

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-А18-118032690069-3
№ ИНГЗ 0108-2017-0009

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



А.В. Васильев

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

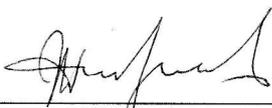
Программа фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013–2020 годы

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

УНИКАЛЬНАЯ НАУЧНАЯ УСТАНОВКА «КОЛЛЕКЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
(ОБЩЕБИОЛОГИЧЕСКОГО И БИМЕДИЦИНСКОГО НАПРАВЛЕНИЯ)
(заключительный)

Протокол Ученого совета
№ 9 от 06.12.2017

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


подпись, дата

Н.П. Шарова

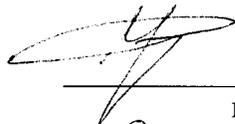
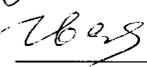
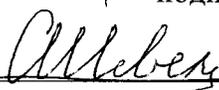
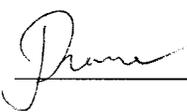
Научный руководитель
д-р биол. наук, член-корр. РАН

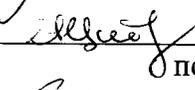
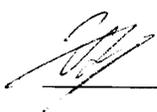
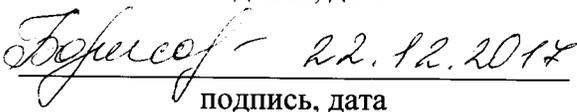
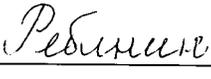
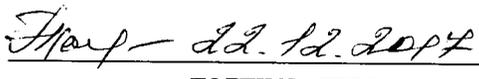
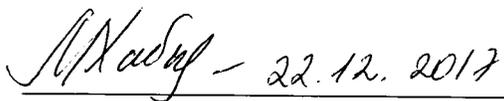

подпись, дата

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/ofalma201713354-10, 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 неоконченного 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 исследования 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 фагоцитарную 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., Tohilday 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., Lottje 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: Jagannathan 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., Воротеляк 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. ВОРОТЕЛЯК¹, 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. Колышки 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 (фибробласты кожи человека) — 200 000 клеток в 0,1 мл. Животных убивали в течение 1 мес. после введения из экспериментальной камеры глаза трансплантата и фиксировали в 10% буферированном формалине с добавлением стандартной гистологической фиксации. Микроскопия зрения проводилась с помощью микроскопической системы Leica. **Результаты.** Установлены основные клинико-морфологические критерии формирования ЭРМ, изменения витреальных структур (ретинального пигментного эпителия и сетчатки), развитие воспалительного процесса, отражающего трансформационные процессы. 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 актуальность 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. VOROTELYAK¹, A.V. VASILYEV²

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 inflammatory (due to transplantation reaction). Particularities of the epiretinal membrane development and the role of different intraocular structures have been described. **Conclusion.** The experimental fibroblastic model of PVR reproduces the final/terminal 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., Воротеляк 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 [7]. В этой связи вполне оправданной 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 трансплантированных фибробластов отмечалось изменение соотношения белков, 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 об лечебном эффекте таких препаратов, как 5-фторурацил, митомycin, дуноробин, кортикостероиды [3, 9].

Вместе с тем морфологические исследования показали, что в характеристике фибробластной модели большое значение имеет активность фибробластных клеток, имеющих аутоагонное, гомо- и гетерогенное (гетерологичное) происхождение. Длительное наблюдение изучены аутоагонные кожные фибробласты, гетерологичные фибробласты ле-е-

следованы. 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 образовании ЭРМ, но и на характере реактивных изменений в сетчатке и уvealном тракте и возможности участия их в трансферративном процессе. Подобный анализ позволит более обоснованно изучать 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. Колышки 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 Atropin («Alcon») через плоскую часть склерального тела в оба глаза искусственной иглой 32G интравитреально вводили 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 из 6 опытных 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 интраклеточного нерва (ИН). 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. Тилл 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

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Стандартная операционная процедура

«Размораживание, культивирование, криоконсервирование, выдача и поддержание условий хранения клеточных линий»

Составлено: Е.В. Алпеева, к.б.н., н.с.

Содержание и назначение: определяет порядок размораживания, культивирования, заморозки клеточных линий, их выдачи и поддержания условий их хранения; может быть применена для целей инвентаризации

Местонахождение: ИБР РАН

Пересмотр через: 1 год

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

IV. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА (КОНТРОЛЬ СОБЛЮДЕНИЯ СТАНДАРТА, ОТВЕТСТВЕННОСТЬ)

V. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

5.1 Оборудование и материалы

5.2 Размораживание клеток

5.3 Культивирование клеток

5.4 Замораживание клеток

5.5 Размораживание, культивирование и замораживание ИПСК

5.6 Выдача клеток заказчикам

5.7 Поддержание условий хранения клеточных линий

VI. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Биологический материал – биологические жидкости, ткани, клетки, секреты и продукты жизнедеятельности человека, физиологические и патологические выделения, мазки, соскобы, смывы, биопсийный материал;

Дифференцировка клеток — процесс приобретения клетками свойств и характеристик функционально зрелых клеток, относящихся к специализированному клеточному типу и обеспечивающих функции органов и тканей организма;

Клеточная линия – стандартизованная популяция клеток одного типа с воспроизводимым клеточным составом, полученная путем изъятия из организма человека биологического материала с последующим культивированием клеток вне организма человека;

ККК – Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки;

ИФА – иммунофлуоресцентный анализа;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СОП – стандартная операционная процедура;

УНУ – уникальная научная установка;

ФАНО – Федеральное агентство научных организаций;

ФЗ – Федеральный закон;

ЦКП – центр коллективного пользования;

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);

STR – short tandem repeat (короткое tandemное повторение);

WHO – World Health Organization (Всемирная организация здравоохранения, ВОЗ)

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

В условиях быстрого развития биологических и биомедицинских исследований, регенеративной биологии и медицины, клеточных, молекулярно-генетических исследований особое значение приобретает обеспечение научных исследований и разработок стандартизованными, охарактеризованными в соответствии с международными нормами клеточными культурами человека и животных [1]. Также 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 [2], не содержит микробиологической контаминации и даст при правильных условиях транспортировки, размораживания и культивирования жизнеспособную линию [3-6].

Общемировая практика создания и поддержания клеточных коллекций демонстрирует широкое распространение и масштабность имеющихся в мире подобных ресурсов. 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 von Mikroorganismen und Zellkulturen, в Японии – Riken BRC Cell Engineering Division – Cell Bank. Они насчитывают тысячи клеточных линий. Каждая клеточная линия идентифицируется с применением современных методов, и на каждую заводится паспорт клеточной линии. Поскольку идентификация и описание клеточных линий осуществляются в соответствии с принятыми стандартами GLP [7], требованиями WHO [8], FDA и локальных органов, данные линии могут использоваться в научных и клинических целях.

«Коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) (ККК)» на базе Центра коллективного пользования (ЦКП) по биологии развития на основе использования клеточных технологий и оптических методов исследований ОБН РАН при ИБР РАН имеет официальный статус с 2016 г. и зарегистрирована в форме Уникальной научной установки (УНУ) в 2017 г. Коллекция клеточных культур как УНУ оптимально встраивается в инфраструктуру ЦКП ИБР РАН, позволяя использовать и развивать коллекционный фонд не только для решения собственных исследовательских задач, но и для научно-практических и образовательных проектов с внешними партнерами.

ККК ИБР РАН содержит широкий спектр клеточных линий (более 80): постнатальные эпителиальные и мезенхимные клетки человека и животных, 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. На сайте института можно найти каталог линий, а также различные документы Коллекции (регламент и положение, типовой договор на оказание услуг и передачу линий и т.д.). Также ККК УНУ ИБР РАН с 2016 года зарегистрирована на официальном сайте ЦКП Министерства образования РФ: http://www.ckp-rf.ru/ckp/services/?SECTION_ID=435&ELEMENT_ID=504840.

Многие клеточные линии ККК ИБР РАН являются уникальными (например, ИПСК, полученные от пациентов с синдромом Дауна), при этом Коллекция содержит ряд широко известных постоянных линий (HaCaT, HeLa), востребованных для проведения различных работ в области клеточной биологии, регенерации, молекулярной биологии. С использованием материалов Коллекции за последние годы опубликовано несколько десятков статей, а также получено восемь патентов.

В связи с тем, что практический интерес к ККК появился совсем недавно, благодаря программе ФАНО по развитию Биоресурсных коллекций, в настоящее время ведется активная работа по приведению Коллекции в соответствие с международными стандартами, указанными выше.

Унификация требований к депонируемым клеточным культурам и к порядку работы с ними является необходимым и обязательным элементом каждой клеточной коллекции, в том числе ККК ИБР РАН. Ниже приведена унифицированная форма Паспорта клеточной линии, который необходимо составлять для всех линий ККК.

Форма паспорта клеточной линии:

- 1) *каталожный номер;*
- 2) *название клеточной линии;*
- 3) *происхождение (вид организма, из которого получена, ткань, норма/патология);*
- 4) *название организации, в которой линия депонирована*;*
- 5) *автор линии;*
- 6) *морфология (с фотографией**);*
- 7) *условия культивирования и криоконсервации;*
- 8) *проверка контаминации с указанием методов проверки (кратко);*
- 9) *идентификация линии (кариотип);*
- 10) *STR-профилирование (для линий человека)***;*
- 11) *транскриптомный анализ (для эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК);*
- 12) *дополнительные характеристики;*
- 13) *публикации.*

** Имеются в виду только российские организации.*

*** Необходимо включить 1-2 фотографии (при необходимости – на разных увеличениях, при различной плотности и пр.) разрешением не менее 300dpi, стандартное увеличение x20.*

**** При получении новых линий человека необходимо получить STR-профиль на нулевом пассаже или перед ним, на гомогенате клеток, что в дальнейшем обеспечит идентификацию данной линии.*

Выдача клеточных линий заказчикам должна осуществляться исключительно вместе с паспортом клеточной линии.

Все операции, проводимые с клеточными линиями, необходимо документировать в специальных рабочих журналах.

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

СОП «Размораживание, культивирование, криоконсервирование, выдача и поддержание условий хранения клеточных линий» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса работы с клеточными линиями человека и животных и их хранения для последующего распространения или исследования их свойств.

Цель разработки стандартной операционной процедуры (СОП) состоит в описании:

- процесса разморозки клеточных линий;
- процесса культивирования различных видов клеточных линий;
- заморозки (криоконсервации) клеточных линий;
- порядка выдачи клеточных линий;
- условий хранения клеточных линий.

Разработанный СОП рекомендован для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Правила лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н)
2. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ. – 2010. – 12 с.

IV. КОНТРОЛЬ СОБЛЮДЕНИЯ СТАНДАРТА, ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе

обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

V. РАЗМОРАЖИВАНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ, ВЫДАЧА И ПОДДЕРЖАНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

5.1 Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

5.1.1 Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

1. Стерилизатор воздушный MOV-112S (90 л) (Sanyo, Panasonic, Япония);
2. Автоклав лабораторный, горизонтальный, автоматический 3850E, 64 л (Tuttnauer, Израиль);
3. Лабораторная установка для получения дистиллированной воды GFL-2012 (GFL, Германия);
4. Оптический инвертированный микроскоп, просмотровый Olympus CKX 31 (Olympus, Япония);
5. Прибор для автоматизированного подсчета клеток TC20 (Bio-Rad, США);
6. CO₂-инкубатор MCO 20-AIC (Sanyo, Panasonic, Япония);
7. Инкубатор мультигазовый MCO-19M (Sanyo, Panasonic, Япония);
8. Шкаф биологической безопасности Purifier Logic 2-го класса защиты с вертикальным воздушным потоком (Labconco, США);
9. Горелка автоматическая газовая Accu Phoenix (Schuett-biotec, Германия);

10. Автоматическое дозирующее устройство S-1 для пластиковых и стеклянных пипеток (Thermo Fisher Scientific, США);
 11. Источник тока (Power Pac HC Biorad, США);
 12. Холодильник Веко DNE45080 (Веко, Турция);
 13. Комплект автоматических одноканальных дозаторов (пипеток) Eppendorf Research plus (3 штуки в комплекте – диапазон 0,5-10 мкл, диапазон 10-100 мкл, диапазон 100-1000 мкл) (Eppendorf, Германия);
 14. Центрифуга CM64 (ELMI, Латвия);
 15. Термостат ТС-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия);
 16. Холодильник низкотемпературный DW-86L388 (Haier, Китай);
 17. Криохранилище Locator 8 (Thermo Scientific, США)
- 5.1.2. Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов).
1. Посуда медицинская пластиковая для лабораторной диагностики и иммунологических исследований (Corning Inc., США);
 2. Изделия из полимерных материалов для лабораторных исследований *in vitro* (Eppendorf AG, Германия);
 3. Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные Science Purple Nitrile (Kimtech, США);
 4. Парафильм (Pechiney, США);
 5. Питательная среда ДМЕМ (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
 6. Раствор Хэнкса (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
 7. Сыворотка крови эмбриональная телячья для FBS (Gibco, Life Technologies, США);
 8. Раствор трипсин/ЭДТА 0,25% или 0,05% (Gibco, Life Technologies, США);
 9. Диспаза (Gibco, Life Technologies, США);
 10. Аккутаза – accutase (Sigma-Aldrich, США);
 11. Раствор Версена (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);

12. Питательная среда DMEM (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
13. Питательная среда DMEM (STEMCELL Technologies, Канада);
14. Питательная среда для плюрипотентных стволовых клеток mTeSR™1 (STEMCELL Technologies, Канада);
15. Матригель - BD *Matrigel*™ матрикс (BD Biosciences, США);
16. ReLeSR™ – фермент для «снятия» ИПСК с пластика (STEMCELL Technologies, Канада);
17. GlutaMAX – добавка, аналогичная L-глутамину (Gibco, Life Technologies, США);
18. Добавка ITS – инсулин-трансферрин-селенит для МСК (STEMCELL Technologies, Канада);
19. Пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (ПанЭко, Россия);
20. DPBS (phosphate buffer saline) – фосфатно-солевой буфер без Ca²⁺ и Mg²⁺ (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
21. Трипановый синий (Bio-Rad, США);
22. DMSO – криопротектор диметилсульфоксид (Sigma-Aldrich, США);
23. Этиловый спирт любого производителя

5.2. Размораживание клеток

5.2.1. Размораживание любых клеток, за исключением ИПСК.

