

УДК 576.535+004.9

ДОЛГОВРЕМЕННАЯ ВИДЕОМИКРОСКОПИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК IN VITRO: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Я.И. ШЕЙКО, Н.А. БАЛАШЕНКО, О.В. КВИТКО, И.И. КОНЕВА, С.Е. ДРОМАШКО

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27

e-mail: Y.Sheiko@igc.bas-net.by

Цель. Прижизненная видеомикроскопия клеток является высокоинформативным подходом в изучении клеточных культур. Нередко этот метод позволяет уточнить и дополнить данные, полученные исследователями при визуальном изучении живых культур или фиксированных препаратов. Основная проблема длительной прижизненной видеомикроскопии – это поддержание жизнедеятельности клеток. Для решения этой проблемы был разработан компьютерный видеокомплекс «Цитомир». **Методы.** В процессе культивирования осуществляется фотографирование заданных исследователем участков (от одного до нескольких сотен) клеточной культуры через определенные промежутки времени (метод *time-lapse photography*). Моторизированный предметный столик позволяет перемещать культуральный сосуд с помощью джойстика, а также осуществлять сканирование заданных участков клеточной культуры в автоматическом режиме. **Результаты.** В наших исследованиях изучались такие процессы как клеточные деления, гибель, дифференцировка, подвижность и связанные с раковой трансформацией массовые изменения клеточных культур, включая аномальные морфологические изменения и агрегацию клеток. Показана также эффективность использования витальной микроскопии клеток для тестирования антираковых препаратов. **Выводы.** Возможности видеокомплекса позволяют применять его в медико-биологических научных исследованиях, в разработке клеточных биотехнологий, изучении действия фармакологических препаратов и санитарно-гигиенического нормирования химических веществ на клеточных тест-системах. Полученные с помощью «Цитомира» фотографии и видеозаписи также могут служить в качестве учебных материалов для студентов биологических, медицинских и сельскохозяйственных высших учебных заведений.

Ключевые слова: культуры клеток, прижизненная видеомикроскопия, дифференцировка, пролиферация, антираковая защита.

Введение. Компьютерная видеомикроскопия живых клеточных культур является перспективным современным методом исследования таких фундаментальных биологических процессов, как клеточное старение, дифференцировка и раковая трансформация.

Подавляющее большинство работ с использованием видеомикроскопии живых клеток связано с конфокальной микроскопией. Впервые концепция этого метода была разработана в середине 1950-х гг. аспирантом Гарвардского университета Марвином Мински (Marvin Minsky). Но широкий интерес к этой области проявился лишь в 1980-х гг. благодаря бурному развитию компьютерной и лазерной технологий [1].

Однако используемые в конфокальной микроскопии люминесцентные красители не позволяют проводить длительное (многодневное) исследование клеточных культур. В лаборатории моделирования генетических процессов ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» исследования по долговременной компьютерной видеомикроскопии живых клеток с использованием инвертированного светового микроскопа ведутся с конца 1990-х гг. Основные результаты опубликованы в ряде статей, учебно-методическом пособии для магистрантов-биологов [2] и методических рекомендациях [3]. В данном обзоре обсуждаются как данные зарубежных авторов, так и результаты собственных исследований, приведшие

© Я.И. ШЕЙКО, Н.А. БАЛАШЕНКО, О.В. КВИТКО, И.И. КОНЕВА, С.Е. ДРОМАШКО, 2016

к созданию компьютерного видеокомплекса «Цитомир», а также перспективы его использования в фундаментальных и прикладных медико-биологических исследованиях, в частности при разработке клеточных технологий в медицинской трансплантологии, сельском хозяйстве и охране окружающей среды.

Клеточные культуры – перспективная модель для изучения строения и функционирования организма

Клетки, взятые из организма и культивируемые *in vitro*, являются пусть и упрощенной, но удобной моделью для изучения различных особенностей строения и функциональности организма. Так, на клеточных культурах можно изучать процессы клеточной, пролиферации, дифференцировки, старения, раковой трансформации.

Во второй половине прошлого века были разработаны методики культивирования клеток вне организма. С тех пор были преодолены многочисленные методические трудности культивирования, оптимизированы составы питательных сред для каждого типа клеток, были найдены способы индуцированной дифференцировки одних клеточных типов в другие. Однако, несмотря на впечатляющие успехи работ по культивированию клеток вне организма исследователи, периодически наблюдая за клетками в микроскоп, не всегда имели возможность получить объективное представление о событиях, происходящих в клеточных культурах. Прижизненная видеомикроскопия клеток позволила существенно уточнить и дополнить данные по клеточным культурам полученные при визуальном наблюдении.

Впервые сообщение о том, что клетки человека в культуре могут поделить ограниченное число раз, было сделано Свимом и Паркером (Swim H.E., Parker R.F.) в 1957 г. [4]. До этого считалось, что клетки, выделенные из организма, могут жить и делиться неограниченно долго. В 1961 г. это явление было подтверждено Хейфликом и Мурхедом (Hayflick L., Moorhead P.S.) [5]. Именно Хейфлик связал явление ограниченности пролиферативного потенциала и смертность культивируемых клеток со старением организма, а также указал на то, что этот феномен является свойством нормальных клеток. Клетки, способные к бесконечному размножению, являются ненормальными и часто

близки по характеристикам к раковым клеткам (в настоящее время широко используется понятие «трансформированные клетки»).

Культивируемые фибробласты человека и животных, в течение ряда лет служившие классической моделью цитогеронтологии, как правило, рассматривались как гомогенные недифференцированные популяции клеток. В этом плане уникальными являются исследования группы Байройтера (Bayreuther K.) (Германия), выполненные на фибробластах животных (мышь, крыса, цыпленок) и человека [6, 7]. По данным авторов, фибробласты, культивируемые *in vitro*, так же как и фибробласты в тканях организма, включают семь клеточных типов (различающихся морфологически), необратимо дифференцирующихся один в другой до последней стадии – терминальной дифференцировки. На терминальной стадии происходит либо разрушение клетки по механизму апоптоза, либо «осколки» разрушающихся полиплоидных клеток трансформируются и дают начало бессмертным линиям, включая злокачественные.

Однако эти исследования были выполнены с использованием фиксированных цитологических препаратов, что не позволило проследить последовательность изменений клеток и их потомств, из-за чего нельзя считать элегантною идею терминальной дифференцировки фибробластов доказанной.

Вопреки большому объему экспериментальных данных еще не получены ответы на ряд важных вопросов о процессах онкогенеза. В частности, далека от ясности последовательность событий, происходящих в многоэтапном процессе злокачественного перерождения клеток. Остаются также не раскрытыми механизмы такого фундаментального свойства популяций раковых клеток, как иммортальность, то есть их способность к неограниченному во времени клеточному делению. Не ясны также причины того, что у грызунов частота раковых заболеваний в пересчете на клеточную генерацию на несколько порядков выше, чем у человека [8]. Недостаточная изученность процессов ракового перерождения клеток является препятствием, без преодоления которого крайне проблематична разработка новых высокоэффективных способов профилактики и лечения онкологических заболеваний.

