раннем – 6 пассаже; 2. Анализ репликативного старения и ростовых характеристик полученных линий в процессе длительного культивирования; 3. Анализ дифференцировочного потенциала полученных линий в процессе длительного культивирования.

В работе использованы следующие методы: 1. Выделение клеток из крайней плоти доноров – кожа 2-х детей 2.5 лет; 3. Морфологический анализ; 4. Количественный анализ процесса репликативного старения; 5. Эффективность клонирования; 6. Анализ пролиферативной активности; 7. Количественный и структурный кариотипический анализ; 8. Определение экспрессии поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии, подтверждающих статус МСК; 9. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров ранней дифференцировки ЭСК; 10. Индукция остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки при длительном культивировании с целью определения дифференцировочного потенциала линий. 11. Для статистической обработки результатов использовали *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.05$ .

Получены две новые неиммortalизованные линии из крайней плоти доноров одного возраста (2.5. года), названные FRSN-1 и FRSN-2. На 6 пассаже проведен анализ ростовых характеристик и дифференцировочного потенциала этих линий и подтвержден для них статус мезенхимных стволовых клеток (МСК). Ряд характеристик анализировали в процессе длительного культивирования до 26 пассажа. Время начала и динамика процесса репликативного старения, определенного по активности  $\beta$ -галактозидазы, различается между линиями. Но к 26 пассажу процесс репликативного старения одинаково усиливается в обеих линиях. Эффективность клонирования на 6 пассаже различается между линиями: в FRSN-1 она значительно выше, чем в линии FRSN-2. На 26

пассаже эффективность клонирования значительно снижается в FRSN-1, а в FRSN-2 клетки теряют эту способность. Кривые роста, полученные на 6 пассаже, свидетельствуют об активной пролиферации этих линий. Среднее время удвоения клеточных популяций на 6 пассаже не различается между линиями и составляет  $36.9 \pm 0.2$  ч и  $39.0 \pm 0.8$  ч соответственно. Анализ кривых роста в обеих линиях на 26 пассаже свидетельствует о снижении пролиферативной активности и увеличении среднего времени удвоения клеточных популяций; причем в линии FRSN-2 оно значительно больше, чем в FRSN-1. Характер кривых роста существенно различается между линиями. Морфологический анализ показывает типичные для фазы старения изменения, связанные с увеличением размера и степенью распластанности клеток. Количественный и структурный кариотипический анализ, проведенный на 6 пассаже, показал, что обе линии имеют нормальный кариотип человека – 46, XY и существенно не различаются между собой по частоте хромосомных перестроек. Для определения статуса линий, на 6 пассаже провели анализ поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии. Анализ выявил в обеих линиях экспрессию поверхностных антигенов, характерных для МСК человека (CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC) и отсутствие экспрессии CD34, CD45, HLA-DR. В обеих линиях показана экспрессия маркеров недифференцированных эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК) – SSEA-4 и SOX 2. Уровень экспрессии SSEA-4 на 26 пассаже не показал изменений по сравнению с 6 пассажем. Обе линии экспрессируют маркеры ранней дифференцировки ЭСК в производные 3-х зародышевых листков. Показана способность обеих линий на 6 пассаже дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Показано значительное снижение адипогенного потенциала в обеих линиях на 20 пассаже. Эти данные свидетельствуют о том, что уже при среднем уровне репликативного старения, наблюдается изменение адипогенного дифференцировочного потенциала, в отличие от ростовых характеристик. По-видимому, репликативное старение клеток вносит существенный вклад в изменение дифференцировочного потенциала МСК. В целом, полученные результаты свидетельствуют о существовании ряда различий в клеточных линиях, полученных от разных доноров, по ростовым характеристикам и характеру репликативного старения клеток. Эти различия могут быть обусловлены как непосредственно генетическим влиянием на механизмы пролиферативной активности и репликативного старения в клеточных линиях от генетически разных доноров, так и опосредовано разным микроокружением, которое детерминировало свойства клеток еще до выделения их из организмов доноров.

4.5 Представленная работа выполнена согласно утвержденному календарному плану. Работа по созданию технологического паспорта КККП ИНЦ РАН закончена немного ранее указанного в календарном плане, срока.