Размораживание клеток необходимо производить быстро, поскольку криоконсервант DMSO, используемый для заморозки, токсичен для клеток при температуре выше +4 °С. Перед разморозкой необходимо ознакомиться с паспортом клеточной линии, чтобы правильно выбрать питательную среду, добавки и условия культивирования конкретной линии, а также приготовить и подписать культуральный флакон перманентным маркером, указав название линии, дату разморозки, номер пассажа.

Найти информацию о точном местонахождении необходимой криопробирки с образцом клеточной линии в криохранилище с жидким азотом по журналу, вынуть криопробирку с клетками из криохранилища, используя защитные перчатки и принимая меры предосторожности, чтобы не обжечься жидким азотом (или из сухого льда – в случае,

если это новая линия, и ее доставили курьерской службой), и перенести ее в клеточный бокс. Иногда жидкий азот попадает в пробирку при хранении, и она может взорваться при нагреве из-за перехода азота в газообразное состояние. Поэтому желательно надевать специальные защитные очки при размораживании клеток. Пробирку в ламинарном шкафу необходимо протереть ватой, смоченной в 70% спирте, в области прилегания крышки и немного отвернуть ее, чтобы дать азоту, если он попал в ампулу, выйти. Крышку завернуть и поместить ампулу в водяную баню для разморозки на 1-2 мин. При этом нельзя опускать всю ампулу целиком в воду – это может увеличить риск контаминации.

Вынуть криопробирку из водяной бани, поместить в ламинарный шкаф, снова обработать ее 70% спиртом перед открытием. С помощью автоматической пипетки перенести все содержимое криопробирки в центрифужную пробирку на 15 мл и добавить в нее 5 мл заранее подогретой культуральной среды со всеми необходимыми добавками. Перемешать и определить количество живых клеток с помощью автоматического счетчика и окраски трипановым синим* (берут 10 мкл суспензии, 10 мкл трипанового синего, смешивают и наносят в специальную камеру для подсчета клеток). В культуральный флакон внести необходимое количество суспензии с клетками – в зависимости от рекомендованной плотности посева.

* Внимание! Трипановый синий токсичен и потенциально канцерогенен. Необходимо использовать перчатки и защитную одежду при работе с ним, избегать попадания его на кожу и вдыхание его паров.

Для прикрепленной культуры. Добавить необходимое количество среды в культуральный флакон для достижения рекомендованной плотности посева. Обычно содержимое одной ампулы рассеивается на культуральный матрас 25 см², но могут быть вариации. Зачастую центрифугирование для удаления криопротектора перед посевом не нужно, поскольку он удаляется при первой смене среды. Но иногда данный шаг необходим (если это указано в документации для конкретной линии или если линия не будет культивироваться, а сразу будет использована для какого-то анализа).

Для суспензионной культуры. Рекомендовано удалять криопротектор центрифугированием при 150 g в течение 5 мин. Далее ресуспендировать осадок в свежей культуральной среде необходимого объема для достижения нужной плотности.

Культуры инкубировать с требуемой концентрацией компонентов воздушной среды и температурой. Если используется CO₂ или мультигазовый инкубатор, то необходимо, чтобы

у культуральных флаконов были вентилируемые крышки. Если крышки не вентилируемые, то нужно их немного отворачивать в инкубаторе.

Через 24 ч инкубации провести визуальную оценку клеток при помощи инвертированного микроскопа с фазовым контрастом и осуществить пересев клеток при необходимости.

Иногда в зависимости от необходимости в культуральную среду при культивировании клеток добавляют антибиотики (например, раствор пенициллина 50 ЕД/мл со стрептомицином 50 мкг/мл), однако для клеточных банков рекомендуется производить манипуляции с клетками и их выдачу заказчикам без антибиотиков.

5.3. Культивирование клеток

5.3.1. Культивирование прикрепленной культуры.

Прикрепленные клеточные культуры растут *in vitro*, пока они не покроют всю доступную поверхность или же пока в среде не закончатся питательные вещества. До наступления данных событий клетки необходимо пересевать, чтобы предотвратить их гибель. Для посева клетки необходимо перевести в суспензию. Степень клеточной адгезии различается у разных линий, но в большинстве случаев для «снятия» клеток с поверхности культурального сосуда используются такие протеазы, как трипсин. Однако такой способ не подходит для некоторых клеток, для которых трипсин токсичен, или вызывает удаление мембранных маркеров/рецепторов интереса. В таких случаях клетки необходимо «откреплять» от пластика в небольших объемах среды с помощью специального скребка.

Для оценки степени конфлюэнтности и наличия контаминации бактериями или грибами провести осмотр культуры при помощи инвертированного микроскопа. При наличии контаминации культуры необходимо выбросить. Обычно пересев осуществляют при достижении культурой 70% конфлюэнтности. Удалить среду из культурального флакона, дважды промыть клетки PBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} объемом равным половине объема удаленной культуральной среды. Внести во флакон смесь трипсин/ЭДТА 0,25% или 0,05% (в зависимости от степени адгезии культуры) из расчета 1 мл на 25 см² поверхности, распределить раствор равномерно по всей поверхности, избыток удалить. Поставить флакон в инкубатор при +37 °С на 2-10 мин. С помощью инвертированного микроскопа убедиться, что все клетки открепились от поверхности и находятся в суспензии. Можно слегка постучать по боковой поверхности флакона, чтобы открепились оставшиеся прикрепленными клетки. Нельзя держать клетки в трипсине дольше, чем необходимо для их открепления, поскольку он может повредить их поверхностные маркеры, поэтому можно

контролировать открепление клеток невооруженным глазом, периодически вынимая флакон из инкубатора и просматривая его на свет. Когда все клетки открепились, добавить небольшой объем свежей среды для инактивации трипсина и ресуспендировать их. Если культуральная среда не содержит сыворотку, необходимо добавлять ингибиторы трипсина, такие как соевый ингибитор трипсина или удалять среду с трипсином при помощи центрифугирования и ресуспендировать клетки в небольшом объеме свежей среды. Далее подсчитать количество клеток с помощью автоматического счетчика и перенести необходимое количество в новый культуральный флакон с предварительно подогретой культуральной средой. Инкубировать в соответствии с требованиями.

Необходимо наращивать клетки и повторять процедуру пересева таким же образом каждые 2-3 дня до получения необходимого их количества.

Чаще всего сразу после разморозки и до первого пересева культуре необходимо больше времени для достижения конfluence, чем между последующими пересевами.

5.3.1. Культивирование суспензионной культуры.

В основном культуры клеток, культивируемые в суспензии – это культуры клеток, полученные из крови (например, лимфоциты). Клетки могут расти по одиночке или группами. Последние при пересеве необходимо центрифугировать и ресуспендировать для получения суспензии из одиночных клеток.

Культуры просматривают при помощи инвертированного микроскопа с использованием фазового контраста. Клетки в фазе экспоненциального роста должны быть светлыми, круглыми и преломляющими свет. Гибридомы могут быть очень липкими, и иногда необходимо слегка постучать по культуральному флакону, чтобы они открепились от его стенок. Клетки, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр, часто собираются в очень большие кластеры.

Суспензионные культуры не нужно центрифугировать для пересева, если только среда не закислилась (индикатор – пожелтение фенола красного), что означает, что клетки «переросли» и могут погибнуть. В этих случаях нужно отцентрифугировать клетки 5 мин при 150 g, пересеять с немного большей плотностью и добавить 10-20% супернатанта к свежей среде.

Пересевать суспензионные культуры необходимо раз в 2-3 дня в зависимости от рекомендованной плотности посева.

5.4. Замораживание клеток

Самым надежным оборудованием для заморозки клеток является программный замораживатель, который позволяет делать процедуру криопрезервации воспроизводимой и надежной, однако зачастую лаборатории не имеют подобного прибора, поэтому существуют альтернативные и весьма надежные методы.

Для оценки степени конfluence и наличия контаминации бактериями или грибами провести осмотр культуры при помощи инвертированного микроскопа. При наличии контаминации культуры необходимо выбросить. Необходимо осуществлять заморозку клеток во время log-фазы и при достижении культурой 80-90% конfluence (для прикрепленных культур).

Перевести прикрепленную культуру в суспензию, используя трипсин/ЭДТА (по протоколу пунктов 5.2.1. и 5.3.1.) и развести в среде объемом не меньшим, чем объем использованного трипсина. Суспензионные культуры для следующего шага могут использоваться непосредственно.

Взять аликвоту суспензии, провести подсчет клеток и определение жизнеспособности при помощи автоматического счетчика. Для достижения максимальной выживаемости после дальнейшего размораживания, необходимо, чтобы жизнеспособность была не ниже 90%. Оставшуюся культуру отцентрифугировать 5 мин при 150 g. Осадок ресуспендировать в специальной среде для замораживания различных производителей (или в стандартной культуральной среде с добавлением 10% DMSO) с конечной концентрацией клеток $2-4 \times 10^6$. Внести по 1-1,5 мл суспензии в криопробирки, которые были предварительно подписаны с указанием названия культуры, номера пассажа, концентрации клеток и даты заморозки. Поместить криопробирки в специальную камеру для заморозки (например, Nalgene Mr Frosty box Sigma), заполнить ее изопропиловым спиртом и поставить в низкотемпературный морозильник с температурой -80 °C на ночь. Замороженные подобным образом криопробирки переносят в криохранилище с жидким азотом и записывают их местонахождение в журнал.

Для некоторых культур (например, для HL60) нельзя использовать DMSO в качестве криопротектора, поскольку он вызывает дифференцировку клеток. В таком случае используют другие криопротекторы, такие как глицерол. Данная информация указывается в паспорте клеточной линии.

Необходимо, чтобы при заморозке культура была в хорошем состоянии и в log-фазе, что достигается при использовании преконfluence культур и сменой культуральной среды за сутки до заморозки.

При замораживании криопробирок с культурой необходимо, чтобы температура опускалась на 1-3 °С в минуту (для большинства культур). Если в лаборатории нет ни программного замораживателя, ни специальных камер для заморозки, можно использовать следующую процедуру: ампулы помещают в коробку с хорошей теплоизоляцией, например, из полистерина со стенками не менее 1 см и переносят на –80 °С (также примерно на ночь), а затем уже в криохранилище с жидким азотом.

Если в процессе замораживания используется низкотемпературный морозильник, то необходимо иметь специальное место в нем, откуда ампулы с культурой не должны никуда перемещаться, чтобы обеспечить валидированный процесс заморозки, иначе нельзя гарантировать высокую жизнеспособность при ее дальнейшем размораживании.

5.5. Размораживание, культивирование и замораживание ИПСК.

В целом методика размораживания, культивирования и замораживания ИПСК сходна с таковой для обычных клеток. Различие заключается в том, что поскольку питательные среды и другие реактивы для данного вида клеток являются очень дорогими, культивирование обычно производят в культуральных 6-тилуночных планшетах, которые предварительно покрывают матригелем (разведенный до рабочей концентрации x50 концентрат наливают в лунку планшета, ставят в инкубатор на +37 °С на полчаса, а затем удаляют). При размораживании одну криопробирку с клетками засевают на одну лунку планшета. Среда для культивирования ИПСК – это чаще всего специальная запатентованная среда mTeSR™ 1. После размораживания необходимо культивировать клетки в той же культуральной среде, которая была использована при их криоконсервации. При пассировании в нее добавляют также ROCK ингибитор – ингибитор Rho-киназы для ускорения пролиферации ИПСК и предотвращения их спонтанной гибели. Культивируют данный вид клеток в мультигазовом инкубаторе. Для «снятия» клеток с пластика используют не трипсин, а специальные более мягкие ферменты (диспазу, аккутазу, ReLeSR™). Поскольку культуральная среда mTeSR™ 1 не содержит сыворотку, при пересеве клеток необходимо добавлять стадию центрифугирования для удаления ферментов (центрифугируют в DPBS). Обращаться с ИПСК нужно бережно. Замораживают ИПСК в среде mTeSR™ 1 с добавлением 10% DMSO так же, как и обычные клетки. Клетки из одной лунки 6-ти луночного планшета замораживаются в одной криопробирке (примерно).