Одно из перспективных направлений дальнейших исследований неопластической трансформации клеток связано с полученными в последние годы данными о том, что в раковых опухолях обнаружены клеточные субпопуляции, обладающие характеристиками стволовых клеток [9].

В принципе, нелимитированное самоподдержание клеточной популяции может быть обусловлено не только существованием непрерывной стволовой линии, возникшей в результате мутации в нормальной стволовой клетке, но и процессами своего рода периодического «омолаживания», при которых происходит восстановление пролиферативного лимита, утрачиваемого при клеточном старении. Клетки раковых опухолей часто являются анеуплоидными вследствие хромосомной нестабильности, которая может ускорять амплификацию онкогенов и потерю гетерозиготности генов – супрессоров клеточного деления [10].

Высказано предположение, что поддержание иммортализованного состояния клеточных популяций связано с генерацией хромосомной нестабильности при нарушениях митоза [10]. Возникновение анеуплоидных клеток может происходить благодаря аномальным митозам. Митотические дефекты в опухолевых клетках были обнаружены Давидом Хансеманом (Hansemann D.) более чем столетие тому назад [11]. Асимметричные биполярные и многополярные митозы могут быть причиной изменения числа хромосом и приводить к потере гетерозиготности [12, 13].

Одним из процессов, ведущих к возникновению «омоложенных» клеток с увеличенным пролиферативным потенциалом, могут быть аномальные деления полиплоидных клеток. В пользу этого свидетельствуют данные возглавляемой Эренпрейзой (Erenpreisa J.A.) группы латвийских ученых о возможном возникновении митотических потомков из гигантских полиплоидных клеток, образующихся при облучении клеточной линии лимфомы Беркита [14]. Кроме того, по сообщению американской исследовательницы Кирстен Уоллен (Walen K.H.), изучавшей клеточные культуры различных видов животных и человека, клетки с увеличенной продолжительностью жизни могут возникать в результате аномального деления многоядерных предшественников [15]. Следует отметить сходство данных в этих работах,

с данными, упоминавшихся ранее работ группы Байройтера о терминальной дифференцировке фибробластов относительно того, что в результате разрушения постаревших постмитотических клеток, которое обычно заканчивается клеточной гибелью, с некоторой вероятностью продуцируются трансформированные клетки, обладающие увеличенной пролиферативной активностью и способные генерировать раковые клоны [16]. Результаты, полученные в работах этих трех групп ученых, безусловно, интересны, но для их подтверждения и однозначной интерпретации необходимы дополнительные исследования. Наиболее адекватным экспериментальным подходом к доказательству процессов возникновения «омоложенных» клеток могла бы стать прямая демонстрация на модели живых клеток. В этом плане особый интерес представляет работа группы канадских исследователей под руководством Раджарамана (Rajaraman R.), в которой с помощью видеомикроскопии живых иммортализованных культур клеток эмбриона мыши были получены данные в пользу того, что периодическое восстановление пролиферативного потенциала клетки происходит путем особого процесса немитотического деления, названного неозисом (neosis) [17]. Вывод о существовании неозиса был сделан на основании видеозаписей, которые, по мнению авторов, демонстрировали немитотический асимметричный цитокинез крупных неделящихся клеток, завершающийся отделением небольших клеток, обладающих увеличенным митотическим потенциалом [17]. По мнению американского онколога Наволаника (Navolanic P.M.), концепция неозиса чрезвычайно интересна, но вследствие своей радикальности нуждается в подтверждении в других лабораториях [18].

Для выяснения роли аномальных клеточных делений в возникновении трансформированных клеток и поддержании их иммортализованного состояния необходимо получить ответы на два вопроса. Прежде всего, действительно ли дочерние клетки могут продуцироваться в результате нерегулярного цитокинеза. Во-вторых, если такой процесс имеет место, то могут ли такие клетки становиться родоначальницами активно пролиферирующих субпопуляций. Ответы на эти вопросы можно получить при детальном изучении живых

клеточных культур с помощью метода компьютерной видеомикроскопии.

Материалы, методы и оборудование, необходимые для компьютерной видеомикроскопии

Одной из важнейших особенностей прижизненной видеомикроскопии, является проблема жизнеобеспечения объектов исследования. Эта проблема возникает при длительных исследованиях. Так, например, клетки человека и животных можно кратковременно, до нескольких часов изучать под микроскопом вне оптимальных условий. С другой стороны, для проведения длительного наблюдения (до нескольких месяцев) для клеточных культур необходимо создать подходящие условия: температуру, атмосферный состав, следить за истощением питательной среды, учитывать возможность цитотоксического эффекта света.

В качестве объектов исследования использовались культивируемые *in vitro* эмбриональные фибробласты человека и мыши, клетки из фолликулов волос человека, иммортализованная культура, выделенная из эмбриона мыши линии Af, а также стандартные раковые линии A549 и HeLa. Выделение эмбриональных клеток и культивирование полученных или стандартных культур осуществлялось по описанным ранее методикам [19–21].

Для приготовления культур нормальных (нераковых) клеток использовали кожно-мышечную ткань 8–12-недельных эмбрионов человека и 12–14-суточных эмбрионов мыши линии Af. Измельченную ножницами ткань дезагрегировали 0,25 %-ным раствором трипсина при 37 °C в течение 30 мин. После удаления трипсина с помощью шприца осадок суспендировали в ростовой среде, включающей 90 % среды Игла и 10 % эмбриональной сыворотки телят (ЭТС) с добавлением антибиотиков. Суспензию пропускали через капроновый фильтр (ячейка 0,3 x 0,3 мм). Концентрацию единичных фибробластов подсчитывали в камере Горяева.

Получение культуры клеток из фолликулов волос человека. Несколько (1–5) волос на затылочной части головы захватывали и извлекали пинцетом. Фолликулы от 10 волос отрезали стерильными ножницами и помещали в центрифужную пробирку с раствором Хэнкса с 10-кратной (по сравнению с обычной при культивировании кле-

ток) концентрацией (5 мкг/мл) антибиотиков (пенициллина, стрептомицина, гентамицина и амфотерицина В). После 30 минут выдерживания в концентрате антибиотиков при комнатной температуре и центрифугирования (1000 об./мин, 10 мин.) удаляли супернатант и для отмывания антибиотиков добавляли раствор Хэнкса, снова выполняли центрифугирование и удаляли супернатант. Фолликулы помещали в небольшой культуральный сосуд и добавляли ростовую среду (1,5 мл), состоящую из среды Игла, 10 % сыворотки эмбриона телят и 10 % стерилизованной фильтрацией жидкости из фолликулов яичника коров, а также пенициллина и стрептомицина (0,5 мкг/мл).

Иммортализованная (постоянная) клеточная линия была выделена нами в процессе роста первичной культуры фибробластов, полученных из 12–14-суточных эмбрионов мышей Af. Эмбриональные клетки высевали в ростовой среде (80 % среды Игла, 10 % эмбриональной сыворотки телят, 10 % пуповинной сыворотки человека с добавлением антибиотиков) при низкой плотности (500 клеток на 1 см²) в сосуды Карреля. В процессе культивирования данная популяция клеток спонтанно иммортализовалась.