- Создание технологического паспорта КККП ИНЦ РАН (30.11. вместо 20.12.2017);
- Экспериментальная верификация 4-х СОПов (30.11.2017);
- Промежуточный отчет о проделанной работе (29.09.2017);
- Пополнение электронного каталога коллекции КККП ИНЦ РАН информацией о двух паспортизованных клеточных линиях человека (25.09.2017);
- Публикация статьи в рецензируемом журнале (Scopus) (28.09.2017);
- Подготовка в рецензируемый журнал (Scopus) статьи по получению и характеристике 2-х новых диплоидных клеточных линий, полученных из крайней плоти 2-х доноров одного возраста. Статья принята в печать (20.12.2017);
- отчет о проделанной работе (заключительный) в рамках темы дополнительного государственного задания № 0124-2017-0004.
- Размещение заключительного отчета на сайте коллекции КККП ИНЦ РАН; номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания - № 007-ГЗ/С4101/124/2 от 08.11.2017.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа, проведенная в рамках темы «Сохранение и развитие коллекции культур клеток позвоночных, включая человека, для проведения фундаментальных и прикладных исследований в области клеточной биологии и регенеративной медицины» за период июль – декабрь 2017 г. состояла из нескольких разделов. 1. Создание технологического паспорта КККП ИНЦ РАН, который включает: а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; набор состоит из 4 –х СОПов; б) научно-техническое обоснование смет СОПов, проведенное на основании формы расчетов, разработанных Рабочей группой БРК. 2. Выполнена экспериментальная верификация разработанных СОПов: СОП № 1 – на примере 115 линий; СОП № 2 – на примере 35 линий; СОП № 3 – на примере 2 линий; СОП № 4 – на примере 5 линий. 3. Общие положения технологического паспорта и результаты верификации СОПов размещены в составе отчета о научно-исследовательской работе в электронной базе КККП ИНЦ РАН. 4. Обновление электронного каталога КККП ИНЦ РАН: а) пополнение информацией о 2-х паспортизованных клеточных линиях (DF-1 – человек, дермальные фибробласты и MSCWJ -1 – человек, Вартонов студень пупочного канатика (обе линии имеют статус мезенхимных стволовых клеток); б) во все паспорта

коллекционных линий человека введен пункт: ДНК профиль (STR), позволяющий аутентифицировать каждую линию. Электронные версии каталога КККП представлены на странице сайта ИНЦ РАН - ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ([http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/katalog1\\_2017\\_with\\_figs\\_new.pdf](http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/katalog1_2017_with_figs_new.pdf)), а также на сайте ИНЦ РАН ([www.cytspb.rssi.ru](http://www.cytspb.rssi.ru)) в рубрике – «Коллекции и каталоги». Помимо русской версии каталога, на сайте ИНЦ РАН представлена английская версия КККП в рубрике «Collections Catalogs». 5. В рамках расширения фондов КККП ИНЦ РАН выполнена следующая работа: а) завершено исследование динамики свойств двух линий МСК, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека при длительном культивировании (опубликована статья); проведено выделение и сравнительная характеристика новых линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных из крайней плоти разных доноров одного возраста (принята в печать статья).

Все поставленные в календарном плане задачи полностью решены.

Проведенная работа подвела итог длительной сорокалетней работы КККП. Основываясь на многолетнем опыте, было проведено описание стандартных операционных процедур (СОП), которое систематизировало методическую коллекционную работу. Был обновлен электронный каталог, размещенный на странице ЦКП сайта ИНЦ РАН, облегчающий доступ пользователям. Коллекция продолжает обеспечивать образцами коллекционных клеточных линий и оказывать консультационно-информационные услуги сотрудникам различных учреждений РФ, а также принимать на депонирование клеточный материал в связи с процедурой патентования. Коллекция постоянно проводит научные исследования в разных направлениях. В настоящее время исследовательская работа сосредоточена на получении и анализе разных неиммортизированных клеточных линий человека, что актуально как в связи с развитием фундаментальных исследований в области клеточной биологии, так и с развитием прикладных исследований в области регенеративной медицины и фармацевтики.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Saffrich R., Benes V., Blake J., Pfister S., Eckstein V., Ho A.D. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process // *PLoS One*. 2008. 3 (5):e2213. doi: 10.1371/journal.pone.0002213.
- 2 Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W.J., Peeper D.S. The essence of senescence // *Genes Dev*. 2010. 24(22). 2463-2479.
- 3 Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D., Miloso M., Redondo J., Riva G., Baronchelli S., Dalprà L., Tredici G. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cell Res Ther*. 2012. 3(6). 47.
- 4 Estrada J.C., Torres Y., Benguría A., Dopazo A., Roche E., Carrera-Quintanar L., Pérez R.A., Enríquez J.A., Torres R., Ramírez J.C., Samper E., Bernad A. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy // *Cell Death Dis*. 2013.4: e691. Doi: 10.1038/cddis.2013.211
- 5 Savickienė J., Baronaitė S., Zentelytė A., Treigyte G., Navakauskienė R. Senescence-associated molecular and epigenetic alterations in mesenchymal stem cell cultures from amniotic fluid of normal and fetus-affected pregnancy // *Stem Cells Int*. 2016: 2019498.
- 6 Sethe S., Scutt A., Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. // *Ageing Res. Rev*. 2006. 5(1). 91-116.
- 7 Block T.J., Marinkovic M., Tran O.N., Gonzalez A.O., Marshall A., Dean D.D., Chen X.D. Restoring the quantity and quality of elderly human mesenchymal stem cells for autologous cell-based therapies // *Stem Cell Res Ther*. 2017. 8(1). 239-252.
- 8 Bork S., Pfister S., Witt H., Horn P., Korn B., Ho A.D., Wagner W. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells // *Ageing Cell*. 2010. 9(1). 54-63.
- 9 Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. 2006. 8(4). 315-317.
- 10 Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application // *Vox Sang*. 2010. 98(2). 93-107.
- 11 Kao S.Y., Shyu J.F., Wang H.S., Lin C.H., Su C.H., Chen T.H., Weng Z.C., Tsai P.J. Comparisons of Differentiation Potential in Human Mesenchymal Stem Cells from Wharton's