5.6. Выдача клеток заказчикам

Выдачу клеток заказчикам обычно производят в культуральных флаконах 25 см² (2 флакона на одну линию). Так можно гарантировать жизнеспособность клеток и отсутствие

контаминации. При этом перед самой выдачей заполняют флаконы средой для культивирования (без FBS) полностью и заматывают для достижения герметичности соединение горлышка флакона и крышки парафильмом. Используют флаконы без вентилируемой крышки.

Если необходима длительная транспортировка клеток (или это ИПСК), то выдают незамороженные клетки в криопробирке в сухом льде.

Иногда требуется выдача большого количества клеток (биомассы) не для дальнейшего культивирования, а непосредственно для эксперимента. В таком случае наращивают необходимое количество клеток и передают, например, в центрифужных пробирках 15 мл в PBS, крышки которых также заматывают парафильмом.

При выдаче клеток также обязательно передают паспорт линии, в котором помимо сведений об идентификации, микробиологической чистоте и характеристиках линии имеются сведения о составе культуральной среды для культивирования, особенностях криоконсервации и размораживания, способах и периодичности посева и т.д. для того, чтобы заказчики могли успешно культивировать данную линию у себя в лаборатории.

Выдача клеточных линий документируется.

5.7. Поддержание условий хранения клеточных линий

При хранении в жидком азоте основные свойства коллекционных клеточных линий остаются неизменными в течение нескольких десятилетий. При помещении криопробирок в криохранилище каждая пробирка маркируется, в маркировке указана дата криоконсервации, название клеточной линии, номер пассажа. Криопробирки с замороженным клеточным материалом размещают в специальных стеллажах, помещенных в криохранилища – криогенные емкости, заполненные сжиженным азотом, обеспечивающим необходимую температуру хранения объектов -196°C . В емкостях поддерживается постоянный уровень азота для исключения нежелательных колебаний температур внутри емкостей. Проверка уровня жидкого азота проводится еженедельно визуальным способом, а также криохранилища оснащены специальными датчиками уровня жидкого азота. Дозаправка криохранилища проводится 2 раза в месяц. Соответствующая запись делается в рабочем журнале, находящемся в криокомплексе.

VI. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий человека и животных» были использованы следующие литературные источники:

1. Дьяконов Л.П. Коллекции клеточных культур – фундаментальная основа научных исследований по биологии клетки и биотехнологии. Ветеринарная патология. 2003. Том 1: 10-20.
2. Masters J.R. Cell-line authentication: End the scandal of false cell lines. Nature. 2012. Vol. 492 (7428): 186.
3. Пинаев Г.П., Богданова М.С. (отв. ред). Методы культивирования клеток // Санкт-Петербург: Изд-во Политехнического ун-та, 2008. 278 с.
4. Freshney R. Ian. The Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (6th Edition) // New-York: John Wiley & Sons, Inc., 2010. 734 p.
5. Fundamental Techniques in Cell Culture. Laboratory Handbook (ECACC). 3rd edition // Sigma-Aldrich, 2016.
6. Mazur P. Cryobiology: The freezing of biological system. Science. 1970. Vol. 168 (3934): 939–948.
7. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004, Good Laboratory Practice (GLP).
8. WHO: Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks // Geneva: WHO Press, 2010. 94 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Стандартная операционная процедура «Идентификация клеточных линий человека и животных и определение их микробиологической чистоты»

Составлено: Е.В. Алпеева, к.б.н., н.с.

Содержание и назначение: Определяет порядок идентификации и проверки микробной контаминации вновь поступающих и имеющихся в коллекции клеточных линий, может быть применена для целей инвентаризации

Местонахождение: ИБР РАН

Пересмотр через: 1 год

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

IV. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА (КОНТРОЛЬ СОБЛЮДЕНИЯ СТАНДАРТА, ОТВЕТСТВЕННОСТЬ)

V. ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ

5.1 Оборудование и материалы

5.2 Выявление контаминации микоплазмой

5.3 Кариотипирование

5.4 STR - профилирование

VI. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Биологический материал – биологические жидкости, ткани, клетки, секреты и продукты жизнедеятельности человека, физиологические и патологические выделения, мазки, соскобы, смывы, биопсийный материал;

Дифференцировка клеток — процесс приобретения клетками свойств и характеристик функционально зрелых клеток, относящихся к специализированному клеточному типу и обеспечивающих функции органов и тканей организма;

Клеточная линия – стандартизованная популяция клеток одного типа с воспроизводимым клеточным составом, полученная путем изъятия из организма человека биологического материала с последующим культивированием клеток вне организма человека;

ККК – Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИФА – иммунофлуоресцентный анализа;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СОП – стандартная операционная процедура;

УНУ – уникальная научная установка;

ФЗ – Федеральный закон;

ЦПЭ – цитопатический эффект;

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);

STR – short tandem repeat (короткое тандемное повторение);

WHO – World Health Organization (Всемирная организация здравоохранения, ВОЗ)

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

В условиях быстрого развития биологических и биомедицинских исследований, регенеративной биологии и медицины, клеточных, молекулярно-генетических исследований особое значение приобретает обеспечение научных исследований и разработок стандартизованными, охарактеризованными в соответствии с международными нормами клеточными культурами человека и животных. Также 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.

Общемировая практика создания и поддержания клеточных коллекций демонстрирует широкое распространение и масштабность имеющихся в мире подобных ресурсов. 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 von Mikroorganismen und Zellkulturen, в Японии – Riken BRC Cell Engineering Division – Cell Bank. Они насчитывают тысячи клеточных линий. Каждая клеточная линия 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.

Имеются сообщения о том, что порядка 15% всех клеточных линий, используемых мировым научным сообществом, неправильно идентифицировано в результате загрязнения или несовершенства методологии лабораторных исследований [1]. В результате использования ошибочно идентифицированных клеточных линий в научных работах ученые получают неверные данные, вынуждены публиковать опровержения опубликованных ранее изысканий и не могут повторно воспроизвести результаты исследований. Применение ошибочно идентифицированных клеточных линий приводит к нерациональному использованию ресурсов, направляемых на поддержку научных работ.

По данным ATCC, короткое тандемное повторное профилирование (Short Tandem Repeat profiling; STR-profiling) - быстрый, воспроизводимый метод, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР), который применяется для четкой идентификации и аутентификации человеческих клеточных линий с разрешением вплоть до отдельного донора. Это устоявшаяся техника, которая однозначно характеризует целый ряд различных локусов (местоположений гена) в геноме человека и позволяет получить эталонные электрофореграммы клеточных линий человека, по которым в дальнейшем идет идентификация имеющихся в различных коллекциях линий. С учетом того, что ошибочно идентифицируемые клеточные линии по-прежнему искажают исследования, идентификация клеточных линий человека посредством анализа STR-профиля становится требованием многих научных изданий при публикации научных материалов.

Поскольку STR-профилирование используется в основном только для клеточных линий человека, видовая идентификация линий животных практически всегда проводится при помощи кариологического анализа, позволяющего с помощью разных

дифференциальных окрасок хромосом определить видоспецифичность конкретной клеточной линии.

Исходя из специфичности кариологической характеристики (определенный спектр перестроенных хромосом или отсутствие таковых; модальное число хромосом, пределы изменчивости по числу хромосом, количество полиплоидов) каждой клеточной культуры, в ряде случаев кариологический анализ может помочь не только в видовой идентификации, но и в идентификации конкретной линии [2, 3].

Еще одной серьезной проблемой клеточных банков по всему миру является контаминация микоплазмами. Микоплазмы в клеточной культуре - не просто досадная помеха, а фактор, ведущий к ложной интерпретации результатов и возможной потере культуры. Микоплазмы способны изменять различные свойства культивируемых клеток. Природа воздействия микоплазм зависит от вида и штамма микоплазм, а также от типа инфицированных клеток. Особенности биологической и биохимической активности микоплазм разных видов определяют специфику их воздействия на инфицированные клетки, в том числе степень цитопатических эффектов (ЦПЭ). Для цитопатогенного действия микоплазм характерен очень широкий диапазон: от практически незаметных морфологических изменений клеток до явных картин конденсации хроматина, изменений морфологии хромосом, агрегации ядрышек и других проявлений апоптоза, вплоть до разрушения или полного лизиса клеток.

Прикрепление микоплазм к клетке хозяина может приводить к изменению или нарушению целостности ее мембраны [4]. Прикрепившись к клеточным мембранам, микоплазмы вызывают нарушения функционирования мембранных рецепторов. При этом микоплазмы высвобождают на клеточную мембрану токсичные ферменты и цитолитические метаболиты. Некоторые микоплазмы избирательно колонизируют районы клеточного монослоя, приводя к формированию микроколоний, микроповреждений, а также появлению небольших участков некроза. Микрокодонизация предполагает, что клетки с микоплазмспецифичными рецепторами локализованы в определенных районах клеточного монослоя. Однако некоторые микоплазмы (например, *Mycoplasma hyorhinis*) прикрепляются к каждой культивируемой клетке, вызывая ЦПЭ и разрушения всего монослоя. Причинами повреждающего действия микоплазм считаются конкуренция за компоненты питательной среды и индукция окислительного взрыва, сопровождающаяся гиперпродукцией активных форм кислорода [5], а также (в случае микоплазм, разлагающих аргинин) выделение ионов аммония.

Разные микоплазмы с разной степенью интенсивности потребляют глюкозу, аргинин, нуклеотиды и нуклеозиды, витамины и другие компоненты питательной среды. Даже

простое обеднение среды этими веществами должно влиять на метаболизм и функции культивируемых клеток, но в результате утилизации глюкозы или аргинина микоплазмами происходит еще и закисление или защелачивание среды, что приводит, как минимум, к угнетению роста культивируемых клеток.

Обладая активными нуклеазами, микоплазмы могут непосредственно вмешиваться в метаболизм нуклеиновых кислот эукариотной клетки. Так, для *M. orale* было показано, что концентрация дезоксиаденозина в среде значительно возрастала при заражении клеток этой микоплазмой. После утилизации микоплазмой дезоксиаденозин превращался в рибонуклеотид, который затем обнаруживали включенным в РНК [6].

In vitro микоплазмы способны вызывать кластогенный эффект, но попытки индуцировать образование опухолей у животных посредством инфицирования их микоплазмами оказались безуспешными. Более того, выяснилось, что микоплазмы могут ингибировать вирусную трансформацию в клеточных культурах, инфицированных известными онкогенными вирусами (например, *M. orale* подавляет вирусы саркомы Рауса и Раус-ассоциированные вирусы в культуре фибробластов эмбриона цыпленка).

Микоплазменные инфекции влияют на множество параметров клеток в культуре. В свою очередь и инфицированные клетки влияют на метаболизм микоплазм. Так, эукариотные клетки могут стимулировать устойчивость микоплазм к антибиотикам. Например, устойчивость микоплазм (*M. hominis*, *Acholeplasma laidlawii*) к фторхинолонам и тетрациклинам оказывается различной для микоплазм в аксеничных культурах и в сочетании с клетками HeLa. Предполагается, что в тандеме клетка-хозяин-микоплазма имеет место взаимопроникновение метаболических путей [7]. Следствием этого могут быть изменения уровня синтеза белков и РНК, состава клеточной мембраны (благодаря экспрессии рецепторов и других поверхностных антигенов клетки), появление хромосомных аббераций [8], индукция или активация экспрессии цитокинов, а также изменение пролиферационных параметров, вплоть до полной остановки деления клеток и гибели культуры.

В зависимости от условий культивирования, природы клеточной линии и вида микоплазмы все названные изменения клеточных культур проявляются в разной степени и могут приводить к ложной интерпретации результатов, получаемых при исследовании клеточных культур, инфицированных микоплазмами [9].

Деконтаминация – освобождение клеточных культур от микоплазм – представляет серьезную проблему. Сообщения о попытках деконтаминировать клеточные культуры известны, но большая их часть свидетельствует о неудачах [10]. Исследователи предпочитают ликвидировать контаминированные клетки. Применение антибиотиков

(тетрацилин, тилозин, канамицин, гентамицин), даже в очень высоких дозах и в различных сочетаниях часто оказывалось неэффективным [10].

Обработка клеточных культур смесью различных антибиотиков приводит к снижению уровня зараженности за пределы стандартного метода их выявления (окраска флуорохромами), но крайне редко обеспечивает удаление микоплазм полностью, так что через некоторое количество пассажей микоплазмы вновь выявляются. Резистентность микоплазм к антибиотикам является индуцибельной [7].

Периодически появляются сообщения об успехах применения антибиотиков в сочетании с обработкой иммунными сыворотками или смесями антибиотиков с последующим клонированием культивируемых клеток. Однако в результате клонирования (т.е. образования новой популяции от одной или небольшого количества клеток, которые удалось деконтаминировать) всегда сохраняется опасность того, что отобранные клоны генетически не будут полностью соответствовать исходной контаминированной линии.

Таким образом, очевидно, что при создании и поддержании клеточных банков, в том числе и Коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) ИБР РАН (ККК) в первую очередь необходимо заботиться об идентификации клеточных линий и проверке микоплазменной контаминации. Линии, содержащие микоплазму, либо неправильно определенные изначально, необходимо выбраковывать.

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

СОП «Идентификация клеточных линий человека и животных и определение их микробиологической чистоты» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса идентификации клеточных линий человека и животных, закладываемых на хранение в ККК ИБР РАН и для последующего распространения, и проверки отсутствия в них контаминации.