Клетки различных раковых и нераковых культур высевали в сосуды Карреля при посевной плотности в различных экспериментах от 500 до 100–300 тысяч на 1 см² ростовой поверхности, в культуральные флаконы добавляли с помощью шприца CO₂ (5 % объема), герметически закупоривали резиновыми пробками и культивировали в ростовой среде 5–7 дней. После образования монослоя нормальные (нераковые) клетки снимали смесью растворов трипсина (0,25 %) и версена (0,02 %) в отношении 1:1, суспендировали в ростовой среде и пересевали в сосуды Карреля в течение ряда пассажей до использования в дальнейших экспериментах. В случае иммортализованных или раковых культур в некоторых экспериментах клетки пересевали без трипсинизации путем центрифугирования и пересева клеток из отработанной питательной среды.

Компьютерную микроскопию проводили с помощью оригинального оборудования, разработанного в лаборатории моделирования генетических процессов, в последние годы – с использованием видеоконкомплекса «Цитомир» (рис. 1).

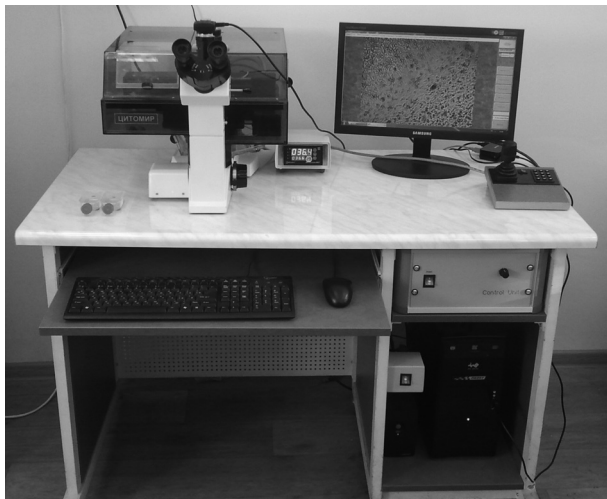


Рис. 1. Видеокомплекс «Цитомир» для изучения живых клеточных культур. Инвертированный микроскоп комплекса оснащен термостатируемой камерой. Моторизированный предметный столик позволяет фотографировать десятки ячеек ростовой поверхности через заданные промежутки времени

Видеокомплекс «Цитомир» является совместной разработкой ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» и ОАО «ОптоЭлектронные Системы» ГНПО «Планар» (Минск). Видеокомплекс состоит из инвертированного микроскопа МИ-1 с термостатируемой камерой (производства «Планар»), системы терморегуляции и видео-системы. Микроскоп оснащен моторизированным предметным столиком, что позволяет просматривать с помощью джойстика ростовую поверхность и выбирать интересующие исследователя участки. Координаты выбранных участков заносятся в память компьютера, что дает возможность автоматически фотографировать данные участки через определенные промежутки времени. Существуют, также, режимы автоматического сканирования стандартных 48 и 96 луночных планшет, без предварительного ручного выбора участков. Это позволяет быстро получать снимки всех лунок планшета или, в случае длительных экспериментов, автоматически фотографировать все лунки планшета через определенные промежутки времени.

Длительное культивирование клеток в видеокомплексе возможно благодаря термостатируемой камере комплекса. Определенный газовый состав в атмосфере культурального сосуда создается по оригинальной методике, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси. Та-

ким образом, с помощью видеокомплекса «Цитомир» возможно наблюдать изменения в нескольких десятках ячеек ростовой поверхности (в каждой ячейке могут быть разные средовые условия, например, различная концентрация какого-либо тестируемого вещества), что позволяет использовать его для оценки действий на клетки лекарственных или токсических веществ.

Культуральные сосуды помещались в термостатируемую камеру видеокомплекса. С помощью визуального просмотра выбирали участки ростовой поверхности для фотографирования. Частота съемки в разных экспериментах варьирует от 1 кадра в минуту до 1 кадра в сутки.

Результаты компьютерной видеомикроскопии

Видеомикроскопия живых клеточных культур позволила уточнить сложившиеся представления о поведении культивируемых фибробластов, основанных на изучении фиксированных препаратов. Так, в уже цитировавшихся работах Байройтера и сотрудников [6, 7] приведены данные о наследовании морфотипа при клеточном делении, при котором обе дочерние клетки сохраняют материнский морфотип. Кроме того, сообщается об асимметричном (дифференцировочном) делении, при котором материнская клетка делится на две дочерние, различающиеся морфотипом.

Однако анализ видеозаписей, полученных на видеокомплексе, показал, что клетки культуры фибробластов достаточно активно перемещаются и меняют форму. На рис. 2 показана ячейка роста-

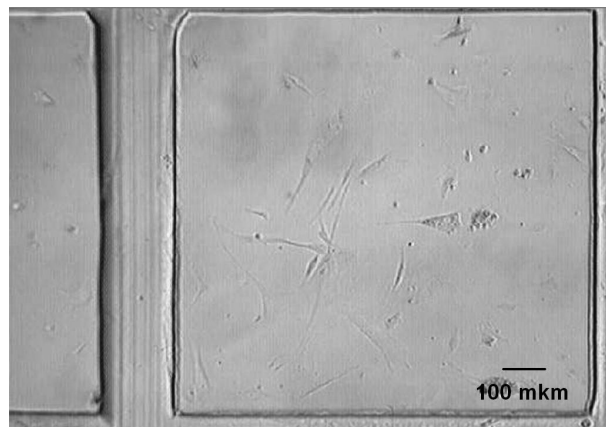


Рис. 2. Участок субстратной пластинки с фибробластами человека. Размер квадрата 1x1мм

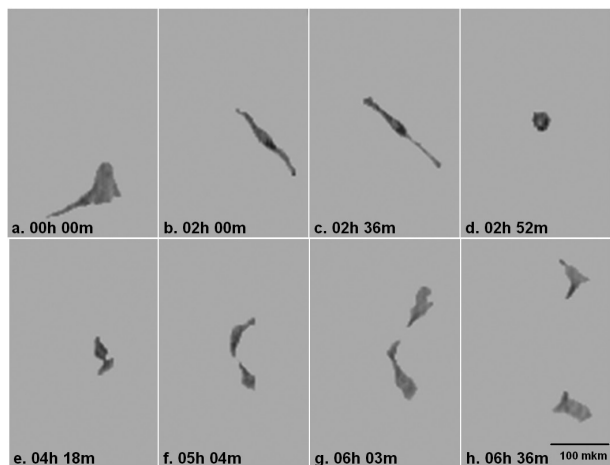


Рис. 3. Митотическое деление фибробласта мыши. Треугольная клетка (а) становится веретенообразной (b, c), округляется (d) и делится (e). Дочерние клетки продолжают изменять форму (f–h). h – часы, m – минуты

вой поверхности через 4 суток после посева эмбриональных фибробластов человека. Обращает на себя внимание значительная гетерогенность клеток по размеру и форме. Форма, как правило, неоднократно меняется на протяжении жизни клетки (форма может быть округлой, парусовидной, веретеновидной и, соответственно, может принимать различные промежуточные варианты).