Jelly, Bone Marrow, and Pancreatic Tissues // *Stem Cells Int.* 2015:306158. Doi: 10.1155/2015/306158

12 Garcia J., Wright K., Roberts S., Kuiper J.H., Mangham C., Richardson J., Mennan C. Characterisation of synovial fluid and infrapatellar fat pad derived mesenchymal stromal cells: The influence of tissue source and inflammatory stimulus// *Sci Rep.* 2016. 6:24295. Doi: 10.1038/srep24295.

13 Lee N.E., Kim S.J., Yang S.J., Joo S.Y., Park H., Lee K.W., Yang H.M., Park J.B. Comparative characterization of mesenchymal stromal cells from multiple abdominal adipose tissues and enrichment of angiogenic ability via CD146 molecule. *Cytotherapy.* 2016. 19(2). 170-180.

14 Araújo A.B., Salton G.D., Furlan J.M., Schneider N., Angeli M.H., Laureano Á.M., Silla L., Passos E.P., Paz A.H. Comparison of human mesenchymal stromal cells from four neonatal tissues: Amniotic membrane, chorionic membrane, placental decidua and umbilical cord // *Cytotherapy.* 2017. 19(5). 577-585.

15 Dizaji Asl K., Shafaei H., Soleimani Rad J., Nozad H.O. Comparison of Characteristics of Human Amniotic Membrane and Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. *World J Plast Surg.* 2017. 6(1). 33-39.

16 Xu L., Zhou J., Liu J., Liu Y., Wang L., Jiang R., Diao Z., Yan G., Pèault B., Sun H., Ding L. Different Angiogenic Potentials of Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Artery, Umbilical Vein, and Wharton's Jelly // *Stem Cells Int.* 2017. 3175748. Doi: 10.1155/2017/3175748

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

18 Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека // *Цитология.* 2012. 54 (1). 5-16.

19 Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Сравнительные характеристики линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга и мышцы конечности раннего эмбриона человека // *Цитология.* 2014. 56(8). 562-573.

20 Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Полянская Г.Г. Характеристика клеточных сфероидов, полученных из линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных

из костного мозга и зачатка конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 2015. 57(7). 480-490.

21 Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Кольцова А.М., Кропачева И.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Получение и характеристика неиммортизированных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста // Цитология. 2016. 58 (11). 850-864.

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

23 Bernardo M.E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A.M., Avanzini M.A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M.G., Zuffardi O., Locatelli F. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms // Cancer Res. 2007. 67(19). 9142-9149.

24 Lo Surdo J.L., Millis B.A., Bauer S.R. Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in preparations of human mesenchymal stromal cells // Cytotherapy. 2013. 15(12). 1527-1540.

25 Portalska K.J., Groen N., Krenning G., Georgi N., Mentink A., Harmsen M.C., van Blitterswijk C., de Boer J. The effect of donor variation and senescence on endothelial differentiation of human mesenchymal stromal cells // Tissue Eng Part A. 2013. 19(21-22). 2318-2329.