Цель разработки стандартной операционной процедуры (СОП) состоит в:

- Определении инфекционной чистоты клеточной линии в части заражения внутриклеточными инфекциями (микоплазмой);
- Кариотипировании клеточной линии;
- Проведения STR-профилирования линий человека.

Разработанный СОП рекомендован для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Правила лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н)
2. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартиформ. – 2010. – 12 с.

IV. КОНТРОЛЬ СОБЛЮДЕНИЯ СТАНДАРТА, ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

V. ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ И ПРОВЕРКА ИХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ

5.1 Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

5.1.1 Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

1. Стерилизатор воздушный MOV-112S (90 л) (Sanyo, Panasonic, Япония);
2. Автоклав лабораторный, горизонтальный, автоматический 3850E, 64 л (Tuttnauer, Израиль);
3. Лабораторная установка для получения дистиллированной воды GFL-2012 (GFL, Германия);

4. Оптический инвертированный микроскоп, просмотровый Olympus СКХ 31 (Olympus, Япония);
5. Прибор для автоматизированного подсчета клеток TC20 (Bio-Rad, США);
6. CO₂-инкубатор MCO 20-AIC (Sanyo, Panasonic, Япония);
7. Шкаф биологической безопасности Purifier Logic 2-го класса защиты с вертикальным воздушным потоком (Labconco, США);
8. Горелка автоматическая газовая Accu Phoenix (Schuett-biotec, Германия);
9. Термостат твердотельный "Термит" (Группа компаний «ДНК-Технология», Россия);
10. Вытяжка лабораторная химическая;
11. Автоматическое дозирующее устройство S-1 для пластиковых и стеклянных пипеток (Thermo Fisher Scientific, США);
12. Источник тока (Power Pac HC Biorad, США);
13. Холодильник Веко DNE45080 (Веко, Турция);
14. Комплект автоматических одноканальных дозаторов (пипеток) Eppendorf Research plus (3 штуки в комплекте – диапазон 0,5-10 мкл, диапазон 10-100 мкл, диапазон 100-1000 мкл) (Eppendorf, Германия);
15. Центрифуга CM64 (ELMI, Латвия);
16. Центрифуга Minispin (Eppendorf, Германия);
17. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США);
18. Комплект оборудования для электрофореза и блоттинга (Bio-Rad, США);
19. Система гель-документации ChemiDoc (Bio-Rad, США);
20. Инвертированный микроскоп IX51 с флуоресцентной лампой (Olympus, Япония);
21. Термостат ТС-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия);
22. Холодильник низкотемпературный DW-86L388 (Haier, Китай);
23. Криохранилище Locator 8 (Thermo Scientific, США);

24. Весы лабораторные Cubis (Sartorius, Германия)

5.1.2 Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов).

1. Посуда медицинская пластиковая для лабораторной диагностики и иммунологических исследований (Corning Inc., США);
2. Изделия из полимерных материалов для лабораторных исследований *in vitro* (Eppendorf AG, Германия);
3. Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные Science Purple Nitrile (Kimtech, США);
4. Стекла предметные (Menzel Glasser, Германия);
5. Стекла покровные (Menzel Glasser, Германия);
6. Питательная среда ДМЕМ (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
7. Раствор Хэнкса (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
8. FBS – сыворотка крови эмбриональная телячья (Gibco, Life Technologies, США);
9. Раствор трипсин/ЭДТА 0,25% или 0,05% (Gibco, Life Technologies, США);
10. Раствор Версена (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
11. Колцемид (Gibco, Life Technologies, США);
12. Флуоресцентный краситель хёхст – Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США);
13. Глицерин (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
14. PBS (phosphate buffer saline) – фосфатно-солевой буфер (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
15. Калия хлорид (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
16. DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, США);
17. 70%-ный этиловый спирт (Константа-Фарм М, Россия);
18. 96%-ный этиловый спирт любого производителя;

19. Метанол любого производителя;
20. Ледяная уксусная кислота (ООО "Русхимбио", Россия);
21. Краситель Гимза, концентрат (Merck, Германия);
22. Набор для экспресс-выделения ДНК «Экспресс-ДНК-Био» (Алкор Био, Россия);
23. Набор для выявления микоплазмы методом ПЦР MynoReport (Евроген, Россия);
24. Буфер для электрофореза трис-ацетатный ТАЕ (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
25. Агароза для электрофореза (Sigma-Aldrich, США);
26. Синтетическая монтирующая среда «Био маунт» (Bio-Optica, Италия);

5.2. Выявление контаминации микоплазмой

Наличие заражения микоплазмой нельзя определить с помощью обычной микроскопии, увидеть можно только ухудшение состояния культуры. Для детекции микоплазмы предлагается применение методов флуоресцентного окрашивания, ПЦР (полимеразной цепной реакции), ИФА (иммунофлуоресцентного анализа), иммуноокрашивания, автордиографии или микробиологические исследования. Нам представляется наиболее простым в применении метод флуоресцентного окрашивания ДНК красителями и использование специальных общедоступных наборов разных производителей для детекции на основе ПЦР.

5.2.1. Окрашивание флуорохромами.

Так как микоплазмы содержат ДНК, их легко обнаружить по характерным флуоресцирующим частицам или нитям на поверхности клеток и, в случае обширной контаминации, в межклеточном пространстве. Монослойные культуры клеток можно зафиксировать и окрасить непосредственно. При исследовании на микоплазму суспензионной культуры после центрифугирования суспензии культуральную среду добавляют к индикаторным клеткам (т.е. к монослойной культуре), гарантированно не зараженным микоплазмой, но являющимся легко восприимчивыми к микоплазме и хорошо распластанным, и инкубирует их в этой среде несколько суток [11]. Для этого подходят клетки линий Vero, 3T6, NRK, A549. Далее выявляют микоплазму стандартным методом для монослойных культур. Кроме того, методы, основанные на окрашивании ДНК, практически неприменимы к клеткам с относительно крупными ядрами и тонким "ободком" цитоплазмы

(например, лимфоцитам). Для их исследования также необходимо использовать индикаторные культуры.

При выявлении ДНК с помощью интеркалирующих флуорохромов чаще всего используют краситель бисбензимида (Hoechst 33258) [12] или краситель 4'-6-диамино-2-фенилидол (DAPI), реже – интеркалирующий антибиотик оливомицин (Михайлова и др., 1982). Эти флуоресцентные красители быстро связываются с ДНК, образуя стабильные комплексы.

Окраска Hoechst и оливомицином. Основной раствор Hoechst 33258 готовят растворением 0,5 мг реактива в 10 мл дистиллированной воды (срок хранения при +4 °С до года). Рабочий раствор готовится в растворе Хэнкса без индикатора в концентрации 0,05 мкг/мл непосредственно перед употреблением. Рабочий раствор оливомицина (20 мкг/мл) готовят на дистиллированной воде с добавлением 0,02 М Mg⁺⁺ (MgCl₂ или MgSO₄). При +4 °С раствор может храниться до полугода. Для окрашивания анализируемые клетки выращивают на покровных стеклах в течение 2-3 сут, трижды отмывают раствором Хэнкса или фосфатным буфером (рН 7.2), затем фиксируют в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1) при дальнейшем окрашивании Hoechst 33258 (в течение 10 мин), либо в 70%-ном этиловом спирте при дальнейшем окрашивании оливомицином (в течение 15-60 мин), подсушивают на воздухе, наносят каплю рабочего раствора красителя, оставляют при комнатной температуре в темноте. Время окрашивания рабочим раствором Hoechst 33258 10-15 мин, рабочим раствором оливомицина – 2 часа. После промывки дистиллированной водой покровные стекла монтируют на предметных в глицерине с дистиллированной водой (1:1) и просматривают под флуоресцентным микроскопом при увеличении ок. 10х, объектив 100х (масляная иммерсия).

Окраска DAPI. При этом методе можно окрашивать как фиксированные, так и живые клетки. Краска готовится на фосфатном буфере (рН 6,5—7,0) с концентрацией 50 мкг/мл и хранится при +4 °С полгода. Рабочий раствор готовится непосредственно перед использованием, концентрация 0,1 мкг/мл. При окраске живых клеток в пробирки со стеклами вносят 3 мл красителя, пробирки инкубируют 15-30 мин при +37 °С, затем дважды отмывают фосфатным буфером и просматривают во флуоресцентном микроскопе. Для фиксации используют 96%-ный этиловый спирт или смесь метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1). Длительность окраски такая же, как и для живых клеток. Как и при окраске Hoechst-33258, флуоресцируют и ядра, и микоплазмы, иногда заметно слабое свечение цитоплазмы.

В контаминированных культурах микоплазмы обнаруживаются в виде отдельных мелких (0,1-0,3 мкм диаметром) гранул, а также их скоплений, расположенных вне клеток

или на их поверхности. На препаратах клеток, свободных от микоплазм, наблюдается флуоресценция ядер, а цитоплазма почти не светится. Флуоресценция ДНК митохондрий в условиях окрашивания, рекомендуемых для выявления микоплазм, практически незаметна. При определенных навыках эти методы позволяют обнаруживать микоплазмы даже в случае сравнительно низкой множественности инфекции. Окраска флуорохромами оказывается особенно эффективной при уровне зараженности соответствующем 10⁵ микоплазм на 1 мл культуральной среды (и выше). Непосредственная подготовка препаратов занимает не более часа. Окраска флуорохромами рекомендуется как метод экспресс-диагностики микоплазменных заражений.

Недостатками метода являются неизбежная субъективность количественной оценки степени зараженности, а также возможность артефактов за счет флуоресценции обломков клеточных ядер и фонового свечения, которое оказывается особенно значительным при культивировании клеток в присутствии антибиотиков. А также при слабом уровне заражения не все клетки культуры могут быть инфицированы, поэтому необходимо просматривать как можно больше препаратов перед тем, как делать вывод, что культура неинфицирована.

5.2.2. Использование стандартных наборов реагентов на основе ПЦР.

ПЦР является очень чувствительным и специфичным методом для прямого определения микоплазмы в культуре клеток при низких затратах труда, времени и средств. Метод отличается простотой, объективностью интерпретации, воспроизводимостью и документальной обоснованностью результатов [13, 14].

Для определения контаминации микоплазмами клеточных линий можно использовать, например, набор реагентов MynoReport (Евроген). Данный набор позволяет выявить геномную ДНК шести наиболее распространенных видов микоплазмы и может применяться как для исследования культуральной жидкости, так и для анализа ДНК, выделенной из культуры клеток. ПЦР проводится по конечной точке, амплифицируются видоспецифичные участки 16S рРНК. Риск получения ложноположительных результатов снижен в результате применения в наборе урацил-ДНК-гликозилазы, риск ложноотрицательных результатов снижен благодаря выполнению реакции с внутренним контролем. К набору прилагается подробное описание проведения анализа.

Следует дополнительно выделять ДНК для дальнейшего исследования (например, с помощью набора «Экспресс-ДНК-Био» фирмы Алкор Био), что в протоколе не описано, но рекомендуется при ингибировании ПЦР. Для выделения ДНК действуют по инструкции производителя данного набора: отделяют клетки от среды путем центрифугирования (необходимо получить порядка 25000-50000 клеток), затем добавляют 50 мкл транспортного

раствора и 150 мкл лизирующего буфера из набора, инкубируют 10 мин при +95 °С, центрифугируют 10 мин при 13000 об/мин. В качестве матрицы для ПЦР используют 1 мкл супернатанта.

При использовании данного метода необходимо иметь в виду, что избыток ДНК в реакционной среде может приводить к ингибированию амплификации. Если реакция ПЦР не проходит, то можно попробовать уменьшить количество исследуемой ДНК.

5.3. Кариотипирование

5.3.1. Получение препаратов метафазных пластинок хромосом.

В среду для культивирования клеток добавляют колцемид, когда культура достигает примерно 70% конfluence (при этом необходимо убедиться, что культура содержит достаточное количество клеток в состоянии метафазы). Клетки инкубируют в CO₂ инкубаторе при +37 °С в присутствии 0,1 мкг/мл колцемида в течение 1 ч. Среду собирают в пробирку объемом 50 мл, клетки дважды промывают 5 мл раствора Версена, который также собирают в 50 мл пробирку. Клетки снимают с поверхности культурального флакона инкубированием с 0,05%-0,25% раствором трипсина в течение 5 мин при +37 °С, помещают в 50 мл пробирку с ранее собранной средой. Далее осаждают клетки центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5-10 мин, супернатант удаляют, клетки ресуспендируют в 10 мл холодного (+4 °С) гипотонического раствора хлорида калия (0,56%), инкубируют при комнатной температуре 10 мин, центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант удаляют, клетки ресуспендируют в остатках супернатанта, затем капают по каплям в пробирку с 10 мл холодного раствора фиксатора (-20 °С)*, состоящего из смеси метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1, перемешивают, инкубируют 10 мин при -20 °С. Далее осаждают при 1500 об/мин в течение 10 мин. Необходимо иметь в виду, что в фиксаторе клетки очень плохо держатся в осадке, поэтому нужно очень аккуратно переносить пробирку с клетками из центрифуги под вытяжку, иначе клетки можно растрясать и потерять, удалив вместе с супернатантом. Супернатант удаляется также очень осторожно одним движением. Затем проводят еще 2 смены фиксатора по 10 мин (то есть общее время нахождения клеток в фиксаторе составляет не менее 30 мин). Далее клетки ресуспендируют в 300 мкл фиксатора, раскапывают на незаряженные предметные стекла с высоты 15 см из расчета 40 мкл на стекло (стекла готовят заранее, перед приготовлением препарата стекла помещают в 40% раствор этанола). Препараты готовят с выжиганием (до того как фиксатор испарится, препараты поджигают и ждут полного выгорания фиксатора).

