

*На правах рукописи*

**ВОЛКОВА ИРИНА МИХАЙЛОВНА**

**Разработка технологии получения мяса *in vitro* и перспективы его  
использования**

05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и  
холодильных производств

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание учёной степени**

**кандидата технических наук**

Москва-2013

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств» Министерства образования и науки РФ и в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко Российской академии сельскохозяйственных наук

Научные руководители: академик РАСХН, д.т.н., профессор  
**Рогов Иосиф Александрович**

д.б.н., профессор  
**Савченкова Ирина Петровна**

Официальные оппоненты:

**Кудряшов Леонид Сергеевич**, д.т.н., профессор, ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии, главный научный сотрудник

**Воротеляк Екатерина Андреевна**, д.б.н., ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, старший научный сотрудник; кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доцент

Ведущая организация:

**ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН (ГНУ ВНИИСБ Россельхозакадемии)**

Защита состоится «25» июня 2013 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета ДМ 006.021.01 при Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии по адресу: 109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии.

Автореферат разослан «23» мая 2013 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат технических наук,  
старший научный сотрудник

А. Н. Захаров

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Серьезную проблему современного мира представляет постоянное увеличение численности населения. Очевидно, что чем больше становится людей, тем больше территорий и продуктов питания потребуется человечеству. Рост объемов производства мяса в глобальном масштабе будет всё глубже обострять сопряжённые с ним проблемы, к которым мы относим неэффективное использование энергетических и трудовых ресурсов (FAO, 2011; Capper J.L., 2011). Кроме того, будет возрастать нагрузка на окружающую среду (Cederberg C. et al., 2011; FAO, 2006; Thornton P.K., 2010).

В ходе современной научно-технической революции человек пытается решить проблему питания путём повышения продуктивности животноводства, птицеводства и рыболовства, совершенствования существующей технологии переработки сырья и его более полного использования. Неизбежно будут появляться всё новые методы и способы производства животного полноценного белка. К таким новым методам можно отнести мышечную ткань сельскохозяйственных животных, выращенную *in vitro*.

По сравнению с традиционной мясной индустрией производство мяса *in vitro* (культурального мяса) имеет определённые преимущества. В нём соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот поддается строгому контролю; риск проявления болезней, связанных с употреблением пищи, значительно снижен; кроме того ресурсы могут использоваться более эффективно, поскольку отпадает необходимость в воспроизводстве биологических объектов. Способ получения мяса *in vitro* является гуманным, поскольку для получения клеток не требуется убивать животное.

Уровень развития науки и практики культивирования клеток, тканевой инженерии, биотехнологии к началу XXI века достиг достаточно высокого уровня, что идея создания мяса *in vitro* почти одновременно стала очевидной для многих зарубежных (Нидерланды, США, Австрия, Великобритания и др.) (Edelman P.D. et al., 2005; Van Eelen W.F., 2007; Haagsman H.P. et al., 2009; Langelaan M.L.P. et al., 2009; Post M.J., 2012) и российских исследователей (Рогов И.А. и др., 2008). Первые исследования, проведенные в России под руководством академика РАСХН Рогова И.А., позволили предложить оригинальный способ накопления клеток мышечной ткани с использованием отечественных разработок.

Основным вопросом является выбор типа клеток. Учёные, занимающиеся данным направлением, используют в своих экспериментах различные типы клеток: миобласты, эмбриональные, сателлитные, мезенхимные стволовые. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК) обладают способностью самообновляться *in vitro* без

анеуплоидии, генетической нестабильности и малигнизации. Они могут пролиферировать в культуре длительное время, формируя стабильные диплоидные клеточные линии. При индукции к дифференцировке они формируют *in vitro* клетки других тканей (жировой, мышечной, костной и др.). Доступность биологического материала - костный мозг (КМ) и жировая ткань (ЖТ), - из которых можно выделить клетки со свойствами и признаками ММСК, делает это направление актуальным. ММСК имеют ряд достоинств, одним из которых является возможность их культивирования в трёхмерной структуре. Они могут заселять матрицу-носитель, дифференцироваться в заданном направлении и формировать трёхмерные структуры, которые позволяют моделировать ту или иную ткань *in vitro*. Учитывая вышеизложенное, тема диссертационной работы является актуальной, а также представляет научный и практический интерес.