26 Stultz B.G., McGinnis K., Thompson E.E., Lo Surdo J.L., Bauer S.R., Hursh D.A. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture // Cytotherapy. 2016. 18(3). 336-343.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы

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

2017

ЦИТОЛОГИЯ

Том 59, № 9

#### ДИНАМИКА СВОЙСТВ ДВУХ ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА, ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

А. М. Кольцова, Т. А. Крылова, А. С. Мусорина, В. В. Зенин, В. И. Турилова, Т. К. Яковлева, Г. Г. Полянская\*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

\* электронный адрес: koltsova.am@mail.ru, poljanskaya@icras.ru

Проведен сравнительный анализ характеристик двух линий мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, полученных из Вартонова студня пупочного канатика (MSCW-1 и MSCW-2), на раннем (6-м) и позднем (13-м и 28-м) пассажах. Получены следующие результаты. 1. При длительном культивировании изменяется морфология клеток у обеих линий, но в линии MSCW-2 клетки имеют более крупные размеры и большее количество debris по сравнению с MSCW-1. 2. При длительном культивировании увеличивается среднее время удвоения клеточных популяций в линии MSCW-2 и 40 удвоений с MSCW-1. Линия MSCW-2 имеет более высокую долю стареющих клеток (80 %) по сравнению с MSCW-1 (58 %). 3. Обе линии на ранних и поздних пассажах имеют нормальный кариотип 46, XX и 46, XY соответственно. Структурный кариотипический анализ выявил цитогенетическую гетерогенность, связанную с наличием с повышенной или пониженной частотой случайных хламидальных и неканонических хромосомных нарушений, исчезающих в процессе длительного культивирования. В отличие от линии MSCW-1 в MSCW-2 на 6-м пассаже обнаружена 1 клональная перестройка короткого плеча 7-й хромосомы, встречающаяся с высокой частотой (59 %) на 13-м пассаже. 4. В обеих линиях выявлены (на 6, 13 и 28-м пассажах) экспрессия поверхностных антигенов, характерных для МСК человека (CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC и виментина), и отсутствие экспрессии CD34 и HLA-DR. 5. Снижается экспрессия поверхностного маркера недифференцированных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) SSEA-4 и отсутствует экспрессия транскрипционного фактора SOX-2 в линии MSCW-2 на 13-м пассаже и в линии MSCW-1 на 28-м пассаже. 6. На поздних пассажах по сравнению с 6-м возрастает адгезивная способность клеток. Но способность дифференцироваться в остеогенном и адипогенном направлениях подтверждена. В линии MSCW-2 в отличие от MSCW-1 на позднем пассаже отсутствует хондрогенная дифференцировка. Таким образом, в линии MSCW-2 обнаружены корреляции между часто встречающейся клональной хромосомной перестройкой на раннем пассаже и ранним репликативным старением с большой долей стареющих клеток, значительным снижением ИП при длительном культивировании, уменьшением уровня экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК, снижением дифференцировочного потенциала. Учитывая наличие метаболической кооперации между клетками, можно с осторожностью предположить, что изменения в MSCW-2 связаны с запуском клеточных процессов, которые продолжаются уже в отсутствие часто встречающейся на раннем пассаже клональной хромосомной aberrации.

**Ключевые слова:** мезенхимные стволовые клетки человека, пролиферация, репликативное старение, поверхностные клеточные маркеры, кариотип, хромосомные aberrации, дифференцировка.

В настоящее время мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека, выделенные из разных источников, широко используются для фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований. По требованиям Международного общества клеточной терапии, основными характеристиками, определяющими статус МСК, являются следующие: активная пролиферация, экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, CD44, HLA-ABC и отсутствие экспрессии маркеров CD34, CD45 и HLA-DR, способность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях (Dominić et al., 2006; Seneć et al., 2010).

Одной из важнейших характеристик МСК является геномная стабильность. Большинство линий МСК человека имеют нормальный кариотип. Тем не менее известно, что геномная нестабильность взрослых стволовых клеток существует, хотя и возникает гораздо реже, чем в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) и индуцированных стволовых клетках человека (Gaitanaris et al., 2010; Laurent et al., 2011; Poljanskaya, 2014).

геномном и адипогенном направлениях (Dominić et al., 2006; Seneć et al., 2010).

Одной из важнейших характеристик МСК является геномная стабильность. Большинство линий МСК человека имеют нормальный кариотип. Тем не менее известно, что геномная нестабильность взрослых стволовых клеток существует, хотя и возникает гораздо реже, чем в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) и индуцированных стволовых клетках человека (Gaitanaris et al., 2010; Laurent et al., 2011; Poljanskaya, 2014).

Динамика свойств двух линий МСК, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека... 585

казано и в другой работе (Park et al., 2005). По-видимому, клеточное старение может способствовать снижению разных дифференцировочных процессов.