* Внимание! Работу с фиксатором необходимо проводить под вытяжкой.

5.3.2. Окрашивание хромосом.

Препараты инкубируют минимум 3-е суток при +37 °С (или ночь при +60 °С), затем обрабатывают 0,1% раствором трипсина в PBS в течение 20-60 с при комнатной температуре, промывают в течение 15 с в 1% растворе FBS в PBS и окрашивают раствором красителя Гимза в PBS в течение 30 мин. После этого споласкивают дистиллированной водой и высушивают. Необходимо иметь запас стекол с препаратом (5-6 штук), поскольку иногда необходимо подбирать условия окрашивания, т.е. время инкубации в растворе трипсина и время обработки раствором красителя.

Существует альтернативный метод дифференциального окрашивания препаратов флуоресцентными красителями, при котором хромосомные препараты обрабатывают флуоресцентными красителями 4,6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) и 7-амино-актиномицин D (7-AAD). Препараты окрашивают сначала раствором 7-AAD в концентрации 5 мкг/мл в течение 30 мин, после чего раствором DAPI в концентрации 5 мкг/мл еще 15 мин.

После высушивания препараты заключают под покровные стекла. Фотографии хромосомных препаратов получают с помощью обычного микроскопа (при окраске красителем Гимза) или флуоресцентного микроскопа (при окраске 7-AAD и DAPI).

5.4. STR-профилирование

Рекомендуется отдавать образцы клеточных линий на аутсорсинг. Так, в Москве существует несколько компаний, которые проводят данное исследование. Например, компании Гордиз (gordiz.ru) и Акрус (www.acrus.ru). Первая делает это с помощью своего набора COrDIS Plus для капиллярного электрофореза, а вторая – с помощью набора PowerPlex® 18D Kit (производства Promega). Анализ проводится по 17-20 маркерам, в том числе по рекомендованным 8 STR локусам стандарта ASN-0002 (ANSI/ATCC) и локусу амелогенина для половой идентификации человеческих линий. Отчет по исследованию включает все исходные данные, полученные электрофореграммы и список локусов, сравнение с базой данных ATCC. Для исследования требуется выделенная ДНК или клеточная масса.

VI. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке СОП «Идентификация клеточных линий человека и животных и определение их микробиологической чистоты» были использованы следующие литературные источники:

- 1 Masters J.R. Cell-line authentication: End the scandal of false cell lines. *Nature*. 2012. Vol. 492 (7428): 186.
- 2 Мамаева С.Е. Цитогенетика клеток в культуре / Биология клетки в культуре // Ленинград: издательство Наука, 1984. 279 стр.
- 3 Мамаева С.Е. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных // Москва: Научный мир, 2002. 236 стр.
- 4 Rottem S., Barile M. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol.* 1993. Vol. 11 (4): 143-151.
- 5 Kahane I. In vitro studies on the mechanism of adherence and pathogenicity of mycoplasmas. *Isr. J. Med. Sci.* 1984. Vol. 20 (9): 874-877.
- 6 McGarrity G.J., Vanaman V., Sarama J. Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures. *In Vitro*. 1984. Vol. 20 (1): 1-19.
- 7 Говорун В.М. Молекулярные механизмы формирования резистентности к тетрациклинам и фторхинолонам у молликут (диссертация на соискание степени доктора биологических наук) // Москва, 2000. 287 стр.
- 8 Полянская Г.Г. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных линиях (диссертация на соискание степени доктора биологических наук) // Санкт-Петербург, 2000. 300 стр.
- 9 McGarrity G.J., Kotani H., Burler H. Mycoplasmas and tissue culture cells / Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis // Washington: Eds J. Maniloff et. al., 1992. Pp. 445-456.
- 10 Schmidt J., Erfle V. Elimination of mycoplasma from cell cultures and establishment of mycoplasma-free cell lines. *Exp. Cell Res.* 1984. Vol. 152 (2): 565- 570.
- 11 Barile M.F., McGarrity G.J. Special techniques for isolation and identification of mycoplasmas from cell cultures / In: "Methods in Mycoplasmaology, Vol. II (Tully, J. G. and Razin, S., Eds.) // New York: Academic Press, 1983. Pp. 154-208.
- 12 Chen T.R. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Experimental Cell Research*. 1977. Vol. 104 (2): 255-262.
- 13 Harasawa R., Uemori T., Asada K., Kato I. Sensitive Detection of Mycoplasmas in Cell Cultures by Using Two-Step Polymerase Chain Reaction. In: *Rapid Diagnosis of Mycoplasmas / Federation of European Microbiological Societies Symposium Series*. Vol. 62 // Boston, MA: Springer, 1993.
- 14 Uphoff C.C., Drexler H.G. Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis. *Hum Cell*. 1999. Vol. 12 (4): 229-236.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Стандартная операционная процедура «Характеристика клеточных линий человека и животных»

Составлено: Е.В. Алпеева, к.б.н., н.с.

Содержание и назначение: Определяет порядок характеристики вновь поступающих и имеющихся в коллекции клеточных линий, может быть применена для целей инвентаризации

Местонахождение: ИБР РАН

Пересмотр через: 1 год

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

IV. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА (КОНТРОЛЬ СОБЛЮДЕНИЯ СТАНДАРТА, ОТВЕТСТВЕННОСТЬ)

V. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

5.1 Оборудование и материалы

5.2 Построение кривых роста и вычисление времени удвоения популяции (ВУП)

5.3 Определение экспрессии маркеров при помощи иммуноцитохимического анализа

5.4 Иммуногистохимия

5.5 Подтверждение плюрипотентности (на примере линии ИПСК-ДП)

VI. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Биологический материал – биологические жидкости, ткани, клетки, секреты и продукты жизнедеятельности человека, физиологические и патологические выделения, мазки, соскобы, смывы, биопсийный материал;

Дифференцировка клеток — процесс приобретения клетками свойств и характеристик функционально зрелых клеток, относящихся к специализированному клеточному типу и обеспечивающих функции органов и тканей организма;

Клеточная линия – стандартизованная популяция клеток одного типа с воспроизводимым клеточным составом, полученная путем изъятия из организма человека биологического материала с последующим культивированием клеток вне организма человека;

ККК – Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДП – дермальная папилла;

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки;

ИФА – иммунофлуоресцентный анализа;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СОП – стандартная операционная процедура;

УНУ – уникальная научная установка;

ФАНО – Федеральное агентство научных организаций;

ФЗ – Федеральный закон;

ЦКП – центр коллективного пользования;

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);

STR – short tandem repeat (короткое тандемное повторение);

WHO – World Health Organization (Всемирная организация здравоохранения, ВОЗ)

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

В условиях быстрого развития биологических и биомедицинских исследований, регенеративной биологии и медицины, клеточных, молекулярно-генетических исследований особое значение приобретает обеспечение научных исследований и разработок стандартизованными, охарактеризованными в соответствии с международными нормами клеточными культурами человека и животных [1]. Также 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 [2], не содержит микробиологической контаминации и даст при правильных условиях транспортировки, размораживания и культивирования жизнеспособную линию.

Общемировая практика создания и поддержания клеточных коллекций демонстрирует широкое распространение и масштабность имеющихся в мире подобных ресурсов. 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 von Mikroorganismen und Zellkulturen, в Японии – Riken BRC Cell Engineering Division – Cell Bank. Они насчитывают тысячи клеточных линий. Каждая клеточная линия идентифицируется с применением современных методов, и на каждую заводится паспорт клеточной линии. Поскольку идентификация и описание клеточных линий осуществляются в соответствии с принятыми стандартами GLP [3], требованиями WHO [4], FDA и локальных органов, данные линии могут использоваться в научных и клинических целях.

«Коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) (ККК)» на базе Центра коллективного пользования (ЦКП) по биологии развития на основе использования клеточных технологий и оптических методов исследований ОБН РАН при ИБР РАН имеет официальный статус с 2016 г. и зарегистрирована в форме Уникальной научной установки (УНУ) в 2017 г. Коллекция клеточных культур как УНУ оптимально встраивается в инфраструктуру ЦКП ИБР РАН, позволяя использовать и развивать коллекционный фонд не только для решения собственных исследовательских задач, но и для научно-практических и образовательных проектов с внешними партнерами.

ККК ИБР РАН содержит широкий спектр клеточных линий (более 80): постнатальные эпителиальные и мезенхимные клетки человека и животных, тканеспецифичные стволовые клетки человека и животных, эмбриональные стволовые клетки человека и животных, клетки с индуцированной плюрипотентностью человека от здоровых людей [5] и людей с генетическими отклонениями, постоянные линии клеток человека и животных, трансфицированные и трансгенные линии. На сайте ИБР РАН можно найти каталог линий, а также различные документы Коллекции (регламент и положение, типовый договор на

оказание услуг и передачу линий и т.д.). Также ККК УНУ ИБР РАН с 2016 года зарегистрирована на официальном сайте ЦКП Министерства образования РФ: http://www.ckp-rf.ru/ckp/services/?SECTION_ID=435&ELEMENT_ID=504840.

Многие клеточные линии ККК ИБР РАН являются уникальными (например, ИПСК, полученные от пациентов с синдромом Дауна), при этом Коллекция содержит ряд широко известных постоянных линий (HaCaT, HeLa), востребованных для проведения различных работ в области клеточной биологии, регенерации, молекулярной биологии. С использованием материалов Коллекции за последние годы опубликовано несколько десятков статей, а также получено восемь патентов.

В связи с тем, что практический интерес к ККК появился совсем недавно, благодаря программе ФАНО по развитию Биоресурсных коллекций, в настоящее время ведется активная работа по приведению Коллекции в соответствие с международными стандартами, указанными выше. Первостепенной задачей является паспортизация всех клеточных линий, находящихся в коллекции. Для этого необходимо, помимо идентификации и проверки микробиологической чистоты, охарактеризовать линии, т.е. описать их свойства с помощью определенного для линий каждой группы набора современных методов.

Унификация требований к депонируемым клеточным культурам является необходимым и обязательным элементом каждой клеточной коллекции, в том числе ККК ИБР РАН.

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

СОП «Характеристика клеточных линий человека и животных» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса характеристики (и паспортизации) клеточных линий человека и животных, уже имеющих в ККК и впервые закладываемых на хранение в Коллекцию, для последующего распространения.

Цель разработки стандартной операционной процедуры (СОП) состоит в:

- Определении параметров роста клеточной линии;
- Определении плюрипотентного статуса клеточной линии (для плюрипотентных клеток);
- Характеристике фенотипа клеточной линии, в том числе соответствие эталонному фенотипу;

Разработанный СОП рекомендован для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Правила лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н)
2. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ. – 2010. – 12 с.

IV. КОНТРОЛЬ СОБЛЮДЕНИЯ СТАНДАРТА, ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

V. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

5.1 Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов операционной:

5.1.1 Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

1. Стерилизатор воздушный MOV-112S (90 л) (Sanyo, Panasonic, Япония);
2. Автоклав лабораторный, горизонтальный, автоматический 3850E, 64 л (Tuttnauer, Израиль);
3. Лабораторная установка для получения дистиллированной воды GFL-2012 (GFL, Германия);
4. Оптический инвертированный микроскоп, просмотровый Olympus CKX 31 (Olympus, Япония);

5. Прибор для автоматизированного подсчета клеток TC20 (Bio-Rad, США);
6. CO₂-инкубатор MCO 20-AIC (Sanyo, Panasonic, Япония);
7. Инкубатор мультигазовый MCO-19M (Sanyo, Panasonic, Япония);
8. Шкаф биологической безопасности Purifier Logic 2-го класса защиты с вертикальным воздушным потоком (Labconco, США);
9. Горелка автоматическая газовая Accu Phoenix (Schuett-biotec, Германия);
10. Автоматическое дозирующее устройство S-1 для пластиковых и стеклянных пипеток (Thermo Fisher Scientific, США);
11. Источник тока (Power Pac HC Biorad, США);
12. Холодильник Веко DNE45080 (Веко, Турция);
13. Комплект автоматических одноканальных дозаторов (пипеток) Eppendorf Research plus (3 штуки в комплекте – диапазон 0,5-10 мкл, диапазон 10-100 мкл, диапазон 100-1000 мкл) (Eppendorf, Германия);
14. Центрифуга CM64 (ELMI, Латвия);
15. Центрифуга Minispin (Eppendorf, Германия);
16. Микроволновая печь бытовая любого производителя;
17. Термостат твердотельный "Термит" (Группа компаний «ДНК-Технология», Россия);
18. Криотом Криостат CM 1900 (Leica, Германия);
19. Инвертированный микроскоп IX51 с флуоресцентной лампой и цифровой камерой DP-70 (Olympus, Япония);
20. Термостат ТС-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия);
21. Холодильник низкотемпературный DW-86L388 (Haier, Китай);
22. Криохранилище Locator 8 (Thermo Scientific, США);
23. Микротом HM 430 (Microm, Германия);
24. Нагревательный столик для сушки парафиновых срезов HI 1220 (Leica, Германия);

25. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США);
26. Комплект оборудования для электрофореза и блоттинга (Bio-Rad, США);
27. Система гель-документации ChemiDoc (Bio-Rad, США);
28. Лабораторные весы LA-60 (ACCULAB, Германия).

