

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМЕНИ Н.К. КОЛЬЦОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ИБР РАН)

УДК 57.085.2
№ НИОКТР АААА-А17-117100800002-2
№ ИНГЗ 0108-2017-0009

«УТВЕРЖДАЮ»
директор ИБР РАН
доктор биологических наук
член-корреспондент



А.В. Васильев

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Программа фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013–2020 годы

Направление № 60 «Клеточная биология, теоретические основы клеточных технологий»

УНИФИКАЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ, ИНВЕНТАРИЗАЦИИ И РАЗВИТИЯ
КОЛЛЕКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
(заключительный)

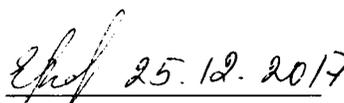
Протокол Ученого совета
№ 9 от 06.12.2017

Зам. директора по научной
работе
д-р биол. наук


подпись, дата

Н.П. Шарова

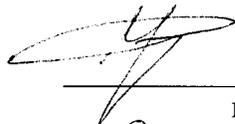
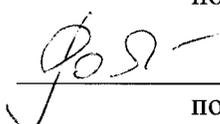
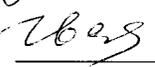
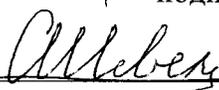
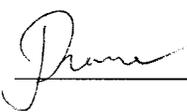
Научный руководитель
д-р биол. наук, член-корр. РАН

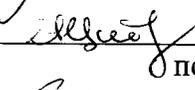
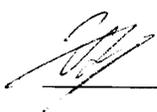
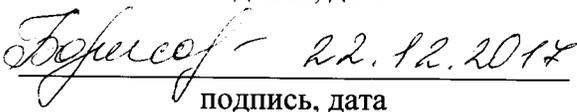
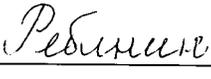
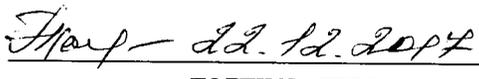
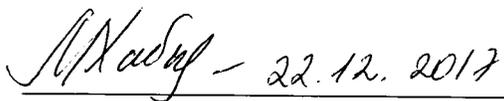

подпись, дата

Е.А. Воротеляк

Москва – 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, н. с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Е.В. Алпеева
Исполнители темы гл. н. с., д-р биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	В.В. Терских
гл. н. с., д-р биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	М.А. Александрова
с. н. с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	О.С. Роговая
с. н. с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Е.В. Киселева
с. н. с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Э.Б. Дашинимаев
с. н. с., канд. мед. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	А.В. Кузнецова
с. н. с., д-р биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	О.В. Паюшина
с. н. с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Н.Н. Буторина
н. с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	И.Г. Гвазава
н. с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Э.С. Черных
н. с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	О.Н. Шевелева
н.с.	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	А.Л. Риппа
м. н. с.	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	М.А. Борисов
м. н. с.	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	А.К. Бейлин
м. н. с.	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Е.П. Калабушева

М. Н. С.	 22.12.2017	Е.И. Моргун
	подпись, дата	
М. Н. С.	 22.12.2017	А.А. Цитрина
	подпись, дата	
М. Н. С.	 22.12.2017	Д.М. Щепетов
	подпись, дата	
М. Н. С.	 22.12.2017	Л.Ш. Измайлова
	подпись, дата	
М. Н. С.	 22.12.2017	Ю.С. Василенко
	подпись, дата	
М. Н. С., канд. биол. наук	 22.12.2017	К.К. Сухинич
	подпись, дата	
М. Н. С.	 22.12.2017	Л.А. Ржанова
	подпись, дата	
М. Н. С.	 22.12.2017	А.В. Косых
	подпись, дата	
инженер-исс.	 22.12.2017	Я.И. Лучинина
	подпись, дата	
инженер-исс.	 22.12.2017	О. В. Борисова
	подпись, дата	
ст. лаборант	 22.12.2017	А.А. Рябинин
	подпись, дата	
ст. лаборант	 22.12.2017	А.Ф. Сидоренкова
	подпись, дата	
ст. лаборант	 22.12.2017	Т.А. Гортунова
	подпись, дата	
нормоконтролер	 22.12.2017	М.Ю. Хабарова
	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчет 81 с., 2 табл., 3 источника, 5 прил.

КОЛЛЕКЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР, БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ФИБРОБЛАСТЫ, МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ЖИВОЙ ЭКВИВАЛЕНТ КОЖИ, КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ, СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА

Объект исследования – биоресурсная коллекция «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН).

Цель работы: поддержание биоресурсной коллекции «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» ИБР РАН.

Результаты. В рамках выполнения государственного задания были проведены следующие работы:

- 1) Создан технологический паспорт «Коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» (ККК) ИБР РАН, включающий в себя: (а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; (б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции ККК ИБР РАН. 2) Технологический паспорт ККК ИБР РАН размещен на интернет-сайте коллекции ККК ИБР РАН. 3) Проведена экспериментальная верификация четырех СОПов. 4) Результаты верификации СОПов записаны в электронной базе ККК ИБР РАН. 5) Электронный каталог коллекции ККК ИБР РАН пополнен информацией о 3 линиях клеток согласно формата унифицированной сетевой коллекции клеточных культур. 6) Подготовлены три рукописи статей в рецензируемых журналах на основе материалов коллекции, все три опубликованы (WoS, 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 ККК ИБР РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

Прогнозные предположения о развитии объекта исследования: в дальнейшем планируются работы по поддержанию коллекции, расширению фондов и оказание услуг по запросам.

СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения	6
Введение	7
Основная часть	11
1 Общая информация о коллекции	–
2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания	–
3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование	12
4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания	–
Заключение	19
Список использованных источников	20
Приложение А. Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы	21
Приложение Б Стандартная операционная процедура «Размораживание, культивирование, криоконсервирование, выдача и поддержание условий хранения клеточных линий»	25
Приложение В Стандартная операционная процедура «Идентификация клеточных линий человека и животных и определение их микробиологической чистоты»	40
Приложение Г Стандартная операционная процедура «Характеристика клеточных линий человека и животных»	55
Приложение Д Стандартная операционная процедура «Порядок пополнения Коллекции клеточных культур»	68

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- БРК – биоресурсная коллекция
- ДГЗ – дополнительное государственное задание
- ДП – дермальная папилла
- иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- ККК – коллекция клеточных культур
- МСК – мезенхимные стволовые клетки
- ПФНИ ГАН – программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук
- ПФЧ – постнатальные фибробласты человека
- РАН – Российская академия наук
- СОП – стандартная операционная процедура
- ФАНО – федеральное агентство научных организаций
- ФЗ – федеральный закон
- ФНИ – фундаментальное научное исследование
- ФЧ – фибробласты человека
- ЦКП – центр коллективного пользования
- УНУ – уникальная научная установка
- FDA – U.S. Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США)
- GLP – Good Laboratory Practice (надлежащая лабораторная практика)
- PBS – phosphate buffered saline (фосфатно-солевой буфер)
- STR – short tandem repeat (короткое тандемное повторение)
- WHO – World Health Organization (Всемирная организация здравоохранения, ВОЗ)