**Цель и задачи исследований.** Целью настоящей работы была разработка технологии получения мяса *in vitro*, наиболее близко отвечающего важнейшим качественным показателям мяса говядины. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи.

1. Выделить из КМ и ЖТ взрослых особей крупного рогатого скота (КРС) клетки с совокупностью свойств и признаков мультипотентных мезенхимных стволовых.
2. Изучить свойства и признаки полученных ММСК КРС.
3. Депонировать полученные культуры клеток в Специализированную Коллекцию постоянных соматических клеточных культур (СХЖ РАСХН) ВИЭВ с последующим получением патента.
4. Определить способность ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС, формировать *in vitro* клетки мышечной ткани:
  - провести сравнительный анализ эффективности трёх индукционных сред направлять ММСК в клетки мышечной ткани *in vitro*;
  - провести анализ полученных клеток мышечной ткани на уровне экспрессии генов-маркёров миогенеза.
5. Изучить фракционный состав белков и общий аминокислотный состав полученной клеточной биомассы в сравнении с мясом говядины.
6. Разработать рекомендации по дальнейшему использованию полученного мяса *in vitro*.

**Научная новизна работы.** Получены и охарактеризованы ММСК, выделенные из КМ и ЖТ КРС, которые являются новым и перспективным источником для создания мяса *in vitro*. Подобраны рациональные условия выделения этих культур клеток.

Аналитически и экспериментально обоснованы рациональные условия для направленной дифференцировки ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС, в клетки мышечной ткани *in vitro*. Проведён сравнительный анализ эффективности трёх различных индукторов (5-азацитидин, 5-аза-2'-деоксицитидин и ретиноевая кислота).

Изучены фракционный состав белков и общий аминокислотный состав полученной клеточной биомассы, которые во многом совпадают с показателями мышечной ткани говядины.

Получены новые фундаментальные знания, которые могут применяться во многих областях науки: биотехнология, технология мяса, тканевая и регенеративная медицина, ветеринария.

**Практическая значимость работы.** ММСК, выделенные из КМ и ЖТ КРС, депонированы в Специализированную Коллекцию перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных при ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии (СХЖ РАСХН) под №79 и №80, соответственно.

Получено положительное решение о выдаче патентов РФ по заявкам № 2011149133/10 (073706) и № 2011149132/10 (073705) от 02.12.2011 г.

Представленная научно-исследовательская работа закладывает основы будущей биотехнологии получения мяса *in vitro* в промышленном масштабе.

Методика получения и культивирования ММСК сельскохозяйственных животных отработана и используется в секторе стволовой клетки ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии, а также на кафедре «Технология мяса и мясных продуктов» ФГБОУ ВПО МГУПП в научно-исследовательской работе.

Даны рекомендации по дальнейшему использованию мяса *in vitro*.

#### **Основные положения и результаты, выносимые на защиту**

1. Изучение свойств и признаков ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС.
2. Дифференцировка ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС, в направлении миогенеза *in vitro*.
3. Электрофоретический анализ фракций белков и общий аминокислотный состав полученной клеточной биомассы.
4. Рекомендации по дальнейшему использованию полученного мяса *in vitro*.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы докладывали и обсуждали на Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (М., 2011, 2013); Международной научной конференции молодых учёных и специалистов в Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева (М., 2011); II Международной Интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий» (2011); IX

Международной научно-практической конференции «Технологии и продукты здорового питания. Функциональные продукты питания» (М., 2011); Международных научных конференциях студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» (М., 2011, 2012); XII Молодёжной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (М., 2012); Международной виртуальной интернет конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (2012); Международной научно-практической конференции «Трансмиссивные болезни животных: актуальные аспекты биобезопасности и контроля» (Украина, 2012).; 15-ой международной научной конференции памяти В.М. Горбатова «Мясная промышленность – приоритеты развития и функционирования» (М., 2012).