5.1.2. Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов).

1. Посуда медицинская пластиковая для лабораторной диагностики и иммунологических исследований (Corning Inc., США);
2. Изделия из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro (Eppendorf AG, Германия);
3. Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные Science Purple Nitrile (Kimtech, США);
4. Иглы для мезотерапии (Meso-relle, Biotekle SRK, Италия);
5. Инсулиновые шприцы Micro-Fine Plus (Becton, Dickinson and Company, США);
6. Ножницы хирургические (ОАО «Медико-инструментальный завод им. М.Горького», Россия);
7. Пинцет тканевый (ОАО «Медико-инструментальный завод им. М.Горького», Россия);
8. Стекла для криосрезов (Thermo scientific, США);
9. Стекла предметные (Menzel Glasser, Германия);
10. Стекла покровные (Menzel Glasser, Германия);
11. Парафильм (Pechiney, США);
12. Питательная среда ДМЕМ (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
13. Сыворотка крови эмбриональная телячья, FBS (Gibco, Life Technologies, США);
14. Раствор трипсин/ЭДТА 0,25% или 0,05% (Gibco, Life Technologies, США);
15. Питательная среда ДМЕМ/F12 (1:1) (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);

16. Диспаза (Gibco, Life Technologies, США);
17. Питательная среда DMEM (STEMCELL Technologies, Канада);
18. Среда AggreWell™ (STEMCELL Technologies, Канада);
19. KSR - KnockOut™ Serum Replacement – нокаутная замена сыворотки (Gibco, Life Technologies, США);
20. NEAA - Non-Essential Amino Acid, добавка незаменимых аминокислот (Gibco, Life Technologies, США);
21. GlutaMAX – добавка, аналогичная L-глутамину (Gibco, Life Technologies, США);
22. ROCK Inhibitor – ингибитор Rho-ассоциированной протеин киназы (Sigma-Aldrich, США);
23. PBS (phosphate buffer saline) – фосфатно-солевой буфер (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
24. ПФА – параформальдегид (Bio-Optica, Италия);
25. Цитратный буфер (Panreac-AppliChem, США);
26. Буфер для электрофореза трис-боратный TBE (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
27. Пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (ПанЭко, Россия);
28. CHAPS - 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (Sigma-Aldrich, США);
29. Ингибитор РНКаз РНазин (Sileks, Германия);
30. Раствор бромистого этидия (Helicon, Россия);
31. DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, США);
32. Dako REAL™ EnVision™ Detection System (K5007) (Дакко, Дания);
33. Среда для оптимальной резки криоблоков Tissue-Tek® OCT™ Compound (Sakura Fineter, Нидерланды);

34. Набор для определения наличия теломеразы TRAPEZE® XL Telomerase Detection Kit (Millipore, США);
35. Полимераза Encyclo (Евроген, Россия);
36. 96%-ный этиловый спирт любого производителя;
37. Парафиновая среда Гистомикс (Biovitrum, Россия);
38. Синтетическая монтирующая среда Bio Mount (Bio-Optica, Италия);
39. Эозин (Biovitrum, Россия);
40. Гематоксилин Майера (Biovitrum, Россия);
41. Перекись водорода 30% (Sigma-Aldrich, США);
42. Бычий сывороточный альбумин (БСА) (BioWest, Ирландия);
43. Triton X-100 (AppliChem, Германия);
44. Tween 20 (AppliChem, Германия);
45. Вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 488, 594 (Molecular Probes, США);

5.2. Построение кривых роста и вычисление времени удвоения популяции (ВУП) [5]

После субкультивирования клетки развиваются по определенной схеме, проходя через этапы lag-фазы, экспоненциальной, или log-фазы, и стационарной, или фазы плато. Построение кривой роста клеточной культуры дает возможность вычисления ВУП при использовании участка графика, который представляет собой экспоненциальную фазу. Значение ВУП варьирует от 12-15 ч в быстрорастущей культуре до 24-36 ч во многих прикрепленных постоянных клеточных линиях и даже до 60-72 ч в медленно растущих конечных клеточных линиях. Поэтому для получения кривой роста для быстрорастущих клеточных линий при начале культивирования следует выбрать клеточную концентрацию 2×10^4 кл./мл, для медленно растущих – 1×10^5 кл./мл. Последующее повторение кривой роста с более высокой и более низкой посевной концентрацией позволит скорректировать величину посевной концентрации и установить интервал субкультивирования.

Трипсинизировать клетки на стадии log-фазы, как при обычном субкультивировании, и посеять несколько 12-ти луночных планшетов по 2 мл клеточной суспензии с необходимой концентрацией клеток в зависимости от предполагаемой скорости роста популяции (смотри

выше). Необходимо добавлять клеточную суспензию медленно от центра ячейки, что позволит избежать ее завихрения по стенкам лунок, а также избегать встряхивания планшетов. Поместить планшеты во влажный CO₂ инкубатор. Каждые 24 часа доставать планшет (сначала первый, потом последующие) и подсчитывать количество клеток в 3-х лунках. Для этого полностью удалить из них среду, добавить 0,5 мл смеси трипсина (неочищенного, 0,25%) с 10 мМ EDTA в каждую, инкубировать планшет 15 мин. Далее добавить 0,5 мл среды (с 26 мМ NaHCO₃) с сывороткой, диспергировать клетки, перенести 0,4 мл суспензии в 19,6 мл PBS и подсчитать в автоматическом счетчике клеток. После 3-х суток культивирования необходимо продолжать отбор образцов быстрорастущих культур каждые 2 ч, а медленно растущих – каждые 48 часов, пока не будет достигнута фаза плато. Необходимо периодически менять среду в оставшихся лунках по мере падения в ней значения pH. По результатам измерений построить график зависимости клеточной плотности (кл./мл) от времени (сутки) и определить с помощью него время lag-фазы и ВУП.

5.3. Определение экспрессии маркеров при помощи иммуноцитохимического анализа

Для иммунофлуоресцентного анализа клетки промыть от среды PBS и произвести фиксацию в растворе 4 % параформальдегида в PBS 10-15 мин. Затем отмыть PBS 3 раза по 5 мин и инкубировать в растворе PBS с 10% FBS, 0,1% Triton X-100, 0,01% Tween 20 в течение 30-60 мин для пермеабилзации мембран и блокировки неспецифического связывания антител. После этого инкубировать ночь при +4 °C с растворами первичных антител в PBS с 5% FBS. Отмыть 3 раза по 5 мин в PBS с 0,01% Tween 20 и инкубировать со вторичными антителами Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 или Texas Red 1 час при комнатной температуре. Снова отмыть в PBS с 0,01% Tween 20 и обработать 0,1 мкг/мл DAPI в PBS 10 мин при комнатной температуре. После стандартной отмывки 3 раза по 5 мин в PBS с 0,01% Tween 20 окрашенные флуоресцентной меткой препараты анализировать с помощью флуоресцентного микроскопа.

5.4. Подтверждение плюрипотентности

(на примере линии ИПСК-ДП) [6, 7]

5.4.1. Тест на тератообразование для подтверждения плюрипотентности (для стволовых клеток и ИПСК).

Для проверки плюрипотентного статуса ИПСК проводят стандартный *in vivo* тест на образование тератом [8]. Около 5 млн. клеток инъецируют подкожно в бедренную область

иммунодефицитным мышам линии Nude. Спустя 6-7 недель наблюдают образование опухоли в месте инъекции клеток. Умерщвляют мышей, хирургическими ножницами вырезают опухоль, фиксируют ее в 10% ПФА, заключают в парафиновые блоки и на микротоме получают срезы толщиной 5-7 мкм, которые наслаивают на положительно заряженные предметные стекла. Для части срезов проводят иммуногистохимический анализ, а другую часть окрашивают гематоксилином – эозином и проводят гистологический анализ тканей под микроскопом.

Иммуногистохимия. Демаскировку антигенов проводят обработкой в цитратном буфере pH = 6,0 в течение 5-9 мин в микроволновой печи при 690 Вт. Промывают несколько раз в воде и блокируют эндогенную пероксидазу инкубацией в 3% растворе пероксида водорода в течение 15 мин. Отмывают в PBS 2 раза по 5 мин. Блокируют неспецифическое связывание антител р-ром 1% бычьего сывороточного альбумина в течение 20 мин при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами проводят ночь при +4 °С. После отмывки от излишка антител срезы обрабатывают вторичными антителами Dako REAL™ EnVision™ Detection System (K5007). Заключенные в Bio Mount препараты анализируют при помощи флуоресцентного микроскопа.

5.4.2. Получение и культивирование эмбрионидных телец для подтверждения плюрипотентности (на примере линии ИПСК-ДП).

Колонии плюрипотентных стволовых клеток снять с подложки с помощью 1 мг/мл диспазы в DMEM. Клетки отмыть от фермента центрифугированием в избытке PBS 5 мин при 900 об/мин. Осадок диссоциировать на небольшие агрегаты пипетированием в среде AggreWell™, либо в DMEM/F12, содержащей 20% KSR, 1x NEAA, 1x GlutaMAX, пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл). Эмбрионидные тельца формируются в висячей капле в течение примерно трех суток при добавлении к среде 10 мкМ Y-27632 ROCK Inhibitor для выживаемости единичных клеток и улучшения агрегации. После этого эмбрионидные тельца переносят и растят в суспензии без прикрепления клеток к пластику в Ultra Low Adhesion Plates. Смену среды необходимо производить каждый день.

Приготовление срезов эмбрионидных телец и их окрашивание. Эмбрионидные тельца промыть в PBS. Фиксировать в 3% ПФА в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре, затем инкубировать в 15% растворе сахарозы в PBS в течение 3 ч при комнатной температуре. Избыток жидкости можно удалить с помощью кратковременного контакта капли с осадком с фильтровальной бумагой. Заключить эмбрионидные тельца в Tissue-Tek® OCT™ Compound и замораживать в парах жидкого азота в течение 3-5 мин. Затем получают

срезы толщиной 7,5 мкм на криотоме и наслаивают на положительно-заряженные предметные стекла. Для блокирования неспецифического связывания срезы инкубируют с антителами, как описано выше.

5.4.3. Тест на активность теломеразы в ИПСК (для подтверждения репрограммирования до плюрипотентного состояния, при котором происходит реактивация теломеразы).

Проверку наличия теломеразы в клетках можно провести с помощью TRAPEZE® XL Telomerase Detection Kit, в качестве фермента для ПЦР-реакции использовать полимеразу Encyclo. С помощью данного набора определяют наличие или отсутствие теломеразной активности TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) в исследуемых культурах клеток. Принцип реакции заключается в том, что на первой стадии (Telomerase Extension) активная теломераза добавляет большое количество теломерных повторов (GGTTAG) к 3'-концу праймер-субстрата (TS), то есть происходит его удлинение; на следующей стадии удлиненные продукты подвергаются амплификации Taq полимеразой с помощью ПЦР. В результате на электрофореze, в случае положительного сигнала, в геле можно увидеть «лестницу», когда продукты разделяются на 6 пар оснований: 61 п.о., 67 п.о., 73 п.о., 79 п.о. и т.д.

Примерно 0,5 млн. клеток лизируют в 200 мкл лизирующий буфер с CHAPS с 100 ЕД/мл ингибитором РНКаз, после чего инкубируют суспензию на льду 30 мин. Центрифугируют лизат при 13000 об/мин в течение 20 мин при +4 °С. Далее отбирают 160 мкл надосадочной жидкости, которые разаликвочивают и хранят при -70 °С или используют сразу. Замороженный экстракт стабилен в течение года, если не допускать повторных циклов замораживания-оттаивания. Для отрицательного контроля отбирают по 10 мкл образца и инактивируют теломеразу нагреванием до +85 °С в течение 10 мин. Для одной TRAP реакции объемом 20 мкл смешивают 2 мкл клеточного экстракта, 4 мкл 5x TRAPEZE XL Reaction Kit, 0,4 мкл 50x полимеразы Encyclo и 13,6 мкл деионизованной очищенной воды в ПЦР-пробирках на 200 мкл. Смесь инкубируют при +30 °С в течение 35 мин в ПЦР-амплификаторе – это первая стадия. Для осуществления второй стадии выставляют следующие параметры ПЦР: 30 с при +95 °С, 30 с при +59 °С, 1 мин при +72 °С, количество циклов = 36; затем 3 мин при +72 °С и 25 мин при +55 °С. Продукты реакции хранят при -20 °С. Результаты TRAP реакции выявляют при помощи разделения продуктов амплификации в 15% полиакриламидном гель-электрофореze в 0,5x трис-боратном буфере при 70 В. Гель окрашивают бромистым этидием в концентрации 0,5 мкг/мкл в 0,5x трис-боратном буфере в течение 5 мин при покачивании. Визуализацию проводят с помощью УФ-анализатора гелей.