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование клеток и органов млекопитающих *in vitro* имеет более чем столетнюю историю. Уже в 1908 г. ученые смогли продемонстрировать культивирование клеток животных отдельно от организма в течение дней и даже месяцев. В 40-е гг. XX века Уилтон Ерл, Дж. О. Гей и их коллеги показали, что клетки из различных тканей можно успешно поддерживать *in vitro* в достаточно простой по составу среде, однако строго придерживаясь определенных принципов культивирования. Начиная с того времени, клеточная культура стала незаменимым объектом для исследований клеточного цикла, взаимодействий цитоплазмы и ядра, заражения различными патогенами, отношений хозяин-паразит, канцерогенеза, действия радиации, выработки различных веществ, в том числе гормонов, клетками, а в дальнейшем и для широчайшего спектра исследований на молекулярном и биохимическом уровнях. Еще на заре развития техники культивирования клеток *in vitro* клеточные и органнне культуры использовались для изучения влияния и цитотоксических эффектов различных химических веществ и фармацевтических препаратов. В настоящее время культивируемые клетки находят широкое практическое применение в фармацевтике и медицине, поскольку используются в качестве продуцентов противовирусных вакцин и различных биологически активных веществ, таких как ферменты, синтетические гормоны, моноклональные антитела, интерлейкины, лимфокины, противоопухолевые препараты, а также для создания тканеинженерных конструкторов (живых эквивалентов различных тканей и органов).

Получение первых индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) произвело практически революцию в области стволовых клеток и их применения [1]. ИПСК представляют собой плюрипотентные клетки, искусственно получаемые из дифференцированных соматических клеток путем индукции функциональных генов плюрипотентности. Эти клетки теряют свойства соматических и становятся похожими на эмбриональные стволовые клетки с точки зрения морфологии, пролиферации, профиля генной экспрессии и дифференцировочного потенциала. Поскольку иПСК могут быть получены от пациентов с генетическими заболеваниями, они могут существенно расширить возможности для разработки лекарств и регенеративной медицины [2].

В связи с масштабностью применения клеточных линий в фундаментальных исследованиях, фармацевтике и медицине были созданы десятки клеточных коллекций в различных лабораториях по всему миру. Некоторые из них превратились в крупнейшие клеточные банки. В развитых странах имеются национальные или континентальные коллекции клеточных культур: в США – American Type Culture Collection (ATCC), в Европе – European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), в Германии – Deutsche Sammlung fon

Mikroorganismen und Zellkulturen, в Японии – Riken BRC Cell Engineering Division – Cell Bank. Они насчитывают тысячи клеточных линий. Каждая клеточная линия в данных коллекциях идентифицируется с применением современных методов, и на каждую заводится паспорт. Поскольку идентификация и описание клеточных линий осуществляются в соответствии с принятыми стандартами GLP, требованиями WHO, FDA и локальных органов, данные линии могут использоваться в научных и клинических целях.

В некоторых учреждениях России также имеются коллекции клеточных культур млекопитающих. В соответствии с Федеральным законом «О биомедицинских клеточных продуктах», ФЗ-180 от 23.06.2016 г., в Российской Федерации формируется обращение биомедицинских клеточных продуктов, что требует инфраструктурного обеспечения исследований и разработок, направленных на внедрение в клиническую практику биомедицинских клеточных продуктов, содержащих в своем составе клеточные линии человека. Одновременно повышаются и требования к исследовательской деятельности в разных областях клеточной биологии и эмбриологии, которые должны соответствовать международным стандартам «Global Standards for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2016 ISSCR Guidelines» (<http://www.isscr.org/docs/default-source/guidelines/isscr-guidelines-for-stem-cell-research-and-clinical-translation.pdf>).

Для проведения научно-исследовательских работ, результаты которых могут быть опубликованы в международных научных журналах, в настоящее время российским ученым приходится обращаться за материалом в зарубежные банки клеток, где производители дают гарантию того, что приобретаемый образец клеточной линии правильно идентифицирован, не содержит микробиологической контаминации и даст при правильных условиях транспортировки, размораживания и культивирования жизнеспособную линию. Кроме того, на данный момент количество линий, депонированных в РФ, значительно меньше, чем в Европе и Америке. В связи с этим очевидна актуальность поддержания и развития клеточных коллекций в нашей стране.

В ИБР РАН на базе лаборатории клеточной биологии в связи с ее исследовательскими нуждами постепенно создавалась ККК ИБР РАН. Данная коллекция в настоящее время содержит уникальный набор клеточных линий, среди которых постнатальные эпителиальные и мезенхимные клетки человека и животных от различных доноров (первичные линии), тканеспецифичные стволовые клетки человека и животных, эмбриональные стволовые клетки человека и животных, клетки с индуцированной плюрипотентностью человека от здоровых людей и людей с генетическими отклонениями, постоянные линии клеток человека и животных, трансфицированные и трансгенные линии, и постоянно пополняется новыми линиями. ККК является достаточно востребованной: имеются регулярные запросы из

научных, медицинских и коммерческих организаций на предоставление различных клеточных культур. При использовании материалов ККК (клеток человека) в лаборатории клеточной биологии был разработан комплекс методов для регенеративной медицины. К настоящему времени уже показали свою эффективность такие разработки, как живой эквивалент кожи (ЖЭК), дермальный эквивалент, эквивалент роговицы, эквивалент уретры и др. Также исследуется роль мезенхимных стволовых клеток (МСК) в развитии различных патологических процессов, таких как развитие опухоли и метастазирование, мышечная дистрофия Ландузи-Дежерина. Совместно с коллегами из других учреждений показано, что системное введение МСК тормозит образование метастазов аденокарциномы молочной железы [3]. Получены несколько линий ИПСК человека, в том числе, от доноров с синдромом Дауна (пациенты с синдромом Дауна в настоящий момент считаются крупнейшей группой пациентов с наследственной предрасположенностью к болезни Альцгеймера). Полученные культуры могут служить тест-системами для скрининга лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера.

ККК ИБР РАН совместно с клеточными коллекциями Института цитологии и генетики СО РАН и Института цитологии РАН образуют сетевую коллекцию клеточных культур. Для поддержания и развития данных коллекций в рамках программы по развитию биоресурсных коллекций ФАНО актуальна паспортизация клеточных линий, содержащихся в них, с учетом международных требований, а также разработка новых регламентов и СОПов и их унификация.

Цель работы – поддержание и развитие коллекционного фонда и оказание услуг по выдаче клеточных культур и работе с ними.

Задачи:

- 1) Создать Технологический паспорт ККК ИБР РАН, включающий а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) научно-техническое обоснование смет СОПов коллекции ККК ИБР РАН.
- 2) Разместить Технологический паспорт ККК ИБР РАН на интернет-сайте коллекции ККК ИБР РАН.
- 3) Экспериментально верифицировать ключевые СОПы.
- 4) Записать результаты верификации СОПов в электронную базу ККК ИБР РАН.
- 5) Пополнить электронный каталог коллекции ККК ИБР РАН информацией о 3-х линиях клеток согласно формату унифицированной сетевой коллекции клеточных культур.