В предыдущей работе нами показано, что образование полного монолона является критической точкой, в которой клетки линии MSCW-1 начинают претерпевать морфологические изменения, отражающие начало эндодоталиа в линии дифференцировки и которые четко видны через 3–4 сут после образования монолона. Анализ экспрессии маркера CD31 на 6-м пассаже, свидетельствующего о начале этой дифференцировки, показал увеличение уровня его экспрессии по сравнению с недифференцированными и контрольными клетками (FeMSC) (Крылова и др., 2017). Аналогичный анализ 28-го пассажа не выявил изменения морфологии клеток, сопутствующих эндотелиальной дифференцировке. Уровень экспрессии маркера CD31 (1.17%) соответствует недифференцированным клеткам. Эти данные могут свидетельствовать о сужении дифференцировочного потенциала линии MSCW-1 на поздних пассажах.

В заключение можно сделать основной вывод, вытекающий из настоящей работы. Обе линии претерпевают репликативное старение и связанные с ним изменения ряда клеточных свойств. Особое внимание следует обратить на характер изменений в линии MSCW-2 по сравнению с MSCW-1. Обнаружена корреляция между часто встречающейся клональной хромосомной перестройкой на раннем пассаже и ранним репликативным старением с высоким уровнем стареющих клеток в популяции, значительным снижением ИП в процессе длительного культивирования, уменьшением или исчезновением экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК — SSEA-4 и SOX-2, снижением дифференцировочного потенциала. Учитывая метаболическую кооперацию между клетками, можно с осторожностью предположить, что обнаруженная на раннем пассаже часто встречающаяся клональная перестройка короткого плеча хромосомы 7 связана с запуском клеточных процессов, которые продолжаются уже в отсутствие этой хромосомной aberrации.

Авторы выражают благодарность Н. Н. Мамаеву и Т. Л. Гиндиной (С.-Петербургский медицинский университет им. И. П. Павлова) за возможность использования системы автоматического каритипирования iKaryo 4 Karyotyping System (MetaSystems, Германия) и А. А. Яковлеву за помощь в техническом оформлении рисунков.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО по государственному заданию № 0124-2016-0007 и дополнительно государственному заданию на период 01.07.2017—31.12.2017 (рег. ЦИТИС № АААА-А17-117072510077-0).

#### Список литературы

Кольцова А.М., Вартонова И.В., Гордеева О.Ф., Зенин В.В., Лыбачева Н.В., Мусорина А.С., Сивачко Л.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2012. Разработка новой бесфибриллярной системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании. Цитология. 54 (8): 637–651. (Koltsova A.M., Vartanova I.V., Gordeeva O.F., Zenin V.V., Lybacheva N.V., Musorina A.S., Sivachko L.V., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2012. Developing of a new feeder-free system and characterization of human embryonic stem cell sublines, derived in this system, under autogenic and allogenic culturing. Tsitologiya. 54 (8): 637–651.)

Кольцова А.М., Зенин В.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2015. Характеристика новой линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 57 (11): 761–770. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2015. Characteristics of new mesenchymal stem cell line derived from human embryonic stem cells. Tsitologiya. 57 (11): 761–770.)

Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. 54 (1): 5–16. (Krylova T.A., Koltsova A.M., Zenin V.V., Musorina A.S., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2012. Comparative characteristics of new mesenchymal stem cell lines derived from human embryonic stem cells, bone marrow and foreskin. Tsitologiya. 54 (1): 5–16.)

Крылова Т.А., Кольцова А.М., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2017. Характеристика двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека. Цитология. 59 (5): 315–327. (Krylova T.A., Koltsova A.M., Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2017. Derivation and characteristics of two lines of human mesenchymal stem cells, generated from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Tsitologiya. 59 (5): 315–327.)

Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Кольцова А.М., Кропачева И.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2016. Получение и характеристика неиммутированных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста. Цитология. 58 (11): 850–864. (Krylova T.A., Musorina A.S., Zenin V.V., Koltsova A.M., Kropacheva I.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2016. Derivation and characteristics of a non-immortalized cell lines of human dermal fibroblasts, generated from skin of the eyelids of adult donors of different age. Tsitologiya. 58 (11): 850–864.)

Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Полянская Г.Г. 2015. Характеристика клеточных сферидов, полученных из линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и зачатка конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 57 (7): 480–490. (Krylova T.A., Musorina A.S., Zenin V.V., Poljanskaya G.G. 2015. Characteristics of the cellular spheroids, derived from mesenchymal stem cell lines from bone marrow and muscle of limb of early human embryo. Tsitologiya. 57 (7): 480–490.)

Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2014. Сравнительные характеристики линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга и мышца конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 56 (8): 562–573. (Krylova T.A., Musorina A.S., Zenin V.V., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2014. Comparative characteristics of mesenchymal stem cell lines derived from bone marrow and muscle of limb of early human embryo. Tsitologiya. 56 (8): 562–573.)