VI. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий человека и животных» были использованы следующие литературные источники:

1. Дьяконов Л.П. Коллекции клеточных культур – фундаментальная основа научных исследований по биологии клетки и биотехнологии. Ветеринарная патология. 2003. Том 1: 10-20.
2. Masters J.R. Cell-line authentication: End the scandal of false cell lines. *Nature*. 2012. Vol. 492 (7428): 186.
3. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004, Good Laboratory Practice (GLP).
4. WHO: Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks // Geneva: WHO Press, 2010. 94 p.
5. Freshney R. Ian. *The Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (6th Edition)* // New-York: John Wiley & Sons, Inc., 2010. 734 p.
6. Мучкаева И.А., Дашинимаев Э.Б., Артюхов А.С., Мягкова Е.П., Воротеляк Е.А., Егоров Е.Е., Вишнякова Х.С., Кравченко Ю.Е., Чумаков С.П., Терских В.В., Васильев А.В. Репрограммирование клеток дермальной папиллы человека до плюрипотентного состояния. *Acta Naturae*. 2014. Том 6 (1): 48-57.
7. Шутова М.В., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А., Киселев С.Л. Получение и характеристика клеток с индуцированной плюрипотентностью. *Acta Naturae*. 2012. Том 1 (2): 104-106.
8. Gutierrez-Aranda I., Ramos-Mejia V., Bueno C., Munoz-Lopez M., Real P.J., Mácia A., Sanchez L., Ligeró G., Garcia-Perez J.L., Menendez P. Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells*. 2010. V 28 (9): 1568-1570.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Стандартная операционная процедура «Порядок пополнения Коллекции клеточных культур»

Составлено: Е.В. Алпеева, к.б.н., н.с.

Содержание и назначение: Определяет порядок пополнения Коллекции клеточных культур путем получения новых клеточных линий, может быть применена для целей инвентаризации

Местонахождение: ИБР РАН

Пересмотр через: 1 год

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

IV. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА (КОНТРОЛЬ СОБЛЮДЕНИЯ СТАНДАРТА, ОТВЕТСТВЕННОСТЬ)

V. ПОПОЛНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

5.1. Оборудование и материалы

5.2. Выделение эмбриональных фибробластов мыши

5.3. Выделение дермальных фибробластов человека

5.4. Выделение клеток дермальной папиллы человека

5.5. Получение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека

5.6. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека путем репрограммирования клеток дермальной папиллы и 1608hT

VI. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Биологический материал – биологические жидкости, ткани, клетки, секреты и продукты жизнедеятельности человека, физиологические и патологические выделения, мазки, соскобы, смывы, биопсийный материал;

Дифференцировка клеток — процесс приобретения клетками свойств и характеристик функционально зрелых клеток, относящихся к специализированному клеточному типу и обеспечивающих функции органов и тканей организма;

Клеточная линия – стандартизованная популяция клеток одного типа с воспроизводимым клеточным составом, полученная путем изъятия из организма биологического материала с последующим культивированием клеток вне организма;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДП – дермальная папилла;

иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки;

ККК – «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» ИБР РАН;

ММСК ЖТ – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки жировой ткани;

СОП – стандартная операционная процедура;

ССФ – стромально-сосудистая фракция;

УНУ – уникальная научная установка;

ФЗ – Федеральный закон;

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки;

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);

WHO – World Health Organization (Всемирная организация здравоохранения, ВОЗ)

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

В условиях быстрого развития биологических и биомедицинских исследований, регенеративной биологии и медицины, клеточных, молекулярно-генетических исследований особое значение приобретает обеспечение научных исследований и разработок стандартизованными, охарактеризованными в соответствии с международными нормами клеточными культурами человека и животных [1]. Также 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.

Общемировая практика создания и поддержания клеточных коллекций демонстрирует широкое распространение и масштабность имеющихся в мире подобных ресурсов. 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 von Mikroorganismen und Zellkulturen, в Японии – Riken BRC Cell Engineering Division – Cell Bank. Они насчитывают тысячи клеточных линий. Каждая клеточная линия идентифицируется с применением современных методов, и на каждую заводится паспорт. Поскольку идентификация и описание клеточных линий осуществляются в соответствии с принятыми стандартами GLP [2], требованиями WHO, FDA и локальных органов, данные линии могут использоваться в научных и клинических целях.

На данный момент количество и разнообразие линий, депонированных в РФ, значительно меньше, чем в Европе и Америке (см. Таблицу Д.1).

Таблица Д.1. Сравнение количества линий, депонированных Европейской коллекцией (ECACC) и суммарно ведущими коллекциями РФ.

| Группа клеточных линий | ЕСАСС | Коллекции РФ |
|--|--|--|
| основная коллекция | 1100 различных клеточных линий, полученных от 45 видов организмов и представляющие широкий спектр тканей | менее 400 (ок. 150 линий человека, ок. 200 – животных) |
| от больных наследственными заболеваниями | более 2400 (представляют ок. 150 заболеваний) | 350 |
| индуцированные плюрипотентные стволовые | 1000 | 20 |

| | | |
|--|------------|-----------|
| клетки человека | | |
| В-лимфобластные клеточные линии (референсные) | более 1000 | нет |
| гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела | 400 | более 500 |

Одним из важных факторов, обуславливающим необходимость развития Российской коллекции клеточных культур, помимо отставания российских коллекций по количеству образцов хранения от мировых, является развитие совершенно новых технологий клеточной биологии, включая технологии, основанные на использовании плюрипотентных клеток и редактировании генома. Из Таблицы 1 видно, что в российских коллекциях линий данного вида клеток очень мало.

Таким образом, становится очевидной необходимость поддержания и развития национальной Коллекции клеточных культур, отвечающей современным требованиям и стандартам, частью которой является «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» ИБР РАН (ККК).

Развитие Российской коллекции клеточных культур, а именно, увеличение количества и разнообразия депонированных в ней клеточных линий, возможно путем приобретения клеточных линий в других коллекциях за рубежом и за счет получения новых линий в локальных коллекциях. Однако нами было установлено, что крупнейшие коллекции (ATCC, ECACC, Riken) не продают клеточные линии с целью их дальнейшего распространения. Таким образом, пополнение коллекционных фондов РФ возможно практически только за счет получения новых линий в наших лабораториях.

В связи с тем, что иПСК и ММСК ЖТ человека рассматриваются в настоящее время в качестве перспективного инструмента клеточной терапии, моделирования болезней, скрининга лекарственных средств, проверки токсичности различных препаратов [3], получение различных линий данных стволовых клеток является актуальной задачей для ККК ИБР РАН.

Перспективы использования иПСК в терапии.

Трансплантация аллогенных органов связана с рядом проблем, таких как ограниченная приживляемость тканей и необходимость применения иммуносупрессоров.

Считается, что при помощи репрограммирования собственных клеток больного можно преодолеть эти проблемы, благодаря генетической идентичности пересаживаемых реципиенту клеток. Другое несомненное преимущество предлагаемой техники перед существующими трансплантационными методами – потенциальная возможность исследования и исправления патологических мутаций в клетках *in vitro*. Так, на мышинной модели осуществлена успешная коррекция серповидно-клеточной анемии при помощи iPСК [4]. В работе наблюдали образование нормальных эритроцитов из кроветворных клеток-предшественников, полученных из полностью репрограммированных клеток кожи. В исследовании Kroche с соавт. говорится о перспективах аутологичных трансплантатов ретинального пигментного эпителия, полученных при дифференцировке iPСК пациента.

Изучение и лечение многих заболеваний, таких, как сахарный диабет типа 1, болезни Паркинсона и Альцгеймера, патологии печени и др., проблематичны как из-за труднодоступности поврежденного органа и, как следствие, сложностей при поиске донорской ткани, так и из-за отсутствия способов длительного культивирования клеток соответствующих типов. При моделировании подобных заболеваний можно получать аутологичные iPСК, направлять их дифференцировку в культуре в клетки нужного типа для получения адекватных тест-систем скрининга лекарственных средств. Одной из проблем, связанных с изучением дегенеративных патологий, является недостаток клеточных материалов от пациентов с поздними стадиями развития заболевания. Так как iPСК, вероятно, должны *in vitro* пройти те же этапы дифференцировки, как и клетки реципиента до их «заболевания» *in vivo*, данная технология может позволить изучить ранние стадии конкретной болезни. В данной области ведутся интенсивные работы, и в некоторых лабораториях уже получены iPСК от больных, страдающих болезнью Гентингтона, серповидно-клеточной анемией, мышечной дистрофией, синдромом Дауна и др. [5-9].

Получение и перспективы применения ММСК ЖТ для регенеративной медицины.

ММСК ЖТ – основные клетки стромально-сосудистой фракции жировой ткани человека, обеспечивающие архитектонику и состав внеклеточного матрикса ткани. Впервые метод выделения мезенхимных стромальных клеток жировой ткани был описан в 1960-х годах: используя комбинации различных методов, удалось разделить зрелые адипоциты от более плотной клеточной фракции, которую назвали стромально-сосудистая фракция (ССФ) [10, 11]. Оказалось, что ССФ гетерогенна и представлена различными типами клеток, в том числе фибробластами, перицитами, эндотелиальными клетками и преадипоцитами. Позднее были получены культуры из ССФ и было показано, что клетки ССФ способны дифференцироваться в зрелые адипоциты [12-14]. В 2001 году впервые было показано, что

клетки, полученные из жировой ткани человека, обладают множественными потенциальными возможностями дифференцировки и способны дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном, остеогенном и миогенном направлениях *in vitro*, что предполагает наличие в ССФ жировой ткани не только предшественников адипоцитов, но и мультипотентных стволовых клеток [15-17].

При культивировании в стандартных условиях ММСК ЖТ имеют фибробластоподобную морфологию. Состав среды культивирования и плотность посева культуры могут влиять на фенотип и дифференцировку ММСК ЖТ. В настоящее время иммунофенотип поверхности ММСК ЖТ исследован разными независимыми лабораторными группами.

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

СОП «Порядок пополнения Коллекции клеточных культур» разработан в качестве стандарта для получения новых клеточных линий мышечных эмбриональных фибробластов, фибробластов и клеток дермальной папиллы человека, ИПСК и ММСК ЖТ человека от различных доноров для расширения ККК ИБР РАН с целью дальнейшей передачи данных линий (после их характеристики и проверки микробиологической чистоты) для изучения свойств и применения в различных научных и экспериментальных медицинских учреждениях, в том числе и в организации – держателе ККК.

Разработанный СОП рекомендован для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Правила лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н)
2. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ. – 2010. – 12 с.

IV. КОНТРОЛЬ СОБЛЮДЕНИЯ СТАНДАРТА, ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

V. ПОПОЛНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

5.1 Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

5.1.1 Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

1. Стерилизатор суховоздушный MOV-112S (90 л) (Sanyo, Panasonic, Япония);
2. Автоклав лабораторный, горизонтальный, автоматический 3850E, 64 л (Tuttnauer, Израиль);
3. Лабораторная установка для получения дистиллированной воды GFL-2012 (GFL, Германия);
4. Оптический инвертированный микроскоп, просмотрный Olympus CKX 31 (Olympus, Япония);
5. Прибор для автоматизированного подсчета клеток TC20 (Bio-Rad, США);
6. CO₂-инкубатор MCO 20-AIC (Sanyo, Panasonic, Япония);
7. Инкубатор мультигазовый MCO-19M (Sanyo, Panasonic, Япония);
8. Шкаф биологической безопасности Purifier Logic 2-го класса защиты с вертикальным воздушным потоком (Labconco, США);
9. Горелка автоматическая газовая Accu Phoenix (Schuett-biotec, Германия);
10. Автоматическое дозирующее устройство S-1 для пластиковых и стеклянных пипеток (Thermo Fisher Scientific, США);
11. Источник тока (Power Pac HC Biorad, США);

12. Холодильник Веко DNE45080 (Веко, Турция);
13. Комплект автоматических одноканальных дозаторов (пипеток) Eppendorf Research plus (3 штуки в комплекте – диапазон 0,5-10 мкл, диапазон 10-100 мкл, диапазон 100-1000 мкл) (Eppendorf, Германия);
14. Центрифуга CM64 (ELMI, Латвия);
15. Инвертированный микроскоп IX51 с флуоресцентной лампой и цифровой камерой DP-70 (Olympus, Япония);
16. Термостат ТС-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия);
17. Холодильник низкотемпературный DW-86L388 (Haier, Китай);
18. Криохранилище Locator 8 (Thermo Scientific, США);
19. Лабораторные весы LA-60 (ACCULAB, Германия).

5.1.2 Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов)

1. Посуда медицинская пластиковая для лабораторной диагностики и иммунологических исследований (Corning Inc., США);
2. Изделия из полимерных материалов для лабораторных исследований *in vitro* (Eppendorf AG, Германия);
3. Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные Science Purple Nitrile (Kimtech, США);
4. Ножницы хирургические (ОАО «Медико-инструментальный завод им. М.Горького», Россия);
5. Пинцет тканевый (ОАО «Медико-инструментальный завод им. М.Горького», Россия);
6. Питательная среда ДМЕМ (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
7. Раствор Хэнкса (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
8. Сыворотка крови эмбриональная телячья (ЭТС) (Gibco, Life Technologies, США);
9. Сыворотка крови эмбриональная телячья для ЭСК ЭС-ЭТС (Gibco, Life Technologies, США);

10. Раствор трипсин/ЭДТА 0,25% или 0,05% (Gibco, Life Technologies, США);
11. Диспаза (Gibco, Life Technologies, США);
12. Коллагеназа I типа (Gibco, Life Technologies, США);
13. Среда AmnioMAX™-II (Gibco, Life Technologies, США);
14. Раствор Версена (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
15. Питательная среда ДМЕМ (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
16. Питательная среда DMEM (STEMCELL Technologies, Канада);
17. Питательная среда для плюрипотентных стволовых клеток mTeSR™1 (STEMCELL Technologies, Канада);
18. Матригель - BD *Matrigel*™ матрикс (BD Biosciences, США);
19. L-глутамин (Sigma-Aldrich, США);
20. Пируват натрия (Gibco, Life Technologies, США);
21. GlutaMAX – добавка, аналогичная L-глутамину (Gibco, Life Technologies, США);
22. Пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (ПанЭко, Россия);
23. PBS (phosphate buffer saline) – фосфатно-солевой буфер (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
24. PANEXIN NTA – заменитель сыворотки для культивирования клеток (PAN-Biotech, Великобритания);
25. Полибрен (Sigma-Aldrich, США);
26. 2-пропилвалериановая кислота (Sigma-Aldrich, США);
27. Аскорбиновая кислота (Sigma-Aldrich, США);
28. Вальпроевая кислота (Sigma-Aldrich, США);
29. Первичными антитела мыши против Тра-1-60 (Abcam, Великобритания);
30. Вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, США).