- 6) Подготовить две рукописи статей на основе материалов коллекции для публикации в рецензируемых журналах (SCOPUS, WoS), одна из которых должна быть принята в печать.
- 7) Подготовить календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.
- 8) Разместить отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте коллекции ККК ИБР РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

В целом выполнение поставленных задач будет способствовать поддержанию и расширению ККК ИБР РАН.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Общая информация о коллекции

1.1 Название коллекции: Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления).

1.2 Наименование организации ФАНО России – держателя коллекции: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук» (ИБР РАН).

1.3 Регистрационный номер биоресурсной коллекции в информационной системе «Парус» ФАНО России: 108.

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

1.5 Руководитель коллекции: Воротеляк Екатерина Андреевна, г.н.с., д.б.н., vorotelyak@idbras.ru, +7-499-135-40-81.

1.6 Назначение коллекции: характеристика единиц хранения (клеточных линий человека и животных) и поддержание их исходных свойств, расширение коллекционных фондов и выдача стандартизованных клеточных линий различным заказчикам.

1.7 Регистрация коллекции в перечне ЦКП/УНУ «Современная исследовательская инфраструктура Российской Федерации»: есть.

1.8 Наименование, реестровый номер и адрес ЦКП/УНУ на сайте <http://www.ckp-rf.ru>: Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления), реестровый номер 507503, <http://ckp-rf.ru/usu/507503/>.

1.9 Дата образования коллекции: 01.09.2016.

1.10 Отражение коллекционной деятельности в Уставе организации: есть (пункт 21.4. Устава «Выполнение научно-исследовательских работ, а также работ по хранению и поддержанию уникальных коллекций растений, животных и биологических материалов»).

1.11 Положение о коллекции, утвержденное на Ученом совете организации (выписка из Протокола № 2 от 15 марта 2017 г. заседания Ученого совета ИБР РАН).

1.12 Адрес WEB-сайта организации, на котором представлена информация о коллекции: <http://idbras.comcor.ru/?show=content60>.

2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного госзадания

2.1 Текст Отчета представлен на:

а) WEB-сайте организации: <http://idbras.comcor.ru/?show=content60>.

б) Информационном портале БРК: <http://brk.forge.sscs.ru/kollekcii/kollekcii-kultur-kletok/kolleksiya-kletochnyh-kultur-dlya-biotehnologicheskikh-i>

2.2 Содержание основных результатов работы по дополнительному государственному заданию в соответствии с ПФНИ ГАН: создание банка клеточных линий.

3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование

3.1 Регистрационный номер дополнительного государственного задания по БРК в информационной системе «Парус» ФАНО России: 0108-2017-0009.

3.2 Регистрационный номер дополнительного государственного задания по БРК в информационной системе ЦИТИС: АААА-А17-117100800002-2.

3.3 Отчет по дополнительному государственному заданию 0108-2017-0009 подготовлен и загружен в систему Парус (дата загрузки).

3.4 Отчет по дополнительному государственному заданию АААА-А17-117100800002-2 подготовлен и загружен в систему ЦИТИС (дата загрузки с систему ЦИТИС).

3.5 Объем финансирования, выделенного на выполнение ДГЗ из средств ФАНО России в 2017 году: 5 000 400,00 рублей, Дополнительное соглашение № 007-03-508/2 от 13.11.2017.

3.6 Объем финансирования, выделенного на приобретение крупного оборудования из средств ФАНО России в 2017 г.: 4 996 286,88 рублей, Соглашение № 007-02-1888 от 13.09.2017.

4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания

4.1 Подготовлен технологический паспорт «Коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» ИБР РАН, состоящий из описания стандартных операционных процедур (СОПов) коллекции и научно-технического обоснования их смет.

4.1.1 Составлено описание основных СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда:

- Приложение Б Стандартная операционная процедура «Размораживание, культивирование, криоконсервирование, выдача и поддержание условий хранения клеточных линий»;
- Приложение В Стандартная операционная процедура «Идентификация клеточных линий человека и животных и определение их микробиологической чистоты»;

- Приложение Г Стандартная операционная процедура «Характеристика клеточных линий человека и животных»;
- Приложение Д Стандартная операционная процедура «Порядок пополнения Коллекции клеточных культур».

4.1.2 Научно-техническое обоснование смет СОПов проведено в соответствии с формами расчетов, разработанных Рабочей группой БРК. Расчеты выполнены на основании 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.

Примеры расчета стоимости одной из процедур СОП приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – расчет стоимости СОП «Размораживание, культивирование, криоконсервирование, выдача и поддержание условий хранения клеточных линий» для процедуры размораживания первичных, иммортализованных и опухолевых клеточных линий

Тип затрат	Сумма, руб.
Оплата труда	162,78
Приобретение материалов	338,79
Иные затраты	–
Затраты на содержание оборудования	29,69
Итого:	531,26

Таблица 2 – расчет стоимости СОП «Идентификация клеточных линий человека и животных и определение их микробиологической чистоты» для процедуры STR-анализа клеточных линий человека

Тип затрат	Сумма, руб.
Оплата труда	651,13
Приобретение материалов	8,74
Иные затраты	2900,00
Затраты на содержание оборудования	9,49
Итого:	3569,36

Итоговый объем требуемого годового финансирования коллекции рассчитан на основе предполагаемого плана работ по поддержанию коллекции, ее развитию (научно-исследовательские работы), а также суммы накладных расходов в течение 12 месяцев:

1562210,27 руб., 3118128,00 руб., 1396665,39 руб., соответственно. Таким образом, общая сумма запланированных расходов составляет 6077003,66 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). Полный набор данных представлен на портале «Биоресурсные коллекции ФАНО России» (http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/collections/14).

4.2 Экспериментальная верификация СОПов

4.2.1 Проведена экспериментальная верификация СОП «Размораживание, культивирование, криоконсервирование, выдача и поддержание условий хранения клеточных линий». Верификация части СОП (размораживание, культивирование, криоконсервирование и поддержание условий хранения клеточных линий) была осуществлена более чем на 15 линиях клеток:

Линии ИПСК человека:

- IPS-KYOU – размораживание, культивирование, поддержание условий хранения (п.у.х.)
- IPS-DYP0730 – размораживание, культивирование, п.у.х.
- IPS-AFS23DS – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- IPS-Ch-LSA-1 – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.

Иммортализованные линии:

- фибробласты человека (ФЧ) 1608-hT – размораживание, культивирование, п.у.х.
- ФЧ 1608-hT-Cas9 – размораживание, культивирование, п.у.х.

Первичные клеточные линии:

- ФЧ Detroit529 – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- ФЧ Detroit532 – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- ФЧ Detroit539 – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- ФЧ ПФЧ-6 – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- ФЧ ПФЧ-11 – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- ФЧ ПФЧ-13 – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- Ea.Hy926 (гибридная линия – модель эндотелия) – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.