Полянская Г.Г. 2009. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях (обзор). Успехи соврем. биол. 120 (6): 529–539. (Poljanskaya G.G. 2009. Regularities of karyotypic variability in cell cultures in long-term cultivation under various conditions. Uspekhi sovremennoy biologii. 120 (6): 529–539.)

Полянская Г.Г. 2014. Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. Цитология. 56 (10): 697–707. (Poljanskaya G.G. 2014. The problem of genomic instability of cultivated human stem cells. Tsitologiya. 56 (10): 697–707.)

Седова Г.П. 2008. Количественные аспекты эволюционного роста. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. 7 (2). URL: <http://www.smlensk.ru/user/sgma/morph/6-18.html#cont.htm> (Sedova G.P. 2008. Quantitative aspects of malignant body height. Mathematical morphology. Electronic Math. Mediciobiol. 7 (2).

2 Т.А. Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. \* «Получение и сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из крайней плоти двух доноров». Цитология. 2018 (сдано в печати).

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО по государственному заданию № 0124-2017-0004.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
**РЕДАКЦИЯ ЖУРНАЛА «Цитология»**

199034 Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 1. Тел. (812)-328-52-55  
Email: cytology@mail.cytspb.rssi.ru; redcyt@yandex.ru

---

18 декабря 2017 г.

Редакция журнала «Цитология» подтверждает, что статья следующих авторов:

*Т.А. Крылова, А.С. Мусорина, А.М. Кольцова, В.В. Зенин, В.И. Турилова, Т.К. Яковлева, Г.Г. Полянская*

**«ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ  
МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КРАЙНЕЙ  
ПЛОТИ ДВУХ ДОНОРОВ ОДНОГО ВОЗРАСТА»**

принята в печать и будет опубликована в 2018 г. (Цитология. Т. 60, № 3).

Отв. секретарь журнала «Цитология»

Д.б.н.



И.А. Гамалей



З Кольцова А.М., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Кариотип, ростовые характеристики, старение, дифференцировка в процессе длительного культивирования 2-х линий мезенхимных стволовых клеток из Вартонова студня пупочного канатика человека. Цитология. 59 (11): 765-766.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-14-011224).

РАЗРАБОТКА ИСКУССТВЕННОГО СОСУДА МАЛОГО ДИАМЕТРА НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО ПОЛИМЕРА, ЗАСЕЛЕННОГО СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА. © В. Б. Карпович,<sup>1,2</sup> Ю. А. Нащесина,<sup>2</sup> П. О. Никонов,<sup>2</sup> И. М. Юдинцева,<sup>2</sup> <sup>1</sup>Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова и <sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

По данным Всемирной организации здравоохранения, заболевания сердечно-сосудистой системы — главная причина инвалидизации и смертности населения в развитых странах мира, при этом фатальным патофизиологическим механизмом является ишемия органов и тканей.

Основным способом лечения сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с облитерацией кровеносных сосудов, являются шунтирующие операции. В качестве шунтов используют аутовены или аутоартерии. Однако отсутствие собственных необходимых вен или артерий в результате их порыва или проведения повторных операций у 30% пациентов приводит к необходимости использования альтернативных сосудистых протезов. Несмотря на экономическую доступность и удобство в применении, синтетические и биологические протезы диаметром менее 6 мм не могут быть использованы в качестве шунтов, так как существует высокий риск их быстрой облитерации в результате обширной гиперплазии неинтимы или тромбозирования. Таким образом, существует острая необходимость разработки альтернативных протезов. Цель работы — разработка искусственного биодegradуемого сосуда малого диаметра в условиях *in vitro*, заселенного мезенхимными стромальными клетками (МСК) костного мозга.

В качестве материала для создания сосуда использовали полимер молочной кислоты — поли-L-лактин, который обладает рядом свойств, необходимых для использования в регенеративной медицине: отсутствие токсичности, механическая прочность, биодegradация и др. Было приготовлено два варианта каркасов с различной толщиной стенки. В приготовленные сосуды вносили суспензию МСК. В условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора сосуда оставали на 3 ч с целью создания условий для максимальной адгезии клеток, затем добавляли питательную среду (статический способ посева клеток). Подобную процедуру повторяли 3-кратно. После 7 сут культивирования с помощью криотоба были сделаны криосрезы сосудов толщиной 15–20 мкм и выполнена оценка присутствия и состояния клеток, окрашенных DAPI (4,6-диамино-2-фенилкарбонил дигидрохлорид), с помощью конфокального микроскопа (Leica TCS SP5). В обих исследуемых вариантах клетки адгезировали на стенки сосудов и образовывали плотный монослой.