Рис. 3 демонстрирует вариабельность клеточной формы до и после митотического деления. В один из моментов перед делением клетка имела треугольную форму, затем была веретеновидной, а после деления обе дочерние клетки также изменяют форму. Это означает, что в культуре эмбриональных фибробластов нет четкого сохранения морфотипа.

В культурах клеток фибробластов человека и мыши часто наблюдаются процессы клазматоза – отделения участков цитоплазмы (рис. 4). Биологическое значение этого процесса не понято [22]. Одной из функций клазматоза может быть эвакуация поврежденных фрагментов внутриклеточных структур и ненужных продуктов клеточного метаболизма [23]. В ряде случаев отделяемый участок цитоплазмы может быть достаточно крупным. Иногда он может иметь даже большую площадь, чем сама клетка. Некоторые отделившиеся фрагменты, подобно живым клеткам, могут иногда долгое время (до 3 суток) активно перемещаться по ростовой

поверхности. Тем не менее, во всех изученных случаях такие «клеточные осколки» рано или поздно прекращали двигаться и погибали. На фиксированных и окрашенных препаратах картины, показанные на рис. 4b–4с, могут быть интерпретированы как асимметричные (дифференцировочные) митотические деления, при которых материнская клетка делится на две различающиеся дочерние клетки с разным морфотипом. Однако во всех изученных случаях (около сотни) один из двух продуктов данного процесса погибал путем конденсации или фрагментации. При этом удалось проследить, что погибающий клеточный продукт не содержит ядра. В процессе истинного митоза материнская клетка быстро конденсируется и приобретает шаровидную форму и делится на две приблизительно одинаковые по размеру клетки, каждая из которых содержит ядро. В противоположность этому, отшнуровка цитоплазмы происходит «в плоскости», клетка не округляется перед ним.

Прижизненное наблюдение за культурами эмбриональных фибробластов человека и мыши по-

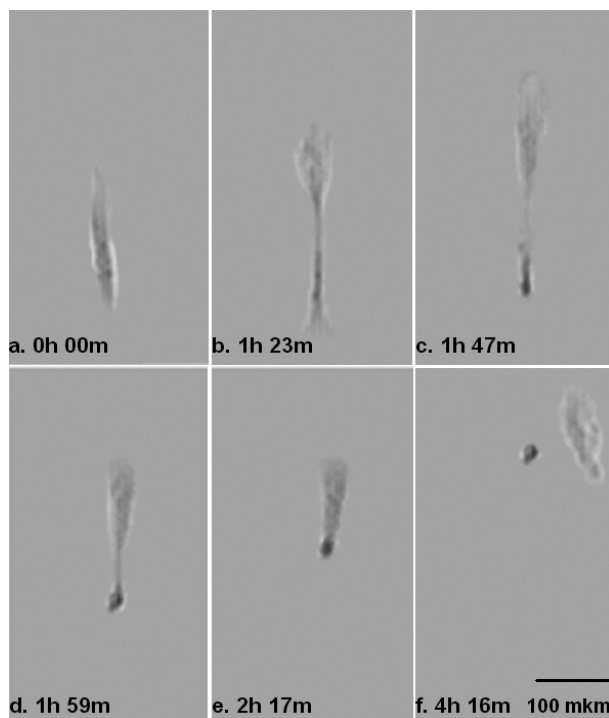


Рис. 4. Отделение части цитоплазмы фибробласта человека. Часть цитоплазмы отшнуровывается от основной части клетки (b, c), конденсируется (d), налипает на поверхность клетки (e), окончательно отделяется (f). h – часы, m – минуты

казало, что во многом клетки этих культур ведут себя сходным образом. Однако между клеточными культурами человека и мыши были обнаружены и существенные различия. Так, анализ формы отдельных клеток и их потомков в культурах фибробластов человека и мыши не выявил наследования клеточного морфотипа, однако было выявлено, что в популяциях фибробластов мыши, по сравнению с фибробластами человека, клетки намного реже находятся в веретеновидной форме. Если время пребывания фибробластов человека в веретеновидной форме нередко достигает 100 %, то тот же показатель у фибробластов мыши не превышает 50 %.

Выполненный нами количественный анализ клеточных генеалогий (пример клеточной генеалогии приведен на рис. 5) продемонстрировал более высокую вероятность митотического деления крупных клеток мыши по сравнению с крупными клетками человека. Если в культурах фибробластов человека не было зафиксировано делений клеток крупнее 2300 мкм², то в культурах фибробластов мыши крупные клетки (2300–5600 мкм²) делятся так же часто, как и остальные клетки.

В культурах клеток мыши чаще наблюдаются различные аномалии. Так, иногда в этих культурах регистрируются деления клеток на три дочерние (рис. 6). Наблюдение за судьбой образовавшихся клеток показало, что эти клетки являются не только жизнеспособными, но и способными дать потомство. В культурах клеток мыши могут возникать клетки необычной морфологии (рис. 7а), или происходить слипание постмитотических клеток в многоклеточные образования (рис. 7б).

Возможно, что причина высокой подверженности клеток мыши различным аномальным процессам связана с делением крупных клеток. При делении крупных постаревших, возможно полиплоидных клеток повышается вероятность образования анеуплоидных генетически несбалансированных клеток, которые могут давать начало дисфункциональным или трансформированным клеткам. Давно было замечено, что частота раковых заболеваний в пересчете на клеточную генерацию у грызунов на несколько порядков выше, чем у человека [8, 24], причем наибольшая вероятность трансформации наблюдается у постаревших клеток грызу-

