

С.Ю. ХАЙТЛИНА, Н.А. ОДИНЦОВА

## Развитие клеточных технологий в Институте биологии моря ДВО РАН

*Приведена информация о развитии технологий исследования клетки в ННЦМБ ДВО РАН, у истоков которых стоял Г.П. Пинаев. Рассказано о его участии как организатора в жизни института, биостанции «Восток» и двух лабораторий (лаборатория биофизики клетки и лаборатория клеточных технологий).*

*Ключевые слова: Пинаев, Институт цитологии РАН, Институт биологии моря ДВО РАН, лаборатория биофизики клетки, лаборатория клеточных технологий.*

**Development of cell technologies in the Institute of Marine Biology, FEB RAS.** S.Yu. KHAITLINA (Institute of Cytology, RAS, Sankt-Petersburg), N.A. ODINTSOVA (National Scientific Center of Marine, FEB RAS, Vladivostok).

*The article reports on the development of cell investigation technologies in A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, whose originator was G.P. Pinaev. He was presented as an organizer of the life in Institute, "Vostok" biological station and two laboratories (Cell Biophysics laboratory, Cytotechnology laboratory).*

*Key words: Pinaev, Institute of Cytology of RAS, Institute of Marine Biology, FEB RAS, Cell Biophysics laboratory, Cytotechnology laboratory.*

Начало разработки клеточных технологий в ННЦМБ ДВО РАН связано с именем Георгия Петровича Пинаева. Большую часть своей жизни он проработал в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург). После окончания кафедры биохимии биолого-почвенного факультета Ленинградского университета и аспирантуры на кафедре биохимии Ленинградского медицинского педиатрического института под руководством академика Ильи Ильича Иванова Георгий Петрович в 1964 г. с большим успехом защитил кандидатскую диссертацию на тему «Качественные изменения структуры сократительных белков в процессе развития мышечной ткани». Еще до защиты диссертации он был принят в Институт цитологии в лабораторию биохимических основ репродукции клетки, которой руководил Владимир Иосифович Воробьев. Продолжить исследование сократительных белков в этой лаборатории, созданной для изучения проблем молекулярной биологии, было невозможно. Тем не менее, эта работа была Георгием Петровичем продолжена, и произошло это благодаря созданию Института биологии моря ДВО РАН.

Как пишет Георгий Петрович в своих воспоминаниях, к нему обратился бывший сотрудник Института цитологии Алексей Викторович Жирмунский, который стал директором Института биологии моря во Владивостоке, с просьбой подготовить молодых сотрудников для новой лаборатории биофизики клетки, которая занималась бы биофизическими, биохимическими и молекулярно-биологическими исследованиями морских организмов. Это предложение позволило Георгию Петровичу собрать группу молодых сотрудников, состоящую из аспирантов Института биологии моря ДВО РАН (Николай Шелудько,

---

ХАЙТЛИНА Софья Юрьевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), \*ОДИНЦОВА Нэлия Адольфовна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник (Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток). \*E-mail: nelodin@mail.ru

София Хайтлина, Александр Тартаковский, Владимир Матвеев, Олег Глебов, Ольга Подгорная) и примкнувшего к ним Бориса Маргулиса, и продолжить исследования структуры и свойств мышечных белков сократительного аппарата моллюсков. В конце 1960-х годов сотрудники группы начали осваивать лабораторию на биостанции «Восток» (Находкинский район Приморского края), а после 1972 г. в лаборатории начались систематические исследования, в том числе при совместной работе с сотрудниками Института биофизики РАН (Пушино). Таким образом, благодаря Г.П. Пинаеву была создана одна из ведущих в нашей стране научных школ в области изучения биологической подвижности. В настоящее время это пять докторов наук и их ученики, уже вырастившие немалое количество своих учеников.

Г.П. Пинаев вложил много собственного труда и организаторских усилий для строительства и функционирования биостанции «Восток» как филиала Национального научного центра морской биологии ДВО РАН (фото 1). До сих пор на потолке веранды лаборатории биофизики клетки (ННЦМБ ДВО РАН) на биостанции есть благодарные подписи специалистов из разных уголков нашей страны, проработавших там какое-то время. И конечно, никто из приехавших на биостанцию «Восток» не забудет легендарных балетов, поставленных под руководством Георгия Петровича к празднику Дня моря в разные годы. Это была еще одна грань его творческой натуры (фото 2). Многим удалось не только увидеть эти замечательные балеты, но и поучаствовать в них.