Предполагается проведение дальнейших исследований с целью оценки физико-механических свойств изготовленных сосудов, разработка динамического способа заселения клеток и последующая имплантация наиболее оптимального варианта сосуда на модели лабораторных животных (крысы).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

КАРИОТИП, РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, СТАРЕНИЕ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДВУХ ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА. © А. М. Кольцова, Т. А. Крылова, А. С. Мусорина, В. И. Турилова, Т. К. Яковлева, Г. Г. Полянская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, poljansk@icr.ac.ru

Актуальной задачей клеточной биологии является сравнительный анализ мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, выделенных из разных источников. Изучение характеристик, определяющих статус МСК и ответственных за важнейшие клеточные процессы, способствует углублению фундаментальных знаний о МСК человека и расширению возможностей их использования в регенеративной медицине. Целью данной работы являлась характеристика двух линий МСК, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика человека в процессе длительного культивирования. Клетки обеих линий анализировали на раннем 6-м пассаже и на поздних 28-м и 13-м пассажах, на которых клетки линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 соответственно находятся в фазе активного старения. Увеличение в обеих линиях среднего времени удвоения клеточных популяций при длительном культивировании, с 26,8 до 41,0 ч, коррелирует с морфологическими изменениями, связанными с увеличением размеров клеток, в большей степени в MSCWJ-2, и с постепенным увеличением активности β-галактозидазы, что свидетельствует о наступлении репликативного старения. Межлинейные различия связаны с уровнем пролиферативной активности, динамикой индекса пролиферации, временем вхождения в активную фазу старения, соответствующим 30 удвоениям (13 п.) в линии MSCWJ-2 и 60 удвоениям в MSCWJ-1 (28 п.). Линия MSCWJ-2 имеет большую долю стареющих клеток (80%) по сравнению с MSCWJ-1 (58%).

Количественный кариотипический анализ показал, что линии на ранних и поздних пассажах имеют нормальный кариотип человека 46, XX и 46, XY соответственно. При структурном кариотипическом анализе в линиях обнаружена цитогенетическая гетерогенность, связанная с низкой частотой как клональных, так и неклональных хромосомных aberrаций. В процессе культивирования спектр aberrаций может меняться. Обнаружено, что на 6-м пассаже в разных клеточных популяциях одной линии (MSCWJ-1) могут присутствовать разные aberrации, в обих случаях исчезающие на позднем пассаже, т. е. эти aberrации носят случайный характер. Исключение составляет 1 клональная хромосомная aberrация, представляющая собой дупликацию большей части короткого плеча хромосомы 7, наблюдаемая с высокой частотой в линии MSCWJ-2 (39% клеток). При продолжении культивирования до 13-го пассажа она также исчезает, не являясь, по-видимому, адаптивно выгодной для клеточной популяции. Тем не менее в линии MSCWJ-2 обнаружены корреляции между часто встречающейся клональной хромосомной перестройкой на раннем пассаже и ранним репликативным старением с большой долей стареющих клеток, со значительным снижением индекса пролиферации при длительном культивировании и снижением дифференцировочного потенциала, выражающегося в отсутствии хондрогенной дифференцировки на позднем пассаже. Учитывая наличие метаболической кооперации между клетками, можно с осторожностью предположить,

что изменения в MSCWJ-2 связаны с запуском клеточных процессов, которые продолжают уже в отсутствие часто встречающейся на раннем пассаже клональной хромосомной aberrации. Надо подчеркнуть, что хромосомные перестройки, встречающиеся с низкой частотой, по-видимому, не влияют на основные характеристики МСК, изученные в данной работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО по государственному заданию № 0124-2016-0007 и дополнительному государственному заданию на период 01.07.2017—31.12.2017.

РЕПЛИКАТИВНЫЙ СТРЕСС В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННОЙ ОБРАБОТКОЙ АНТИОКСИДАНТАМИ. © Ю. С. Карпович,<sup>1,2</sup> И. С. Смирнова,<sup>1</sup> И. А. Трухилова,<sup>1</sup> В. В. Зенин,<sup>1</sup> Н. Н. Никольский,<sup>1,2</sup> О. Г. Дробинская,<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup>С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, kornienko.jsg@gmail.com

В настоящее время негативно влияние повышенного внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК) на клеточную жизнедеятельность не вызывает сомнений для всех типов клеток. Считается, что окислительный стресс является неотъемлемой составляющей развития многих заболеваний человека, а также процесса старения организма. Благоприятное влияние антиоксидантов в случае индуцированного окислительного стресса в моделях *in vivo* и *in vitro* было подтверждено большим количеством научных работ, однако вопрос влияния антиоксидантов на здоровые клетки, поддерживающие физиологический уровень АФК, до сих пор не до конца изучен.