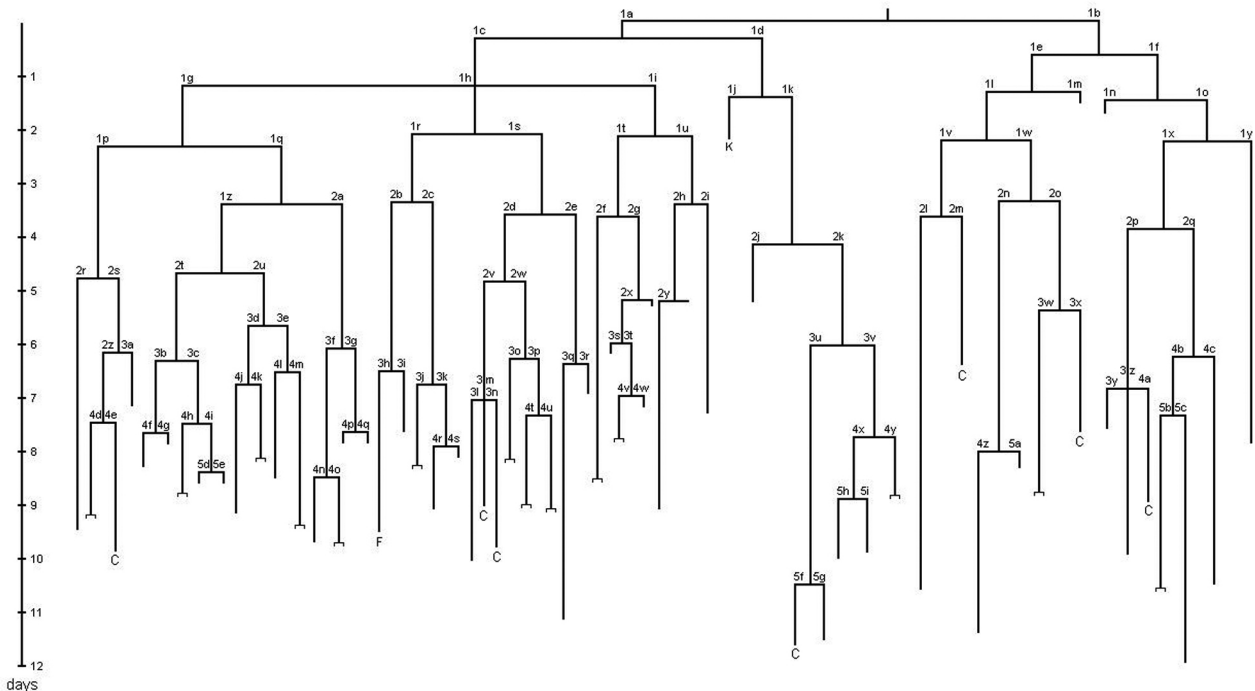


Рис. 5. Клеточная генеалогия иммортализованной линии из эмбриона мыши. Длины вертикальных отрезков соответствуют времени между митозами или между митозом и прекращением наблюдения. С – гибель клетки путем конденсации. F – гибель клетки путем фрагментации

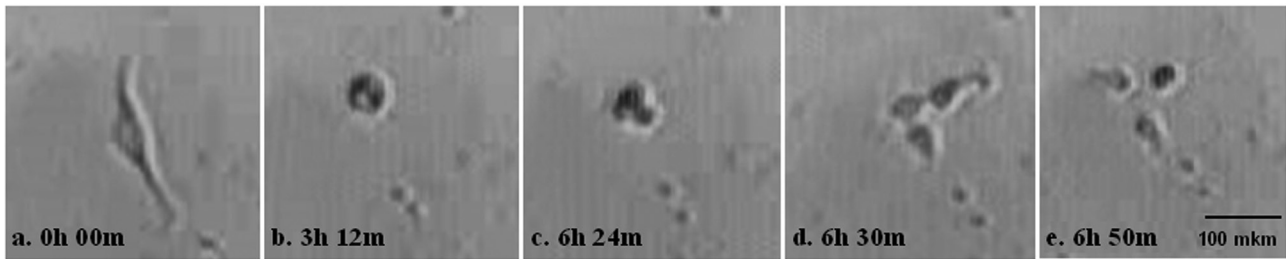


Рис. 6. Митотическое деление клетки из эмбриона мыши с образованием трех дочерних клеток. Материнская клетка (а) принимает шаровидную форму (b) и делится на три дочерние клетки (с – e), каждая из которых явилась родоначальницей клеточной субпопуляции. h – часы, m – минуты

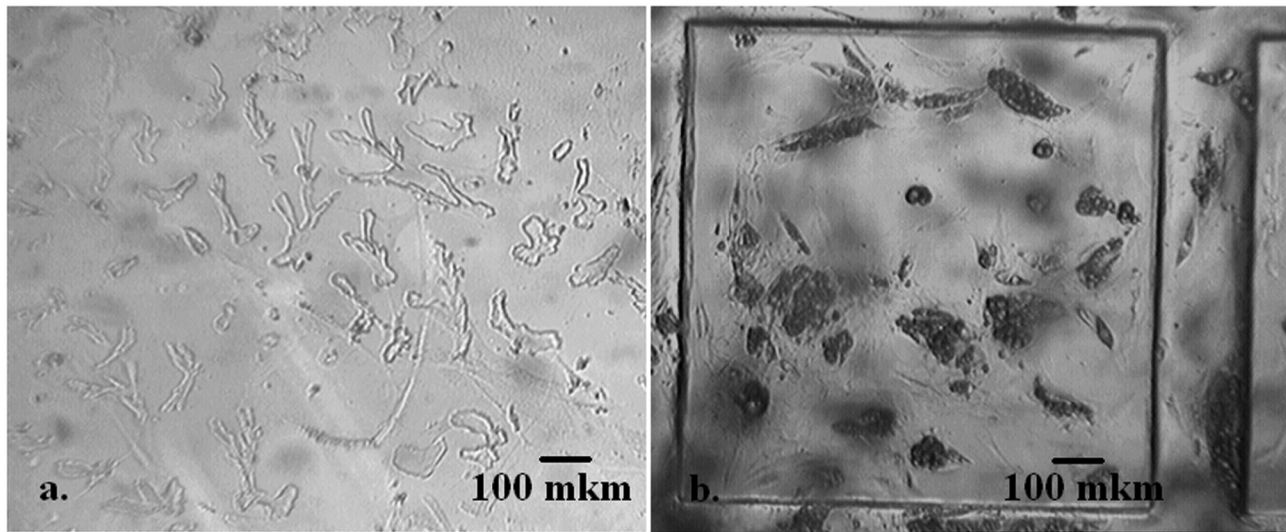


Рис. 7. Массовые изменения клеток в культуре из эмбриона мыши

нов. Причины такого фундаментального различия в частоте трансформации остаются неизученными.

Во-первых, сам по себе процесс генерации первично трансформированных клеток в тканях организма и клеточных культурах грызунов может быть намного интенсивнее, чем у человека [25].

Во-вторых, у грызунов может быть выше вероятность выживания и размножения первично трансформированных клеток [26].

В иммортализованной клеточной линии, выделенной нами в процессе роста первичной культуры фибробластов, полученной из 12–14-суточных эмбрионов мышей линии Af иногда возникали фокусы аномального многослойного роста клеток, подобных тем, которые наблюдались в линии мышей BALB/c [27].

Анализ видеозаписей показал, что трансформированные фокусы образуются не путем локаль-

ного размножения единичных клеток с постепенным увеличением участка аномального роста, а в результате агрегации многих клеток растущей монослойной культуры. На рис. 8а можно видеть три сформированных небольших многослойных фокуса, а также отдельные клетки и участки монослоя, образующие звездчеподобные структуры. Эти фокусы притягиваются друг к другу вместе с оставшимся монослоем клеток и сливаются в один крупный клеточный агрегат.

Крупные шарообразные агрегаты клеток (диаметром до 1 мм) часто откреплялись от ростовой поверхности в культуральную среду. Было установлено, что как в прикрепленных к субстрату, так и в «плавающих» агрегатах находится большое количество живых клеток. Анализ видеозаписи показал, что поверхность этих многоклеточных комплексов представляет собой массу активно