- клетки слюнной железы человека КСЖ-51М – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- клетки слюнной железы человека КСЖ-55М – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- клетки слюнной железы человека КСЖ-49Ж – культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- клетки слюнной железы мыши mSGC-GFP – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.

Опухолевые линии:

- клетки Т-клеточной лимфомы МТ-4 – размораживание, культивирование, п.у.х.
- карцинома шейки матки HeLa – размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.
- бета-клетки инсулиномы Beta-ТС-6 - размораживание, культивирование, криоконсервирование, п.у.х.

Верификация СОП (выдача клеточных линий) проведена на 10 клеточных линиях:

- НаСаТ – сторонняя организация (2 культуральных флакона 25 см²)
- ПФЧ – сторонняя организация (10⁷ клеток в PBS в пробирке 15 мл)
- ПФЧ – сторонняя организация (в физ. растворе, 1 пробирка – концентрация 20 млн/мл, объем 0,5мл)
- ПФЧ – сторонняя организация (в физ. растворе, 1 пробирка – концентрация 20 млн/мл, объем 1мл)
- ПФЧ – сторонняя организация (в физ. растворе, 1 пробирка – концентрация 20 млн/мл, объем 1мл)
- ПФЧ – сторонняя организация (в физ. растворе, 1 пробирка – концентрация 20 млн/мл, объем 1мл)
- ПФЧ – сторонняя организация (в физ. растворе, 1 пробирка – концентрация 20 млн/мл, объем 0,5мл)
- ПФЧ – сторонняя организация (в физ. растворе, 1 пробирка – концентрация 20 млн/мл, объем 1мл)
- HeLa – выдача внутренним заказчикам (6 культуральных флаконов 75 см²)
- HeLa – выдача внутренним заказчикам (1 культуральный флакон 25 см²)

4.2.2 Проведена экспериментальная верификация СОП «Идентификация клеточных линий человека и животных и определение их микробиологической чистоты». Верификация части СОП (идентификация клеточных линий человека и животных) была осуществлена для STR-профилирования на 11 линиях клеток:

Линии ИПСК человека (линии подтверждены):

- IPS-KYOU
- IPS-DYP0730

Опухолевые и иммортализованные линии человека (линии подтверждены):

- эпидермоидная карцинома A-431
- карцинома шейки матки HeLa
- Т-клеточная лейкемия МТ-4
- иммортализованные кератиноциты HaCaT

Первичные и иммортализованные клеточные линии человека (составлен эталонный STR-профиль):

- ПФЧ (1 донор)
- МСК ЖТ (2 разных донора)
- ДП (1 донор)
- иммортализованные ФЧ кожи 1608hT-Cas9

4.2.3 СОП «Система инвентаризации и документооборота для содержания Коллекции клеточных культур» был аннулирован как самостоятельный, и его части были включены в другие СОПы. Тем не менее, все перечисленные выше верифицированные процедуры проводились с учетом протоколов по документообороту и инвентаризации, таким образом, можно считать, что данный СОП был верифицирован как минимум на 10 клеточных линиях.

4.3 Запись результатов верификации СОПов в электронной базе ККК ИБР РАН:

Результаты верификации СОПов внесены на сайт ККК ИБР РАН (<http://idbras.comcor.ru/?show=content60>).

4.4 Пополнение электронный каталог коллекции ККК ИБР РАН.

Электронный каталог коллекции ККК ИБР РАН пополнен информацией о 3-х линиях клеток согласно формата унифицированной сетевой коллекции клеточных культур.

4.5 Подготовка статей в рецензируемых журналах

В соответствии с дополнительным государственным заданием на основе материалов коллекции подготовлены четыре рукописи статей для рецензируемых журналов и уже опубликованы три:

А) Алпеева Е.В., Сидоренкова А.Ф., Воротеляк Е.А. Экспериментальные клеточные системы: от органов в чашке Петри до "органов-на-чипах". Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2017; 72 (4): 187–198. WoS. Опубликовано.

Б) E. Kalabusheva, V. Terskikh, E. Vorotelyak Hair germ model in vitro via human postnatal keratinocyte-dermal papilla interactions: impact of hyaluronic acid. Stem Cells International V. 2017 (2017), Article ID 9271869, 14 pages. DOI 10.1155/2017/9271869, SCOPUS, WoS. Опубликовано.

В) И.П. Хорошилова-Маслова, Н.Л. Лепарская, Е.А. Воротеляк, А.В. Васильев. Роль фибробластов в моделировании пролиферативной витреоретинопатии. Вестник офтальмологии. 2017; 133 (5): 4–10. DOI 10.17116/oftalma201713354-10, SCOPUS. Опубликовано.

Г) Ю.В. Суханов, Е.А. Воротеляк, А.В. Васильев, В.В. Терских. 150 лет концепции «стволовая клетка». Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2018; 104 (1): 18–30. SCOPUS. Подготовлена к печати и будет опубликована в первом номере 2018 года (в приложении представлены сканы неокончателного варианта статьи: по согласованию с редакцией журнала изменено название статьи и будет изменен номер госрегистрации ЦИТИС на номер 2017 года).

Титульные листы данных публикаций и листы с указанием ссылки на ККК и источник финансирования представлены в Приложении А.

Д) В 2017 году вышла статья, индексируемая в международных базах данных:

Dashinimaev E.B., Artyuhov A.S., Bolshakov A.P., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V. Neurons derived from induced pluripotent stem cells of patients with Down syndrome reproduce early stages of Alzheimer's disease type pathology in vitro. J. Alzheimers Dis. 2017. Vol. 56 (2): 835–847.

4.6 Подготовка календарного плана работ

Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания (приведены основные пункты):

- Создание Технологического паспорта ККК ИБР РАН, 22.09.2017;
- Экспериментальная верификация двух СОПов, 28.09.2017;
- Подготовка промежуточного отчета о проделанной работе, 29.09.2017;
- Пополнение электронного каталога коллекции ККК ИБР РАН информацией об охарактеризованных линиях клеток, 15.12.2017;

- Направление в рецензируемые журналы (SCOPUS, WoS) не менее двух рукописей статей, подготовленных на основе материалов коллекции, 20.12.2017;

- Подготовка итогового отчета о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания, 25.12.2017.

4.7 Размещение отчета о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте коллекции ККК ИБР РАН

Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте коллекции ККК ИБР РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания (<http://idbras.comcor.ru/?show=content60>).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа направлена на разработку и экспериментальную верификацию методик поддержания и расширения биоресурсной коллекции «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» ИБР РАН. В рамках работы был создан технологический паспорт коллекции, включающий в себя описание полного набора ключевых СОПов и научно-техническое обоснование смет СОПов коллекции. Также была проведена экспериментальная верификация ключевых СОПов, пополнен электронный каталог коллекции, находящийся на Портале биоресурсных коллекций (http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/IDB_KOLTZOV_RAS_CELL) и требуемые документы размещены на интернет-сайте коллекции (<http://idbras.comcor.ru/?show=content60>). На основе материалов коллекции были подготовлены публикации в журналы, входящие в базы данных SCOPUS и WoS. Таким образом, поставленные задачи выполнены в полном объеме.