В настоящей работе исследован ответ пролиферирующих мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) на обработку субцитотоксическими дозами различных антиоксидантов. Под субцитотоксическими дозами подразумеваются высокие терапевтические концентрации антиоксидантов, которые широко используются в других исследованиях для защиты клеток от окислительных повреждений. Добавление антиоксидантов в таких концентрациях приводит к существенному понижению уровня АФК в МСК, но не оказывает цитотоксического воздействия. Было показано, что обработка МСК рядом антиоксидантов различной природы и различных механизмов действия (tempol, resveratrol, PRP) одинаковым образом влияет на их пролиферацию. Добавление антиоксидантов в ростовую среду пролиферирующих культур МСК приводит к ингибированию синтеза ДНК и накоплению разрывов ДНК в течение S-фазы клеточного цикла, активации ответа на повреждение ДНК и дальнейшему блоку пролиферации в G<sub>2</sub>M-фазах клеточного цикла. В то же время обработка антиоксидантами ингибирует МСК, напротив, не оказывает генотоксического воздействия и блокирует самообновление клеток в поздней G<sub>1</sub>-фазе. Таким образом, высокие концентрации антиоксидантов способны вызывать репликативный стресс пролиферирующих культур МСК. Кроме того, наблюдаемые эффекты сопровождались нарушением регуляции клеточного цикла МСК. Было обнаружено, что антиоксиданты стимулируют деградацию ключевых регуляторных белков, необходимых для корректного протекания фазы син-

теза ДНК — циклина А, геминина и Eml1. Было также показано, что после 1-суточной инкубации с антиоксидантами пролиферирующих культур МСК и последующего перевода на свежую среду без антиоксидантов клетки не восстанавливают свою пролиферацию. При этом были обнаружены повышение активности ассоциированной со старением β-галактозидазы, а также активация белков-ингибиторов клеточной пролиферации (понижение уровня p-Rb, а также накопление p-p53, p21). Таким образом, обработка пролиферирующих культур МСК субцитотоксическими дозами антиоксидантов различно-го происхождения и различных механизмов действия вызывает репликативный стресс, нарушение регуляции клеточного цикла и дальнейший запуск программы индуцированного стрессом преждевременного старения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00068).

ОСОБЕННОСТИ РОСТА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕССЫВРОТочНЫХ СРЕД И СРЕД С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ СВЯВОРОТКИ. © А. В. Котона,<sup>1,2</sup> А. Н. Шугаев,<sup>1,2,3,4</sup> Т. Л. Золото,<sup>2</sup> К. А. Леочук,<sup>2</sup> Л. В. Александрова,<sup>2</sup> И. И. Егущихина,<sup>1</sup> Д. А. Иволгин,<sup>2,3</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>1</sup>ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, <sup>2</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup>Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург.

Мезенхимные клетки пупочного канатика человека являются перспективным инструментом для клеточной терапии. Для культивирования мезенхимных стволовых клеток широко используются среды, содержащие фетальную бычью сыворотку, что создает риск контаминации и аллергических реакций при клиническом применении. Чтобы избежать подобных рисков, компаниями-производителями разрабатываются как полностью бессывороточные среды, так и среды с заменителем сыворотки с пониженным содержанием животных компонентов.

Целью работы являлось определение иммунофенотипа, морфологии и пролиферативного потенциала МСК пупочного канатика (ПК) при культивировании в присутствии фетальной сыворотки, в бессывороточной среде и среде с заменителем сыворотки с пониженным содержанием животных компонентов. МСК ПК культивировали в течение 14–16 сут (4 пассажа) на средах: 1) StemPro<sup>®</sup> MSC SFM CTS<sup>™</sup> (Life Technologies) — бессывороточной среде с пониженным содержанием животных компонентов; 2) StemPro<sup>®</sup> MSC SFM XenoFree (Life Technologies) — полностью бессывороточной среде без компонентов животного происхождения; 3) XenoFree<sup>™</sup> (Life Technologies) — среде с пониженным (2%) содержанием сыворотки; 4) DMEM Low Glucose, содержащей 10% ASCM Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement (HyClone). Морфологическую характеристику МСК проводили при анализе фотографий случайно выбранных полей зрения (n = 15), полученных с использованием светового инвертированного микроскопа Axiovert 40C (Zeiss). Методом проточной цитометрии определяли иммунофенотип МСК