5.2 Выделение эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ)

12–14-ти дневные эмбрионы мыши линии C57Bl извлекают из матки беременной самки. У эмбрионов отрезают голову, конечности, хвост и брюшную область, тело помещают в новую чашку Петри с ФСБ, содержащим 80 мкг/мл гентамицина. С помощью пинцетов измельчают тела эмбрионов. Измельченную ткань вместе с PBS помещают в центрифужную пробирку на 15 мл и центрифугируют 5 мин при 300 g. Осадок еще раз промывают в PBS с антибиотиком, после чего к осадку добавляют 5 мл трипсина/ЭДТА и инкубируют 20 мин в закрытой пробирке при +37 °С. После этого диссоциируют осадок пипетированием и блокируют действие трипсина добавлением сыворотки ЭТС. Осадок диссоциируют в среде для культивирования МЭФ и высевают суспензию клеток в пластиковые культуральные флаконы. Культуральная среда для МЭФ имеет следующий состав: DMEM, 15% ЭС-ЭТС, 1x пируват натрия, 1x GlutaMAX, пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл). Смена среды производится на следующий день, а затем через день.

Клетки пассируют 1:4 или замораживают (в культуральной среде для МЭФ с 10% ДМСО) при достижении ими примерно 80% конфлюэнтного монослоя.

5.3. Выделение дермальных фибробластов человека

Лоскуты кожи волосистой части головы 1-1,5 см толщиной, полученные в результате хирургических операций, промывают в растворе Хэнкса, содержащем 80 мкг/мл гентамицина. Для промывки используется минимум 1 л раствора. Скальпелем срезают дерму и прилегающий жир, а кожу нарезают на полоски шириной ок. 0,5 см. Затем их переносят в 0,2% раствор диспазы на ночь при +4 °С. С помощью пинцета с плоскими браншами снимают слой кератиноцитов. Оставшуюся дерму измельчают и инкубируют в 0,2% растворе коллагеназы I типа в DMEM в течение 3-4 ч при +37 °С до полного растворения дермы. Необходимо контролировать процесс диссоциации дермы каждые 15-20 мин, встряхивая пробирку. При этом нужно перейти к следующему шагу сразу же, как только дерма растворится (это происходит очень быстро спустя примерно 3 ч инкубации). После растворения полученную суспензию пипетируют и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин и удаляют супернатант. Осадок разбавляют в 10 мл холодного PBS и снова пипетируют, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин и удаляют супернатант. Далее осадок разбавляют в 10 мл холодного PBS, пропускают через клеточное сито с размером пор 100 мкм. Если суспензия не проходит через сито, необходимо попипетировать ее или слегка ударить пробирку дном об стол. Профильтрованную суспензию снова

центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин и удаляют супернатант, к осадку добавляют 3 мл среды AmnioMAX™-II с двухкратным гентамицином.

5.4. Выделение клеток дермальной папиллы (ДП) человека

Лоскуты кожи волосистой части головы 1-1,5 см толщиной, полученные в результате хирургических операций, промывают в растворе Хэнкса, содержащем 80 мкг/мл гентамицина. Затем их переносят в 0,5% раствор диспазы на ночь при +4 °С. С помощью хирургических ножниц отделяют слой жировой клетчатки с волосяными луковицами и снова промывают в растворе Хэнкса с антибиотиком. После этого проводят инкубацию в 0,2% растворе коллагеназы I типа в DMEM в течение 2 ч при +37 °С. Центрифугируют 1500 об/мин в течение 10 мин, после чего происходит разделение суспензии на две фракции: верхняя – жировая и нижняя – с волосяными луковицами и остатками дермы. После отделения верхней фракции нижнюю несколько раз отмывают от фермента и примесей дермы в растворе Хэнкса, а затем 3 раза в среде DMEM при 300 об/мин по 5 мин. Далее осадок, содержащий ДП, ресуспендируют в среде AmnioMAX™-II с добавлением пенициллин-стрептомицина (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) и помещают в культуральные флаконы. Смену среды проводят каждые 3-4 дня. По достижению клетками субкофлюэнтного монослоя, их снимают с пластика с помощью раствора трипсина/ЭДТА и пассируют в соотношении 1:3.

5.5. Получение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека

ММСК ЖТ человека

5.5.1. Получение биоптата и транспортировка в лабораторию.

Биоптат жировой ткани берут у донора в результате пластической операции (абдоминопластика, липоскация) в стерильных условиях. Размер биоптата не должен быть менее 5 см³. Полученный биоптат, с соблюдением правил асептики, переносят в стеклянный сосуд со стерильным раствором Хэнкса, содержащим 0,2 мг/мл гентамицина, к нему прилагается выписка с результатами проведенных анализов донора (на гепатиты В и С, СПИД и сифилис). В таком виде биоптаты доставляют в лабораторию. Транспортный контейнер с поступившими образцами вскрывают в асептических условиях. Проводится регистрация образца в компьютерной базе данных и присвоение ему регистрационных данных и кодов. Хранение биоптатов допустимо не более 24 ч при +4 °С. Непосредственно перед обработкой биоптаты тщательно промываются в растворе Хэнкса, содержащем 0,4 мг/мл гентамицина, промывку нужно проводить не менее 5 раз. Во избежание маскирования грибковой контаминации антимикотик не используется ни на одном этапе выделения и культивирования клеток.

5.5.2. Выделение концентрата ММСК ЖТ.

Материал переносят в стерильную чашку Петри, при помощи стерильных скальпелей и ножниц механически измельчают до состояния однородной массы без крупных комков и заливают раствором коллагеназы I типа (0,15% раствор в среде ДМЕМ) в соотношении 1:1 к объему жира (конечная концентрация коллагеназы – 0,075%). Смесь переносят в центрифужную пластиковую пробирку и инкубируют в термостате при +37 °С в течение 30-60 мин при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере. Затем добавляют равный объем среды ДМЕМ, тщательно ресуспендируют при помощи серологической пипетки и центрифугируют в течение 10 мин при 300 g при комнатной температуре. Осадок при помощи серологической пипетки тщательно ресуспендируют в среде ДМЕМ. Полученную суспензию фильтруют через клеточное сито с размером пор 100 мкм и центрифугируют при 200 g в течение 10 мин. Полученный клеточный осадок суспендируют в среде ДМЕМ, затем вновь центрифугируют при 300 g в течение 10 мин. Клеточный осадок ресуспендируют в среде ДМЕМ, содержащей 10% PANEXIN NTA, фактор роста фибробластов (10 нг/мл), эпидермальный фактор роста (10 нг/мл), инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (10 мкг/мл), селенит натрия (10 нг/мл, 50 нМ) (далее «полная ростовая среда для ММСК ЖТ»), подсчитывают количество клеток при помощи автоматического счетчика клеток. Клетки вносят в культуральный сосуд в количестве $5-10 \cdot 10^3$ клеток/см² и культивируют при +37 °С в CO₂-инкубаторе.

5.6. Получение iPСК человека путем репрограммирования клеток ДП и 1608hT

5.6.1. Репрограммирование клеток.

Клетки ДП на третьем пассаже или 1608hT (0,5 млн. в чашке Петри диаметром 30-60 мм) инфицируют ночь лентивирусными векторами, кодирующими гены плюрипотентного состояния клеток *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* (заказываются в коммерческой лаборатории), с расчетом, что на одну клетку придется примерно 5 копий каждого вируса в среде для культивирования клеток ДП и 1608hT, соответственно, при +37 °С в атмосфере 5% CO₂ и 5% O₂. Для улучшения эффективности инфицирования добавляют 5 мкг/мл полибрена. Смену среды производят через день при добавлении к ней химических соединений, увеличивающих эффективность репрограммирования, 2 mM 2-пропилвалериановой кислоты и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты. Через 7 дней среду заменяют на среду для плюрипотентных стволовых клеток mTeSR™1 с добавлением 2 mM вальпроевой кислоты и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты. Среду меняют каждый день. Пересевы клеток на первых пассажах производят механически на митотически неактивные МЭФ до начала контактирования между собой колоний, а затем на пластик, покрытый матригелем. Первый пересев клеток

производят на чашку Петри диаметром 100 мм и отменяют упомянутые выше добавки. После отбора Tra-1-60+ клонов пересевы проводят с помощью инкубации 15 – 20 мин в растворе 1 мг/мл диспазы в DMEM. Клетки растят при +37 °С в атмосфере 5% CO₂ и 5% O₂ и пассируют до момента контактирования колоний между собой.

5.6.2. Отбор Tra-1-60+ клонов.

По мере роста колоний в 100 мм чашках Петри, примерно через 2-3 недели после пассирования, проводят окрашивание живых клеток на поверхностный маркер плюрипотентного состояния Tra-1-60. Для этого клетки инкубируют с первичными антителами мыши против Tra-1-60 (1/200, Abcam) в 5 мл mTeSR™ 1 в течение часа, после чего добавляют вторичные антитела против мыши Alexa Fluor 488 (1/500, Molecular Probes) еще на час. Затем удаляют раствор антител, промывают клетки 3 раза PBS и оставляют в mTeSR™ 1. Детекцию Tra-1-60+ клонов проводят с помощью флуоресцентного микроскопа. Положительные колонии механически с помощью пипетки на 200 мкл и пластикового наконечника переносят в лунки 48-милуночного планшета, покрытые матригелем либо митотически неактивными МЭФ.

VI. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке СОП «Порядок пополнения Коллекции клеточных культур» были использованы следующие литературные источники:

1 Дьяконов Л.П. Коллекции клеточных культур – фундаментальная основа научных исследований по биологии клетки и биотехнологии. Ветеринарная патология. 2003. Том 1: 10-20.

2 Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004, Good Laboratory Practice (GLP).

3 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. Том 72 (4): 187–198.

4 Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., Sun C.W., Meissner A., Cassady J.P., Beard C., Brambrink T., Wu L.C., Townes T.M., Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. Science. 2007. Vol. 318 (5858):1920-1923.

5 Park I.H., Arora N., Huo H., Maherali N., Ahfeldt T., Shimamura A., Lensch M.W., Cowan C., Hochedlinger K., Daley G.Q. Disease-specific induced pluripotent stem cells. Cell. 2008. Vol. 134 (5): 877-886.

6 Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., Gao Q., Bell G.W., Cook E.G., Hargus G., Blak A., Cooper O., Mitalipova M., Isacson O., Jaenisch R.. Parkinson's disease patient-derived

induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009. Vol. 136 (5): 964-977.

7 Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., Weisenthal L.M., Mitsumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Goland R., Wichterle H., Henderson C.E., Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008. Vol. 321 (5893): 1218-1221.

8 Raya A., Rodríguez-Pizà I., Guenechea G., Vassena R., Navarro S., Barrero M.J., Consiglio A., Castellà M., Río P., Sleep E., González F., Tiscornia G., Garreta E., Aasen T., Veiga A., Verma I.M., Surrallés J., Bueren J., Izpisua Belmonte J.C. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009. Vol. 460 (7251): 53-59.

9 Hartfield E.M., Fernandes H.J., Vowles J., Cowley S.A., Wade-Martins R. Cellular reprogramming: a new approach to modelling Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans*. 2012. Vol. 40(5): 1152-1157.

10 Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase c (clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *J Biol Chem*. 1966. Vol. 241 (1): 130-139.

11 Rodbell M., Jones A.B. Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase c (clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J Biol Chem*. 1966. Vol. 241 (1): 140-142.

12 Hauner H., Wabitsch M., Pfeiffer E.F. Differentiation of adipocyte precursor cells from obese and nonobese adult women and from different adipose tissue sites. *Horm Metab Res Suppl*. 1988. Vol. 19: 35-39.

13 Hauner H., Entenmann G., Wabitsch M., Gaillard D., Ailhaud G., Negrel R., Pfeiffer E.F. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*. 1989. Vol. 84 (5): 1663-1670.

14 Van Den Berg D.J., Sharma A.K., Bruno E., Hoffman R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*. 1998. Vol. 92 (9): 3189-3193.

15 Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001. Vol. 7 (2): 211-228.

16 Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell*. 2002. Vol. 13 (12): 4279-4295.

17 Zuk P.A., Benhaim P., Hedrick M.H. Stem cells from adipose tissue. *Handbook of stem cells*. 2006. Vol. 2: 425-447.