Проведенная в рамках государственного задания работа является началом нового этапа в развитии ККК ИБР, посвященного масштабной характеристики и паспортизации с учетом международных требований уже имеющихся в коллекции линий, а также получения и паспортизации новых линий с целью сохранения коллекции и распространения коллекционного материала.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006. 126 (4): 663-676.

2 Dashinimaev E.B., Artyuhov A.S., Bolshakov A.P., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V. Neurons derived from induced pluripotent stem cells of patients with Down syndrome reproduce early stages of Alzheimer's disease type pathology in vitro. *J. Alzheimers Dis.* 2017. Vol. 56 (2): 835–847.

3 Meleshina A.V., Cherkasova E.I., Shirmanova M.V., Klementieva N.V., Kiseleva E.V., Snopova L.B., Prodanets N.N., Zagaynova E.V. Influence of mesenchymal stem cells on metastasis development in mice in vivo. *Stem Cell Res Ther.* 2015. Vol. 6: 15.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

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

1 Алпеева Е.В., Сидоренкова А.Ф., Воротеляк Е.А. Экспериментальные клеточные системы: от органов в чашке Петри до "органов-на-чипах". Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2017. 72 (4): 187-198.

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ. 2017. Т. 72. № 4. С. 187–198

187

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 57.085.2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ: ОТ ОРГАНОВ В ЧАШКЕ ПЕТРИ ДО "ОРГАНОВ-НА-ЧИПАХ"

Е.В. Алпеева^{1,2,*}, А.Ф. Сидоренкова¹, Е.А. Воротеляк^{1,2}

¹Институт биологии развития имени Н.К. Колымова РАН, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, 117997, г. Москва, ул. Остроумова, д. 1
*e-mail: alpееva_fm@mail.ru

В обзоре отражена история появления и совершенствования клеточных моделей и различных способов и систем культивирования клеток животных и человека для исследований биологической активности различных веществ *in vitro*. Культуры органов и традиционные двумерные культуры диссоциированных клеток различных типов, таких как первичные, опухолевые, индуцированные плюрипотентные, стволовые и другие, имеют преимущества и недостатки, однако зачастую не являются адекватными моделями для изучения биологических процессов, происходящих в живых организмах. В настоящее время на ранних фазах разработки лекарственных препаратов для отбора наиболее активных соединений и оценки их цитотоксического действия широко используется высокопроизводительный клеточный скрининг с применением различных способов детекции сигнала: оптических на основе флуориметрических, люминесцентных и флуоресцентных методов и электрохимических. Использование животных в качестве моделей для тестирования препаратов все больше подвергается критике из-за низкой степени корреляции между результатами, получаемыми в исследованиях с их использованием, и результатами, получаемыми на человеке, а также из-за дороговизны и этических вопросов. Поэтому много усилий направлено на создание моделей на основе клеток человека. Так появились культуры с трехмерным каркасом для имитации архитектуры тканей *in vitro*, а затем и микроинженерные конструкции на основе законов микрогидродинамики, объединяющие несколько типов клеток, так называемые "органы-на-чипах", позволяющие воссоздавать физические и химические параметры микроокружения клеток в естественных условиях. Таким образом, экспериментальные клеточные системы с момента появления прошли путь от культивируемых в питательной среде целых органов до практически полной реконструкции органов *in vitro* с использованием различных типов клеток и сложных инженерных решений, что позволяет в настоящее время воссоздавать *in vitro* сложные биологические процессы и более успешно изучать влияние на них различных химических веществ и физических факторов.

Ключевые слова: культура клеток, опухолевые клетки, первичные клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, органоидная культура, живой эквивалент кожи, высокопроизводительный скрининг, тестирование лекарственных препаратов, 3D-культура, микрогидродинамика, "органы-на-чипах"

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ

195

мембраны для имитации дыхательных движений. Важно отметить, что данное устройство позволяет воспроизводить и визуализировать комплексные интегрированные реакции на уровне органов, которые невозможно наблюдать в обычных моделях клеточной культуры, такие как увеличение количества иммунных клеток, мигрирующих из кровяного русла в ответ на бактериальное заражение, их фагоцитирующую активность, появление воспалительных цитокинов и попадание наночастиц из окружающей среды [66]. Более того, способность этой модели воссоздавать механическую активность легкого позволила выявить неизученное ранее отрицательное влияние растяжения легочной ткани на ее повреждение и развитие в ней воспалительных процессов.

Ученые продолжают работы в направлении создания искусственных "органов-на-чипах", расширяя свои модели путем добавления в систему нескольких "органов", которые имеют тесную взаимосвязь, и получения практически автоматизированного "тела-на-чипе" с максимально возможной функциональностью [74, 75].

Таким образом, благодаря развитию химии, физики и инженерных технологий, в том числе появ-

лению нанотехнологий, биологии, начиная с конца XX в. эксперименты по культивированию *in vitro* с культивирования целых органов, пройдя стадию 2D- и 3D-культивирования диссоциированных клеток, в конце концов снова пришли к "органной" культуре, уже представляющей собой биоинженерное устройство. Новая органная культура, "органы-на-чипах", создается из живых и искусственных элементов по определенным принципам с учетом огромного опыта, накопленного на данный момент в области биологии и смежных наук, чтобы максимально приблизить функциональность данной системы к функциональности органов *in vivo*, но при этом контролировать в ней каждый элемент. Такой подход должен обеспечить в итоге получение идеальной модели, точно воссоздающей *in vitro* сложные биологические процессы для более успешного изучения влияния на них различных химических веществ и физических факторов и более эффективной разработки лекарственных препаратов.

Работа выполнена в рамках дополнительного государственного задания Института биологии развития им. Н.К. Колымова РАН по программе развития биоресурсных коллекций ФАНО на 2017 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loeb L. Über die Entstehung von Bindegewebe, Leucocyten und roten Blutkörperchen aus Epithel und über eine Methode, isolierte Gewebsteile zu züchten // Chicago: M. Stern and Co., 1897. 72 p.
2. Pomeroy C.M., Leake C.D. Short term cultures for drug assays: general considerations // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1954. Vol. 58. P. 1110–1128.
3. DiMaio J.A., Hanson R.W., Grabowski H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs // J. Health Econ. 2003. Vol. 22. N 2. P. 151–185.
4. Morgan S., Grotenborg P., Lexchin J., Cunningham C., Grayson D. The cost of drug development: a systematic review // Health Policy. 2011. Vol. 100. N 1. P. 4–17.
5. Sandberg S.A. High-throughput and ultra-high-throughput screening: solutions and cell-based approaches // Curr. Opin. Biotech. 2000. Vol. 11. N 1. P. 47–53.
6. An W.F., Tohday N. Cell-based assays for high-throughput screening // *J. Mol. Biol.* 2010. Vol. 414. P. 47–53.
7. Wang C., An Q., Zhao D., Li M., Zheng H., Zhang J., Liu J., Yang L., Su N. Insight into the mechanism of SDS irritation on human skin keratinocytes by examination of changes in gene expression // Am. J. Biomed. Sci. 2016. Vol. 8. N 4. P. 311–321.
8. Hoffmann J., Heider E., Karpinski S., Lott J., Thoma D., Steffen W., Ahr H.-J., Vohr H.-W., Fuchs H.W. Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000) – A new reconstructed epidermis for *in vitro* skin corrosivity testing // Toxicol. in Vitro. 2005. Vol. 19. N 7. P. 925–929.
9. Kaszawiec C., Grätz K., Liebel F., Southall M., Garay M., Bhattacharyya S., Simon N., Vander Zanden M., Van Winkle K., Pinnell J., Pinnell S., Comer A., Allen-Hughman B.L. The StrataTest® human skin model: a consistent *in vitro* alternative for toxicological testing // Toxicol. in Vitro. 2010. Vol. 24. N 7. P. 2021–2029.