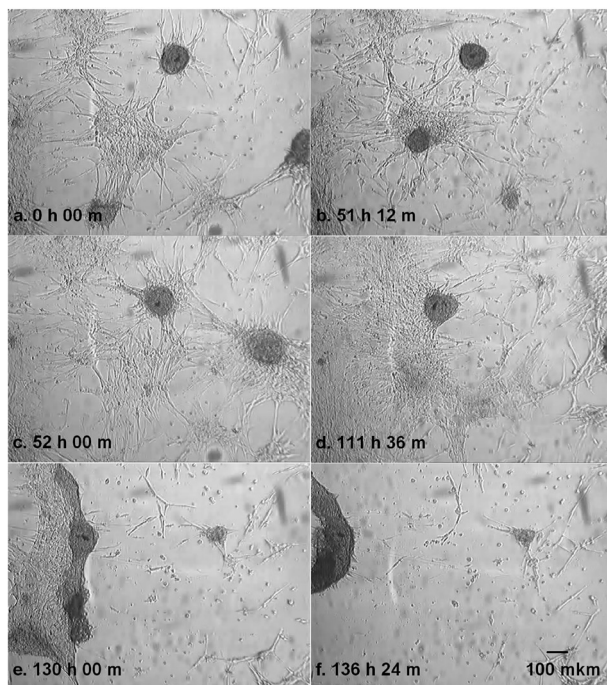


Рис. 8. Формирование крупных шаровидных агрегатов из живых клеток immortalized культуре эмбриона линейных мышей Af. Часть клеточного монослоя концентрируется с образованием звездчатой структуры (а) и объединяется с соседним ранее сформировавшимся многослойным фокусом (b–d). Затем участок монослоя быстро отслаивается от субстрата (е) и формирует шаровидный агрегат из живых клеток (f). h – часы, m – минуты

двигающихся клеток. Кроме того, после сбора открепившихся в культуральную среду агрегатов и их помещения в новый культуральный сосуд агрегаты прикреплялись к субстрату (рис. 9a), после чего находящиеся в них клетки быстро распространялись по ростовой поверхности (рис. 9b–d).

Возможно, данный процесс агрегации и расселения immortalized клеток является аналогом процесса метастазирования в организме.

Изучение эффектов лекарственных веществ

Метод прижизненной видеомикроскопии является удобным инструментом для изучения действия лекарственных веществ на клеточных тест-системах. Так, нами изучалось действие белка лактоферрина. Этот белок – компонент неспецифического гуморального иммунитета. Он содержится в различных секреторных жидкостях в том числе в молоке. Анализ литературы демонстрирует широкий спектр действия лактоферрина при

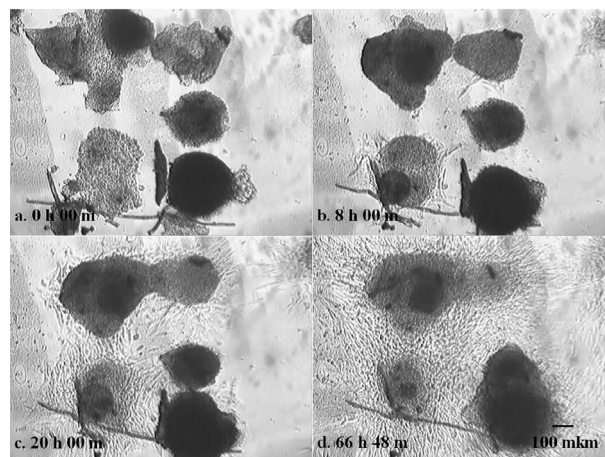


Рис. 9. Расселение клеток immortalized культуры из эмбриона линейных мышей Af и быстрое формирование монослойной культуры после контакта шаровидных агрегатов с поверхностью субстрата. h – часы, m – минуты

введении его в организм: подавление микробных инфекций, стимулирование иммунитета, противовоспалительное действие, противоопухолевая активность и ускорение заживления ран. Исследование действия лактоферрина на клеточных культурах, а именно на культурах immortalized и раковых клеток подтвердило его противоопухолевую эффективность, по крайней мере, на immortalized клетках, которые уже прошли начальные этапы раковой трансформации.

Нами изучалось воздействие различных концентраций (10, 100 и 1000 мкг/мл) рекомбинантного лактоферрина из молока трансгенных коз (НПЦ НАН Беларуси по животноводству) на пролиферацию и апоптоз клеток линии рака легкого A549 и immortalized линии эмбриональных фибробластов человека. Четко выраженный эффект воздействия лактоферрина, вплоть до полной гибели клеток, наблюдался после трехкратного введения лактоферрина в концентрациях 100 и 1000 мкг/мл в культуре immortalized клеток человека, причем ингибирующий эффект возрастал при повышении концентрации препарата (рис. 10).

В культурах клеток рака легкого A549 проводились эксперименты только по одно- и двукратному введению лактоферрина. Лактоферрин вводился с питательной средой в начале культивирования и при смене культуральной среды после 8 дней культивирования. В некоторых ячейках ро-

стовой поверхности наблюдалось уменьшение количества клеток, однако достоверных результатов по ингибции пролиферации раковых клеток получено не было. Отсутствие заметного ингибирующего эффекта лактоферрина в этих экспериментах, по-видимому, вызвано относительно коротким периодом его воздействия на клетки.

Исследование еще одного потенциального антиракового препарата Деринат также выявило положительный результат. Деринат – водный экстракт из молок осетровых рыб – применяется в медицине как иммуномодулятор, стимулятор кроветворения и регенерации. Изучалось действие различных концентраций (100 и 1000 мкг/мл) Дерината (двукратное введение) на пролиферацию и апоптоз клеток линии рака легкого A549 и иммортализованной линии эмбриональных фибробластов человека (рис. 11).

Как и в случае с лактоферрином наибольший эффект наблюдался при воздействии дерината на иммортализованные клетки человека (вплоть до гибели всех клеток в отдельных ячейках). Однако и в раковой культуре A549 наблюдался чет-

кий дозозависимый эффект подавления клеточной пролиферации.

Получение аутологичных клеток для регенеративной медицины

В регенерационной медицине уже сейчас клеточные технологии применяются для лечения ряда заболеваний. Перспективы развития этого направления в медицине во многом зависят от разработки нетравматичных и экономичных методов получения аутологичных (собственных) клеток, размноженных *in vitro*. С этой точки зрения особый интерес вызывает возможность получения аутологичных клеток не хирургическим путем, а из фолликулов выщипываемых волос. В 1999 году были опубликованы данные, что волосы на протяжении жизни постоянно растут, потому, что их волосяные фолликулы содержат стволовые клетки [28], причем эти стволовые клетки способны формировать не только волосяные фолликулы, сальные и потовые железы, но и другие типы клеток. Группе ученых из Калифорнийского университета [29] удалось установить, что фолликулярные стволовые клетки могут дифференцироваться по нейральному типу. Это видно не только по внешнему виду клеток, но и по тому, что они экспрессируют $\beta 3$ -тубулин. Эксперименты показали, что стволовые клетки, полученные из БВФ мыши, экспрессируют маркер стволовых клеток, вступивших на путь дифференцировки по нейральному типу – нестин. Также эти клетки, культивируемые *in vitro*, экспрессируют CD34, который также является маркером стволовых клеток.

Нами были выполнены исследования по возможности получения и размножения клеток из фолликулов волос.

В результате выполненных исследований показана возможность получения клоногенных клеток из фолликулов волос. Несмотря на трудности культивирования разреженных культур, удалось достигнуть экспоненциального роста числа клеток, что позволяет нарабатывать значительное количество клеточного материала.