После того как первые аспиранты Г.П. Пинаева защитили кандидатские диссертации, в Институте биологии моря была создана лаборатория биофизики клетки, заведующим которой с момента ее основания является д.б.н. Н.С. Шелудько. Исследования, проводимые в лаборатории, направлены на выявление особенностей сократительного аппарата моллюсков по сравнению с сократительным аппаратом скелетных мышц позвоночных животных (фото 3, семинар). Свойства основных белков и состав регуляторных сократительных белков в разных сократительных системах различны, и именно эта вариабельность может определять функциональные свойства систем и их отличие друг от друга. Поэтому одной



Фото 1. Восток, первые палатки (1970 г.). Фото из личного архива С.Ю. Хайтлиной



Фото 2. Один из первых балетов под руководством и при участии Г.П. Пинаева на Востоке (около 1980 г.). Фото из личного архива С.Ю. Хайтлиной

из важнейших проблем биологической подвижности является сопоставление физиологических и структурных особенностей разных мышц с биохимическим составом и свойствами сократительного аппарата этих мышц. Гладкие мышцы двустворчатых моллюсков обладают специфической способностью находиться в таком состоянии, при котором высокое и длительное механическое напряжение поддерживается при очень низком уровне гидролиза АТФ. Такое состояние в гладких мышцах позвоночных известно как latch. В гладких



Фото 3. Семинар в лаборатории биофизики клетки. В центре – руководитель лаборатории биофизики клетки д.б.н. Н.С. Шелудько (2006 г.). Фото из личного архива Н.А. Одинцовой

мышцах моллюсков это состояние особенно ярко выражено как запирающий тонус, или catch. Исследования ряда лет связывали эту особенность сокращения мышц моллюсков с присутствием белка толстых нитей парамиозина. Работы, проведенные в лаборатории, показали, что твитчин, титино-подобный белок запирающих мышц моллюсков, взаимодействует с фибриллярным актином, и это взаимодействие регулируется с помощью фосфорилирования твитчина. Согласно гипотезе «твитчин-актиновых сшивок», в основе запирающего тонуса мышц двустворчатых моллюсков лежит образование «твитчин-актиновых сшивок» между толстыми и тонкими нитями [2, 6, 7]. Эти представления были уточнены после того, как был открыт новый белок запирающих мышц моллюсков – миород. Расположенный на поверхности толстых нитей вместе с твитчином и миозином, он является продуктом альтернативного сплайсинга гена тяжелой цепи миозина, который содержит С-концевую часть миозина и уникальный N-концевой домен. N-концевой домен фосфорилируется с помощью киназы легких цепей миозина и твитчина [2, 3, 4]. Существует предположение, что в комплексе твитчин–миозин–миород последний является силовой сшивкой, в то время как твитчин играет регуляторную роль.

Наряду с этими результатами важными достижениями лаборатории являются разработка принципиально нового метода получения  $Ca^{2+}$ -регулируемых тонких нитей из гладких мышц двустворчатых моллюсков; открытие кальпонина в тонких нитях мышц беспозвоночных и детальное исследование его физико-химических свойств [1]; изучение белков запирающих мышц мидии *Crenomytilus grayanus*, обеспечивающих  $Ca^{2+}$ -чувствительность тонких нитей, их выделение и идентификацию [8]; разработка оригинального метода получения «натурального» фибриллярного актина и сравнение его свойств со свойствами скелетно-мышечного и гладкомышечного актина, полученного классическим методом [5]. Развитие этих исследований необходимо для понимания механизма, регулирующего catch-сокращение замыкательных мышц двустворчатых моллюсков.

По инициативе проф. Георгия Петровича Пинаева в 1986 г. в лаборатории биофизики клетки была организована группа по культивированию клеток морских беспозвоночных под руководством А.В. Хоменко, бывшего аспиранта Пинаева. В 2009 г. на базе этой группы была создана новая лаборатория клеточных технологий под руководством проф. Н.А. Одинцовой (фото 4) для разработки технологий индукции пролиферации стволовых клеток морских гидробионтов и их дифференцировки в определенный клеточный тип, поскольку для решения целого ряда задач современной биологии и медицины



Фото 4. Лаборатория клеточных технологий (2019 г.). Фото из личного архива Н.А. Одинцовой