2 Kalabusheva E., Terskikh V., Vorotelyak E. Hair germ model *in vitro* via human postnatal keratinocyte-dermal papilla interactions: impact of hyaluronic acid. *Stem Cells International* V. 2017 (2017), Article ID 9271869, 14 pages. DOI 10.1155/2017/9271869

Submit a Manuscript

Stem Cells International
Volume 2017 (2017), Article ID 9271869, 14 pages
<https://doi.org/10.1155/2017/9271869>

Research Article
Hair Germ Model *In Vitro* via Human Postnatal Keratinocyte-Dermal Papilla Interactions: Impact of Hyaluronic Acid

Ekaterina Kalabusheva,^{1,2} Vasily Terskikh,¹ and Ekaterina Vorotelyak^{1,2,3}

¹Laboratory of Cell Biology, N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology, 26 Vavilov St., Moscow 119334, Russia
²Department of Regenerative Medicine, Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovitianov St., Moscow 117997, Russia
³Department of Cell Biology and Histology, Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye Gory, Moscow 119234, Russia

Correspondence should be addressed to Ekaterina Kalabusheva

Received 6 April 2017; Revised 27 June 2017; Accepted 19 July 2017; Published 10 October 2017

Academic Editor: Jaganmohan R. Jangamreddy

Copyright © 2017 Ekaterina Kalabusheva et al. This is an open access article distributed under the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Hair follicle (HF) reconstruction *in vitro* is a promising field in alopecia treatment and human HF development research. Here, we combined postnatal human dermal papilla (DP) cells and skin epidermal keratinocytes (KCs) in a hanging drop culture to develop an artificial HF germ. The method is based on DP cell hair-inducing properties and KC self-organization. We evaluated two protocols of aggregate assembling. Mixed HF germ-like structures demonstrated the initiation of epithelial-mesenchymal interaction, including WNT pathway activation and expression of follicular markers. We analyzed the influence of possible DP cell niche components including soluble factors and extracellular matrix (ECM) molecules in the process of the organoid assembling and growth. Our results demonstrated that soluble factors had little impact on HF germ generation and Ki67⁺ cell score inside the organoids although BMP6 and VD3 maintained effectively the DP identity in the monolayer culture. Aggrecan, biglycan, fibronectin, and hyaluronic acid (HA) significantly stimulated cell proliferation in DP cell monolayer culture without any effect on DP cell identity. Most of ECM compounds prevented the formation of cell aggregates while HA promoted the formation of larger organoids. In conclusion, our model could be suitable to study cell-cell and cell-niche interactions during HF reconstruction *in vitro*.

doi:10.1155/2017/9271869/

stimulated cell proliferation in 2D cultures. Nevertheless, only HA induced significant upregulation of the proliferation and increased the size of aggregates. Our results may provide the new *in vitro* method of HF development, and the model could be suitable to study cell-cell and cell-niche interactions during HF reconstruction *in vitro*.

2. Materials and Methods

2.1. Primary Cell Cultures

Human scalp biopsies were obtained after face-lift surgery from informed and consented patients aged 46 to 60 years from The Clinic of Active Longevity, Institute of Beauty on Arbat. Prior to cell isolation, skin samples were washed with Hank's solution (PanEko) with gentamicin.

DP cells were isolated by the technique developed by Wu et al. [18] and modified by Chermnykh et al. [19]. Briefly, the skin was incubated in 0.5% dispase (Gibco) at 4°C overnight. Subcutaneous fat was separated manually by surgical scissors and incubated in 0.2% collagenase type I (Gibco) for 2-3 h at 37°C. After this step, HF bulbs were separated from fat by pipetting and centrifuging. To obtain DPs, HF bulbs were additionally incubated in 0.2% collagenase type I for 3-4 h at 37°C. DPs were purified by a series of low speed centrifuge. The cells were cultured in AmnioMAX[™]-II medium (Gibco). Cells at passages 1-4 were used for all experiments if another one is not indicated.

The human lung fibroblasts (LF) were purchased from ATCC (ATCC[™] CCL-204[™]) and cultured in AmnioMAX-II medium.

For KC isolation, the epidermal layer was separated from the skin by incubation in dispase at 4°C overnight. The epidermal sheet was disrupted by trypsinization for 15 min. KC suspension was inoculated in DMEM/F12 medium (PanEko) containing 4 mM glutamine (Gibco), 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone), 10 ng/ml EGF (Sigma Aldrich), 5 mg/ml insulin (Sigma Aldrich), and 0.25 mg/ml isoproterenol (Sigma Aldrich).

Overall, DP cultures obtained from 17 donors were used. Each DP culture was combined with 3-5 different donors of keratinocytes. Overall, 26 donors of keratinocytes were used. Each experiment was performed using DP from, at least, three donors. Results were compared in each pair of donors separately meaning that the control and the experiment group in each case were from the same donors of DP and keratinocytes. Results were considered to be valuable if they were reproduced in three DP cultures from different donors. All the cells obtained from KC and DP cultures were deposited in the Cell Culture Collection of the Institute of Developmental Biology, RAS.

2.2. Soluble Factors and ECM Molecules

The following soluble factors at designated concentrations were used in the study: bone morphogenetic factor 6 (BMP6, R&D systems, 100 ng/ml), 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (VD₃, Sigma Aldrich, 100 nM), valproic acid (VPA, Sigma Aldrich, 2 mM), Wnt3a (R&D systems, 100 ng/ml), Wnt5a (R&D systems, 100 ng/ml), and Dickkopf1 (Dkk1, R&D systems, 100 ng/ml).