На полученных клеточных культурах были проведены эксперименты по индуцированной дифференцировке клеток. Для этого была апробирована методика индуцирования дифференцировки пониженной температурой культивирования. Клетки

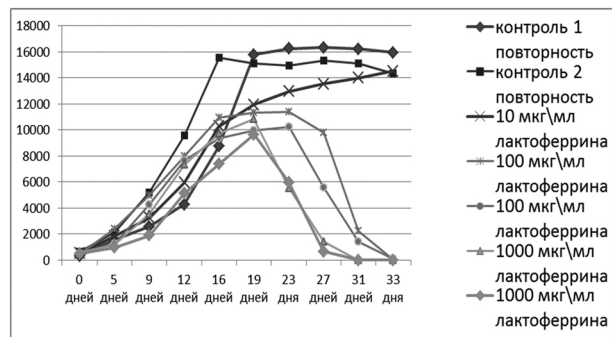


Рис. 10. Действие рекомбинантного лактоферрина на число клеток иммортализованной линии фибробластов человека при трехкратном введении (повторно на 14-е и 22-е сутки)

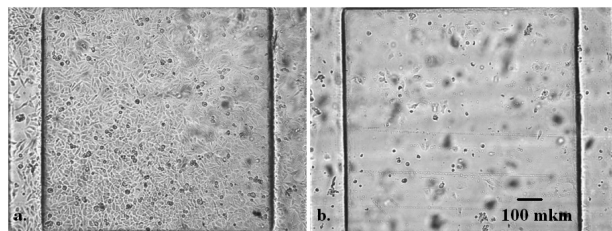


Рис. 11. Ингибирующий эффект двукратного введения Дерината в концентрации 1000 мкг/мл в культуру клеток иммортализованных фибробластов человека (b) и контроль (a)

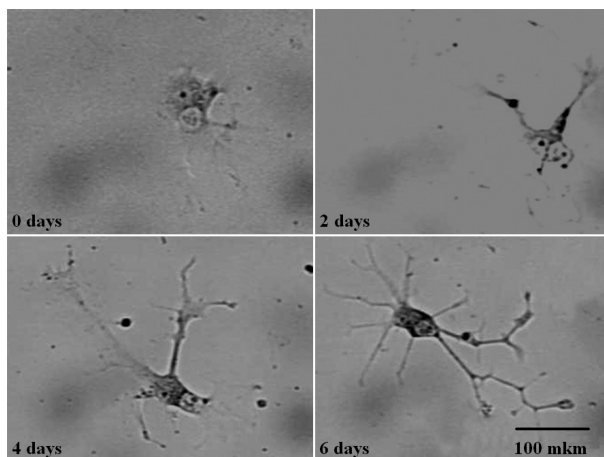


Рис. 12. Нейральная дифференцировка в клеточной линии из фолликулов волос человека после начала индуцированной дифференцировки

высевались при малой плотности и культивировались при 37 °С. Через 6 дней культивирование продолжали при 30 °С. В течение начального периода культивирования при 30 °С на всех участках происходило массовое изменение клеток в направлении нейральной дифференцировки, что проявлялось в появлении тонких длинных выростов, характерных для нейральных клеток (рис. 12), что подтверждает данные литературы о мультипотентности полученных клеточных культур.

Полученные результаты указывают на перспективность использования клеток из фолликулов волос человека для аутологичной трансплантации клеток.

Заключение

Показаны возможности использования метода прижизненной видеомикроскопии клеточных культур с помощью компьютерных видеокомплексов в медико-биологических научных исследованиях. Данный метод применим для изучения эффективности действия фармакологических препаратов, а также при санитарно-гигиеническом нормировании химических веществ на клеточных тест-системах. Так, например, при изучении противоракового действия препаратов можно определить концентрацию и необходимый период времени действия изучаемых веществ для подавления роста и гибели стандартных культур раковых клеток. Данные исследования можно проводить

и в клинических условиях на аутологичных культурах клеток пациента, что значительно повысит эффективность противораковой терапии. Особенно перспективным такой подход может стать при параллельном молекулярно-генетическом исследовании у конкретных пациентов полиморфизма генов, отвечающих за биотрансформацию ксенобиотиков. Опыт таких исследований в нашей лаборатории также имеется [30].

Прижизненную видеомикроскопию удобно использовать для разработки методологии клеточных биотехнологий, так как данный метод позволяет регистрировать всю последовательность изменений клеточных культур (усиление или замедление размножения, массовые изменения клеточного фенотипа, дифференцировку, гибель и т.п.).

Полученные фото/видео материалы прижизненной видеомикроскопии могут служить в качестве учебного пособия для студентов биологических, медицинских и сельскохозяйственных высших учебных заведений.

Список литературы

1. Штейн Г.И. Конфокальная микроскопия: мифы и реальность [Электронный ресурс] // Материалы Школы-семинара «Конфокальная микроскопия в биологии и медицине», Москва–Звенигород, 26–30 сентября 2005 г. – 2005. – Режим доступа: http://www.cytspb.rssi.ru/lab_stein1.pdf.
2. Дромашко С.Е., Квитко О.В., Конева И.И. и др. Компьютерная видеомикроскопия живых клеток: учебно-методическое пособие. – Минск: ИПНК, 2010. – 37 с.
3. Шейко Я.И., Квитко О.В., Конева И.И. и др. Видеомикроскопия живых клеток *in vitro* с помощью видеокомплекса «Цитомир». Методические рекомендации. – Минск: ООО «Полиграфт», 2014. – 52 с.
4. Swim H.E., Parker R.F. Culture characteristics of human fibroblasts propagated serially // Amer. J. Hyg. – 1957. – Vol. 66, No. 1. – P. 235–243.
5. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // Exp. Cell. Res. – 1961. – Vol. 25. – P. 177–185.
6. Bayreuther K., Rodemann H.P., Hommel R. et al. Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1988. – Vol. 85. – P. 5112–5116.
7. Bayreuther K., Francz P.I., Gogol J. et al. Terminal differentiation, aging, apoptosis, and spontaneous transformation in fibroblast stem cell systems *in vivo* and *in vitro* // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1992. – Vol. 663. – P. 167–179.
8. Simons J.W. Genetic, epigenetic, dysgenetic, and non-genetic mechanisms in tumorigenesis // Critical Reviews in Oncogenesis. – 1995. – Vol. 6, No. 3–6. – P. 261–273.
9. Hirschmann-Jax C., Foster A.E., Wulf G.F. et al. A distinct «side population» of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, No. 39. – P. 14228–14233.