необходимо исследование стволовых клеток разного происхождения. Пинаев всегда считал, что важно понять различия между стволовыми клетками беспозвоночных и позвоночных животных не только морского происхождения. Сейчас достигнут значительный прогресс в исследовании регуляторных механизмов роста и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток морских гидробионтов, проведен поиск генов, участвующих в процессах их специализации: при пигментной (фото 5) и спикулогенной дифференцировке у иглокожих, при мышечной дифференцировке у моллюсков. Особое внимание уделено анализу экспрессии генов, связанных с внеклеточным матриксом и рецепторами адгезии. Для исследования молекулярных механизмов наследования у различных беспозвоночных животных с детерминированным эмбриогенезом были изучены процессы, происходящие в их первичных половых клетках при подавлении транскрипции. Кроме того, в новой лаборатории клеточных технологий ведется разработка технологий криосохранения клеток морских гидробионтов и исследование механизмов криоустойчивости их клеток, начатые еще Г.П. Пинаевым. В настоящее время установлена мембранстабилизирующая роль экзогенных липидов морских гидробионтов и различных антиоксидантов; обнаружено, что некоторые компоненты криозащитных растворов обладают способностью существенно изменять форму и размеры микрочастиц льда, продолжено исследование путей гибели клеток морских беспозвоночных в ответ на холодовой стресс. Впервые установлено, что помимо механического разрушения клеток, которое было связано с самим процессом замораживания, большинство клеток личинок морских беспозвоночных погибали в результате некроза или апоптоза, которые развивались в процессе их культивирования после оттаивания. Апоптоз – не основной путь смерти клеток этих животных после криоконсервации, но его индукция происходила в значительной части клеток сразу после оттаивания и зависела от типа используемого криопротектора. Были обнаружены нарушения в структуре ядер, которые следует учитывать при оценке эффективности криоконсервации. Если бы ингибиторы апоптоза, известные для клеток млекопитающих, могли заблокировать апоптоз после замораживания клеток морских беспозвоночных, это способствовало бы более высокому выходу жизнеспособных клеток. Однако уменьшить апоптоз после замораживания-оттаивания пока не удалось. Анализ изменений, происходящих в клетках морских гидробионтов после холодового стресса, проведенный с помощью разных методов, может стать ключом для идентификации механизмов их приспособления к изменению условий среды. Мы планируем продолжать привлекать новых молодых специалистов к основным исследованиям лаборатории.



Фото 5. Н.В. Агеевко индуцирует нерест у плоских морских ежей для исследований по пигментной дифференцировке (2015 г.). Фото из личного архива Н.А. Одиной

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dobrzhanskaya A.V., Vyatchin I.G., Lazarev S.S. et al. Molluscan smooth catch muscle contains calponin but not caldesmon // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2013. Vol. 34, N 2. P. 23–33.
2. Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S., Permyakova T.V. et al. Catch muscle of bivalve molluscs contains myosin and twitchin-associated protein kinase phosphorylating myosin // *BBA-Proteins and Proteomics.* 2010. Vol. 1804, N 4. P. 884–890.

3. Matusovsky O.S., Shevchenko U.V., Matusovskaya G.G. et al. Catch muscle myorod modulates ATPase activity of myosin in a phosphorylation-dependent way // *PLoS one*. 2015. Vol. 10, N 4. P. e0125379.
4. Matusovsky O.S., Matusovskaya G.G., Dyachuk V.A. et al. Molluscan catch muscle myorod and its N-terminal peptide bind to F-actin and myosin in a phosphorylation-dependent manner // *Arch. Biochem. and Biophys.* 2011. Vol. 509, N 1. P. 59–65.
5. Shelud'ko N.S., Girich U.V., Lazarev S.S. et al. Non-Straub type actin from molluscan catch muscle // *BBRC*. 2016. Vol. 474, N 2. P. 384–387.
6. Shelud'ko N.S., Matusovskaya G.G., Permyakova T.V. et al. Twitchin, a thick-filament protein from molluscan catch muscle, interacts with F-actin in a phosphorylation-dependent way // *Arch. Biochem. and Biophys.* 2004. Vol. 432, N 2. P. 269–277.
7. Shelud'ko N.S., Matusovsky O.S., Permyakova T.V. et al. «Twitchin–actin linkage hypothesis» for the catch mechanism in molluscan muscles: evidence that twitchin interacts with myosin, myorod, and paramyosin core and affects properties of actomyosin // *Arch. Biochem. and Biophys.* 2007. Vol. 466, N 1. P. 125–135.
8. Vyatchin I.G., Shevchenko U.V., Lazarev S.S. et al. Troponin-like regulation in muscle thin filaments of the mussel *Crenomytilus grayanus* (Bivalvia: Mytiloidea) // *BBA-Proteins and Proteomics*. 2015. Vol. 1864, N 10. P. 1444–1450.