3 Хорошилова-Маслова И.П., Лепарская Н.Л., Воротеяк Е.А., Васильев А.В. Роль фибробластов в моделировании пролиферативной витреоретинопатии. Вестник офтальмологии. 2017. Том 133 (5): 4-10. DOI 10.17116/oftalma201713354-10

<https://doi.org/10.17116/oftalma201713354-10>

Роль фибробластов в моделировании пролиферативной витреоретинопатии

И.П. ХОРОШИЛОВА-МАСЛОВА¹, Н.Л. ЛЕПАРСКАЯ¹, Е.А. ВОРОТЕЯК¹, А.В. ВАСИЛЬЕВ¹

¹ФГУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, ул. Садовая-Чернышевская, 14/19, Москва, 105062, Российская Федерация; ²Институт биологии развития им. Н.К. Колымова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334, Российская Федерация

Цель. — изучить роль гетерогенных фибробластов на этапе развития эпиретинальных мембран (ЭРМ) при моделировании пролиферативной витреоретинопатии (ПВР). **Материал и методы.** Материалом для исследования послужили 6 глаз 3 кроликов породы шиншилла, которым в полость стекловидного тела через тонкую часть игольчатого троакара вводили культуру клеток — гетерогенных фибробластов фиброциты кожи человека — 200 000 клеток в 0,1 мл. Животных убивали в течение 1 мес. после введения из экспериментальной группы глаза инкубировали и фиксировали в 10% буферированном формалине с добавлением стандартной гистологической фиксации. Микрофотографии проводили с помощью микроскопической системы Leica. **Результаты.** Установлены основные клинико-морфологические критерии формирования ЭРМ, изменения витреальных структур (ретинального пигментного эпителия и субретинального пространства), отражающие развитие пролиферативной витреоретинопатии. Показаны особенности развития ЭРМ и участки интракуляриальных структур в ее формировании. **Заключение.** Экспериментальная фибробластная модель ПВР отражает клинически значимую фиброзную стадию развития ПВР, что обосновывает значимость этой модели для разработки и при планировании эффективности антипролиферативных препаратов.

Ключевые слова: пролиферативная витреоретинопатия, фибробласты, эпиретинальные мембраны, ретинальный пигментный эпителий, сетчатка.

The significance of fibroblasts in experimental modeling of proliferative vitreoretinopathy

I.P. KHOROSHILOVA-MASLOVA¹, N.L. LEPARSKAYA¹, E.A. VOROTIYAK¹, A.V. VASILIEV²

¹Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Ministry of Health of the Russian Federation, 14/19 Sadovaya-Chernyshevskaya St., Moscow, Russian Federation, 105062; ²Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 26 Vavilova St., Moscow, Russian Federation, 119334

Aim. — to investigate the role of heterogeneous fibroblasts in the development of epiretinal membranes in eyes with modeled proliferative vitreoretinopathy. **Material and methods.** The material for investigation were 6 eyes of 3 *Chinchilla* rabbits. Suspend fibroblasts (fibroblasts of the human skin) — 200 000 cells in 0,1 ml were injected into the vitreous cavity via the pars plana. The animals were followed up for 1 month and then made out in the experiment. The eyes were enucleated and fixed in 10% neutral buffered formalin for routine histological examination. Microscopy was performed on the Leica system. **Results.** The main clinical and morphological criteria for a rabbit model of PVR (induced by intravitreal injection of heterogenic fibroblasts) have been established) epiretinal membrane formation, changes of intraocular structures (the retinal pigment epithelium and retina) and inflammation (due to inflammatory reaction). Particularities of the epiretinal membrane development and the role of different intraocular structures have been described. **Conclusion.** The experimental fibroblasts model of PVR reproduces the final, fibrous stage of PVR, which is significant for efficacy evaluation of antiproliferative drugs.

Keywords: proliferative vitreoretinopathy, fibroblasts, epiretinal membranes, retinal pigment epithelium, retina.

Free full text in English on web-site: <https://www.medicaperta.ru/journal/vesnik-oftalmologii>

Проллиферативная витреоретинопатия (ПВР) — сложное гетерогенное заболевание, которое является наиболее частым осложнением при витреальной хирургии отслойки сетчатки и характеризуется разрастанием на ее внутренней и наружной поверхности фиброзных мембран, отличающихся контрастными свойствами и придающих к тракционной отслойке сетчатки [1–4].

Патогенез ПВР, несмотря на многочисленные исследования ученых, до сих пор остается недостаточно понятным. Ведущая роль при изучении патогенеза ПВР принадлежит экспериментальному мо-

делированию. Экспериментальные модели ПВР не только позволяют выявить патогенетические механизмы, но и оценить эффективность терапевтического воздействия антипролиферативных лекарственных препаратов.

За последние 25–30 лет было показано, что в формировании эпиретинальных и субретинальных мембран основную роль играют клетки ретинально-го пигментного эпителия (РПЭ), клетки глии, макрофаги из сосуда хориоидеи, т.е. клетки внутри-

Для цитирования:
Лепарская Н.Л., Хорошилова-Маслова И.П., Воротеяк Е.А., Васильев А.В. Роль фибробластов в моделировании пролиферативной витреоретинопатии. Вестник офтальмологии. 2017.

© Коллектив авторов. 2017

4

ВЕСТНИК ОФТАЛЬМОЛОГИИ 5, 2017

глазных структур [5, 6]. Характерной особенностью этих клеточных элементов в процессе формирования мембран было постепенное превращение в фибробластоподобные клетки в результате их трансдифференцировки отчасти в РПЭ, в котором при ПВР было показано изменение фенотипа клеток, превращение эпиретинальных клеток в фибробластоподобную, обладающую специфической функцией: способностью к активной пролиферации и секреции экстрацеллюлярной матрицы для изучения экспериментальной моделью для изучения ПВР была модель с применением культуры фибробластов. В подобных моделях, помимо более быстрого формирования фиброзных эпиретинальных мембран, была отмечена специфическая ультраструктура, характерная для фибробластов, обозначившая повышение контрастных особенностей в новообразованных мембранах [8]. Исследование растущих фибробластов после их имплантации в стекловидное тело показало закономерное присутствие в их цитоплазме так называемых стресс-фибрилл, характерных для клеток с сократительными свойствами. Подобные фибробласты с сократительной функцией были названы мифробластами, так как эти фибробласты активно экспрессировали мышечный белок — альфа-мышечный актин. В процессе формирования эпиретинальных мембран (ЭРМ) из трансдифференцированных фибробластов отмечалось наличие сократительных, развитие отслойки сетчатки, что подтверждало контрастные свойства новообразованных ЭРМ.

Таким образом, фибробластная модель отражает весь пролиферативный процесс, наблюдаемый при ПВР в результате сложных иммунобиологических преобразований мигрирующих клеток, возникающих после травмы, ретинальной отслойки сетчатки, осложненных воспалительной реакцией. Если при изучении патогенеза эта модель не исследует все многообразие механизмов формирования ПВР, то для оценки эффективности применения антипролиферативных препаратов она представляет весьма ценный материал, демонстрирующий объективные данные о лечебном эффекте таких препаратов, как 5-фторурацил, митомycin, двунозобинин, кортикостероиды [3, 9].

Вместе с тем морфологические исследования показали, что в характеристике фибробластной модели большое значение имеет активность фибробластных клеток, имеющих аутоагонное, гомо- и гетероагонное (гетерологичное) происхождение. Длительное пребывание в культуре аутоагонные кожные фибробласты, гетерологичные фибробласты не ис-

следовали. Изучение изменений внутриглазных структур при моделировании гетерологичными фибробластами не проводилось.

