

Исследование жизнеспособности и дифференцировки генетически модифицированных клеточных культур в монослой методом оптической спектрофотометрии

Смирнова Оксана Дмитриевна

аспирант

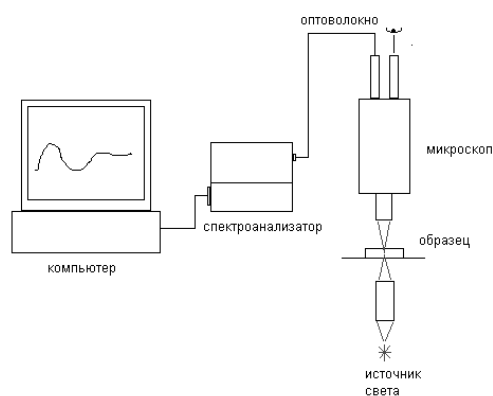
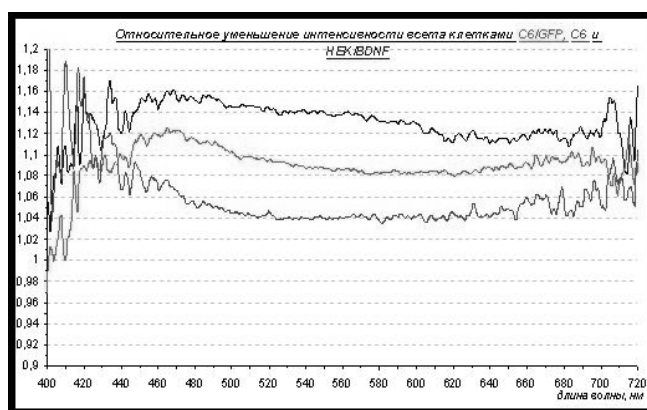
Институт биологии гена РАН, лаборатория нейрогенетики. Москва, Россия

E-mail: endorphin@bk.ru

Культивация клеток *in vitro* для исследования их свойств, для генетических модификаций и для дальнейших трансплантаций требует постоянного неповреждающего контроля за численностью, жизнеспособностью, генетическим статусом и экспрессией исследуемых генов всей культуры клеток в целом ($\sim 10^6$ штук). Живая клетка – сложная открытая коллоидная система сбалансированных сил. Натяжение её мембран уравнивается и электродинамическими процессами, - в результате на каждом определённом этапе клеточного цикла и генетического статуса поддерживается гомеостаз физико-химических параметров фазового состава клетки. Специфическая для данного статуса форма (проявляемая при прикреплении клетки к подложке и необходимая для дифференцировки и генетической экспрессии) неотъемлемо связана с организацией цитоскелета. Это отражается на параметрах светорассеяния.

В работе было экспериментально исследовано влияние жизнеспособности, численности и генетического статуса клеток в культуре на спектральные характеристики её нормального светопоглощения с целью дальнейшей разработки методики неповреждающего контроля за генетическим статусом культивируемых клеточных линий *in vitro*. Для этого были созданы генетические конструкции, содержащие вставки генов нейральных факторов: GDNF, NGF, BDNF - и маркерного флюоресцентного белка GFP, - которыми были трансфицированы клетки HEK-293 и С6. Полученные клетки культивировались в специальных флаконах, где клетки оседали и прикреплялись к плоскому дну, образуя монослой. Разработанная В.А. Павловым спектрофотометрическая установка позволила регистрировать интенсивность пропускаемого через образцы света в диапазоне 400÷720 нм с одновременной визуализацией через окуляр микроскопа. Для всех исследуемых клеточных линий были получены спектры поглощения, результаты которых были сопоставлены с соответствующими спектральными данными,

схема экспериментальной установки



полученными на спектрофотометрах Genesys 10UV и Ultrospec II 4050.

В результате было выявлено, что каждый тип культуры характеризуется своим уникальным спектром поглощения, в зависимости от формы клеток, их плотности и межклеточной организации. Выявлен набор спектральных участков, соотношение величин нормального светопоглощения по которым способно характеризовать генетический статус исследуемых клеток. Таким образом, каждому типу клеток и их организации *in vitro* может быть сопоставлен набор чисел, характеризующих величину относительного поглощения в культуре на участках спектра, которые наиболее различны

для разных типов, - относительно выбранного наиболее устойчивого (с минимальным для всех культур светорассеянием).