10. Rajagopalan H., Lengauer C. Aneuploidy and cancer // Nature. – 2004. – Vol. 432. – P. 338–341.
11. Hansemann D. Ueber pathologische Mitosen // Arch. Pathol. Anat. Phys. Klin. Med. – 1891. – Vol. 119. – P. 299–326.
12. Saunders W.S., Shuster M., Huang X. et al. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 303–308.
13. Gisselsson D., Jonson T., Yu C. et al. Centrosomal abnormalities, multipolar mitoses, and chromosomal instability in head and neck tumours with dysfunctional telomeres // Br. J. Cancer. – 2002. – Vol. 87, No. 2. – P. 202–207.
14. Erenpreisa J.A., Cragg M.S., Fringes B. et al. Release of mitotic descendants by giant cells from irradiated Burkitt's lymphoma cell line // Cell. Biol. Int. – 2000. – Vol. 24, No. 9. – P. 635–648.
15. Walen K.H. The origin of transformed cells. Studies of spontaneous and induced cell transformation in cell cultures from marsupials, a snail, and human amniocytes // Cancer Genet. Cytogenet. – 2002. – Vol. 133. – P. 45–54.
16. Bayreuther K., Franck P.I., Gogol J. et al. Differentiation of primary and secondary fibroblasts in cell culture systems // Mutation Research. – 1991. – Vol. 256, No. 2–6. – P. 233–242.
17. Sundaram M., Guernsey D.L., Rajaraman M.M. et al. Neosis: a novel type of cell division in cancer // Cancer Biol. Ther. – 2004. – Vol. 3, No. 2. – P. 207–218.
18. Navolanic P.M., Akula S.M., McCubrey J.A. Neosis and its potential role in cancer development and chemoresistance // Cancer Biol. Ther. – 2004. – Vol. 2, No. 2. – P. 71–72.
19. Сапун А.С., Квитко О.В., Конева И.И. и др. Эпигенетические механизмы омолаживающей репарации стволовых клеток // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 9. – С. 747–748.
20. Сапун А.С., Квитко О.В., Конева И.И. и др. Спонтанная им-мортализация фибробластов мыши при длительном культиви-ровании *in vitro* // Молекулярная и прикладная генетика. – 2012. – Т. 13. – С. 118–125.
21. Шейко Я.И., Квитко О.В., Конева И.И. и др. Исследование эф-фектов рекомбинантного лактоферрина человека на проли-ферацию и апоптоз раковых и иммортализованных кле-ток // Молекулярная и прикладная генетика. – 2014. – Т. 18. – С. 77–83.
22. Morris V.L., MacDonald I.C., Koop S. et al. Early interactions of cancer cells with the microvasculature in mouse liver and muscle during hematogenous metastasis: videomicroscopic analysis // Clin. Exp. Metastasis. – 1993. – Vol. 11, No. 5. – P. 430–436.
23. Калашникова М.М. Явление клазматоза в печени в норме и при патологии // Бюлл. экс. биол. мед. – 1985. – Т. 100, № 9. – С. 355–358.
24. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects // Science. – 1987. – Vol. 238. – P. 163–170.
25. Rubin H. Cell damage, aging and transformation: a multilevel analysis of carcinogenesis // Anticancer Res. – 1999. – Vol. 19. – P. 4877–4886.
26. Квитко О.В., Жукова Л.Н., Конева И.И. Антираковый эффект экзогенных нуклеиновых кислот // Доклады АН Беларуси. – 1992. – Т. 36, № 7–8. – С. 652–655.
27. Rubin H. The role of selection in progressive neoplastic transformation // Adv. Cancer Res. – 2001. – Vol. 83. – P. 159–207.
28. Paus R., Botchkarev V.A., Botchkareva N.V. et al. The skin POMC system (SPS). Leads and lessons from the hair follicle // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1999. – Vol. 885. – P. 350–363.
29. Amoh Y., Li L., Katsuoka K. et al. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 5530–5534.
30. Чакова Н.Н., Михаленко Е.П., Полонецкая С.Н. и др. Полимор-физм GST-генов в ткани легкого больных раком легкого // Ци-тология и генетика. – 2009. – Т. 43, № 1. – С. 50–55.

Представлена В.А. Кунахом
Поступила 11.01.2016

ДОВГОТРИВАЛА ВІДЕОМІКРОСКОПІЯ ЖИВИХ КЛІТИН IN VITRO: МОЖЛИВОСТІ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

Я.І. Шейко, Н.А. Балашенко, О.В. Квітко, І.І. Конева,
С.Є. Дромашко

ДНУ «Інститут генетики і цитології НАН Білорусі»
Білорусь, 220072, Мінськ, вул. Академічна, 27
e-mail: Y.Sheiko@igc.bas-net.by

Мета. Прижиттєва відеомікроскопія клітин є високоінфор-мативним підходом у вивченні клітинних культур. Нерідко цей метод дозволяє уточнити і доповнити дані, отримані дослідниками при візуальному вивченні живих культур або фіксованих препаратів. Основна проблема тривалої при-життєвої відеомікроскопії – це підтримка життєдіяльнос-ті клітин. Для вирішення цієї проблеми був розроблений комп'ютерний відеокомплекс «Цитомір». **Методи.** У про-цесі культивування здійснюється фотографування заданих дослідником ділянок (від одного до декількох сотень) клі-тинної культури через певні проміжки часу (метод time-lapse photography). Моторизований предметний столик дозволяє переміщувати культуральну посудину за допо-могою джойстика, а також здійснювати сканування зада-них ділянок клітинної культури в автоматичному режимі. **Результати.** У наших дослідженнях вивчалися такі проце-си як клітинні поділи, загибель, диференціювання, рухли-вість і пов'язані з раковою трансформацією масові зміни клітинних культур, включаючи аномальні морфологічні змі-ни і агрегацію клітин. Показана також ефективність викори-стання вітальної мікроскопії клітин для тестування антира-кових препаратів. **Висновки.** Можливості відеокомплексу дозволяють застосовувати його в медико-біологічних на-укових дослідженнях, у розробці клітинних біотехнологій, вивченні дії фармакологічних препаратів та санітарно-гігіє-нічного нормування хімічних речовин на клітинних тест-си-стемах. Отримані за допомогою «Цитоміра» фотографії і ві-деозаписи також можуть служити як навчальні матеріали для студентів біологічних, медичних та сільськогосподар-ських вищих навчальних закладів.

Ключові слова: культури клітин, прижиттєва відеомікроскопія, диференціювання, проліферація, антираковий захист.

LONG-TERM VIDEOMICROSCOPY OF LIVING CELLS IN VITRO: OPPORTUNITIES AND PROSPECTS

Y.I. Sheiko, N.A. Balashenko, O.V. Kvitko, I.I. Koneva, S.E. Dromashko

Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus
Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27
e-mail: Y.Sheiko@igc.bas-net.by

Aim. Intravital video microscopy of cells is a highly informative approach to the study of cell cultures. Often, this method allows refining and complementing the data obtained by researchers at the visual study of living cultures or fixed preparations. The main problem of the long intravital video microscopy is the maintenance of cell activity. To solve this problem, video-computer «Tsitomir» has been developed. **Methods.** During

cultivation the images of the cell culture areas (from one to several hundred) specified by researcher are captured at regular intervals (time-lapse method of photography). A motorized sample stage allows moving the culture vessel with the joystick, as well as to scan the specified cell culture sites automatically. **Results.** In our investigations, we studied such processes as cell division, death, differentiation, motility and massive changes of cell cultures associated with cancerous transformation, including abnormal morphological changes and cell aggregation. The effectiveness of the intravital cell microscopy use to test the anti-cancer drugs is shown as well. **Conclusions.** Opportunities of video-complex enable its use in biomedical research, in the development of cell technologies, the study of the action of pharmacological agents and sanitary-hygienic regulation of chemicals in the cell assay systems. Obtained through «Tsitomir» photos and videos can also be used as educational material for students of biological, medical and agricultural universities.

Keywords: cell culture, intravital videomicroscopy, differentiation, proliferation, anti-cancer protection.