Цель данной работы — исследовать патологические изменения в тканях глаза кроликов при интравитреальном введении гетерологичных фибробластов кожи человека, акцентировав внимание не только на особенности ЭРМ, но и на характер реактивных изменений в сетчатке и уvealном тракте и возможности участия их в трансферративном процессе. Подобный анализ позволил более основательно изучить эффективность местного воздействия антипролиферативной терапии.

Материал и методы

Культура клеток фибробластов кожи человека была получена из коллекции клеточных культур Института биологии развития им. Н.К. Колымова РАН. Материалом для исследования послужили 6 глаз кроликов породы шиншилла (3 кролика) массой 2,5–3 кг, содержащихся в стандартных условиях вивария НИИ глазных болезней им. Гельмгольца. Животным после инстилляции 0,5% раствора Alcaftin («Alcon») через плоскую часть цилиарного тела в оба глаза искусственной интравитреальной инъекцией 0,1 мл культуры клеток — 200 000 клеток в 0,1 мл фосфатного буфера. Животных убивали в течение 1 мес с использованием методов офтальмологического исследования: биомикроскопии и офтальмоскопии. После вывода животных из эксперимента глаза инкубировали, фиксировали в 10% забуференном формалине и подвергали стандартной гистологической обработке. Микроскопическое исследование проводили с помощью микроскопической системы «Leica» с встроенной цифровой камерой при увеличении 200–600.

Результаты

После интравитреального введения культуры фибробластов кожи человека в глаза кроликов в 5 и в 6 месяцев глаз развивалась картина ПВР. Морфологические изменения в экспериментальных глазах при развитии ПВР включали 4 основных компонента: 1) воспалительный процесс; 2) формирование эпиретинальных мембран; 3) изменения РПЭ; 4) изменения в сетчатке.

1. Воспалительный процесс

В тканях глаза при имплантации в стекловидное тело гетерогенных фибробластов выявлялись воспалительные изменения, ожидания которых имели определенное закономерности, преобладали преимущественно в зоне шпиральной тела и в вершине интрацилиарного нерва (ЦН). В шпиральном теле отмечались скопления лимфоцитов клеток в виде

ВЕСТНИК ОФТАЛЬМОЛОГИИ 5, 2017

5

4 Суханов Ю.В., Воротеяк Е.А., Васильев А.В., Терских В.В. 150 лет концепции «стволовая клетка». Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2018. 104 (1): 18-30.

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И. М. СЕЧЕНОВА
RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
(formerly I. M. Sechenov Physiological Journal)
104 · N 1 · 2018

**СТВОЛОВАЯ КЛЕТКА. ИСТОРИЯ КОНЦЕПЦИИ
150 ЛЕТ КОНЦЕПЦИИ СТВОЛОВАЯ КЛЕТКА**

© Ю. В. Суханов,¹ Е. А. Воротеяк,^{1, 2, 3} А. В. Васильев,^{1, 2} В. В. Терских¹

¹ Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН,
Москва, Россия
E-mail: vorotelyak@yandex.ru

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

³ Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Обзор рассматривает истоки появления концепции стволовой клетки и ее развитие в XX в. и позднее. Прослежено изменение содержания термина «стволовая клетка» в ходе развития биологической науки в XIX в. и возникновения клеточной биологии во второй половине XX в.

Ключевые слова: стволовая клетка, гемопоэз, колониеобразующие единицы, зародышевая плазма, мультипотентные стволовые клетки.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 1. С. 000—000. 2018

Yu. V. Sukhanov,¹ E. A. Vorotelyak,^{1, 2, 3} A. V. Vasiliev,^{1, 2} V. V. Terskikh.¹ STEM CELL. HISTORY OF THE CONCEPT. (150 YEARS OF CONCEPT OF STEM CELL). ¹ N. K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia; ² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; ³ N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; e-mail: vorotelyak@yandex.ru

The review considers the origin of stem cell concept and its development in XX century and later. The authors trace how the meaning of the term "stem cell" has been changing throughout biology development in XIX century and rapid advances in cell biology at the end of XX century and further.

Key words: stem cell, hemopoiesis, colony forming units, embryonic plasma, multipotent stem cells.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 1. P. 000—000. 2018

1) компоненты гемопоэтической системы можно было идентифицировать и обогащать на основе маркеров клеточной поверхности и 2) эта система позволяла разработать различные методы функционального анализа для детального изучения стволовых и прогениторных клеток. Благодаря свойствам кроветворной системы произошел огромный прорыв в изучении стволовых клеток, когда возникла проточная цитометрия с использованием моноклональных антител к маркерам клеточной поверхности, когда началось использование методов молекулярной биологии.

Эти исследования выявили очень сложную иерархическую организацию гемопоэза у взрослых организмов и в процессе эмбрионального развития. Было изучено большое число молекулярных механизмов, влияющих на жизнеспособность, пролиферацию, самоподдержание и дифференциацию гемопоэтических стволовых клеток. Исследована роль ниши в функционировании стволовых клеток.

На основании ранних исследований процесса кроветворения Е. Till и Е. А. McCulloch [62] предложили иерархическую модель гемопоэза. Согласно этой модели на вершине пирамиды находится минорная популяция гемопоэтических стволовых клеток, продуцирующих клоны, которые в результате последовательных этапов дифференциации образуют зрелые форменные элементы крови.

Детальное изучение стволовых кроветворных клеток создало стимул для изучения стволовых клеток многих тканей, в том числе эпидермиса кожи, эпителия кишечника, сперматогонияльных стволовых клеток. До настоящего времени кроветворные стволовые клетки остаются наиболее изученными и считаются «золотым стандартом», с которым сравнивают стволовые клетки других тканей. Основные теоретические положения, касающиеся стволовых клеток, были сформулированы уже в 1960-е гг. В дальнейшем они развивались в результате использования новых технологий и новых методических подходов. На пороге XXI в. изучение стволовых клеток стало одним из ведущих направлений современной клеточной биологии [13, 44], а концепция стволовой клетки остается исключительно привлекательной для многих исследователей в разных областях биологии и медицины и продолжает развиваться.

Работа поддержана программой развития биоресурсных коллекций ФАНО № НИОКР АААА-А16-116120810086-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Barnes D. W. H., Ford C. E., Gray S. M., Loutit J. F. Spontaneous and induced changes in cell populations in heavily irradiated mice. Progress in nuclear energy. Biol. Sci. Series 6 (2) : 1—10. 1959.
- [2] Becker A. J., McCulloch E. A., Siminovich L., Till J. E. The effect of differing demands for blood cell production on DNA synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice. Blood. 26 : 296—308. 1965.
- [3] Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature. 197 : 452—454. 1963.
- [4] Boveri T. Ueber die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und den somatischen Zellen bei *Ascaris megalocephala*, nebst Bemerkungen zur Entwicklungsgeschichte