Работа награждена дипломом и медалью в конкурсе молодых учёных на лучшую научно-исследовательскую работу, проводимом в рамках Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (М., 2013).

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в т.ч. 3 статьи в изданиях, которые входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ.

**Личный вклад соискателя.** Автор самостоятельно выполнял все этапы работы, в т.ч. анализ и обобщение полученных результатов исследований, подготовка публикаций и патентов.

Автор приносит глубокую благодарность за оказание научно-методической помощи к.т.н. М.П. Артамоновой и к.т.н. Н.Л. Востриковой. В выполнении отдельных этапов работы принимали участие н.с. Е.В. Викторова, к.б.н. К.В. Кулешов, К.Г. Таранова, за что автор приносит им глубокую благодарность.

**Объём и структура диссертации.** Материалы диссертации изложены на 148 страницах машинописного текста, которые включают введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, собственные исследования и обсуждение полученных результатов, рекомендации по дальнейшему применению полученной технологии, выводы. Список литературы состоит из 162 библиографических источников, в т.ч. 110 на иностранных языках. Работа иллюстрируется 13-ю таблицами, 28-ю рисунками и содержит 5 приложений.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Материалы и методы исследований

Работа с культурами клеток ММСК выполнена на базе сектора стволовой клетки ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии. Работа по изучению показателей качества проведена на кафедре «Технология мяса и мясных продуктов» ФГБОУ ВПО МГУПП и в лаборатории научно-методических работ и контрольно-аналитических исследований ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии. На рис. 1 представлена общая схема эксперимента.

Костный мозг (КМ) и жировую ткань (ЖТ) получали от клинически здоровых коров породы Голштинская в возрасте 3-х лет в совхозе «Знаменский» Каширского района Московской области в стерильных условиях. Манипуляции с клетками проводили в ламинарном боксе биологической защиты ESCO класса II серии AC2, подающем горизонтальный стерильный поток воздуха (ESCO, Сингапур). Основной средой для культивирования служила среда Игла в модификации Дюльбекко, содержащая 1 г/л глюкозы (DMEM-LG), дополненная 10% сыворотки крови плодов коров (СКПК) (HyClone, Perbio, Бельгия) и антибиотиками. Клетки с фенотипом подобным ММСК из КМ и ЖТ КРС выделяли по методике, описанной ранее (Савченкова И.П. и др., 2010). Длительное культивирование ММСК из КМ и ЖТ КРС проводили путем периодического пассирования. Культивирование клеток проводили в открытой системе в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с воздушной рубашкой типа LCO-266AIR, обеспечивающим определенную влажность воздуха, температуру (+37°C) и содержание CO<sub>2</sub> в воздухе (5%).

Анализ жизнеспособности проводили по стандартной методике посредством окрашивания 0,1% раствором трипановой сини. Морфологическую характеристику полученных популяций клеток проводили визуально с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа фирмы Carl Zeiss и программы AxioVision Rel. 4.8. В качестве основных критериев использовали размер и форму клеток, ядерно-цитоплазматическое отношение, гомогенность цитоплазмы и наличие ядрышек в ядре. Оценку проводили как в нативных препаратах, так и в препаратах, окрашенных по Романовскому-Гимза. Митотический индекс для каждой популяции клеток рассчитывали в фазе логарифмического роста как отношение числа митозов к общему числу подсчитанных клеток (не менее  $1 \times 10^6$ ), умноженной на 1000 (%). Эффективность клонообразования оценивали посредством посева клеток в концентрации  $1 \times 10^3$  в культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup>. Эффективность клонообразования рассчитывали как отношение общего числа посеянных клеток к числу образованных клонов на 7-10 сут.

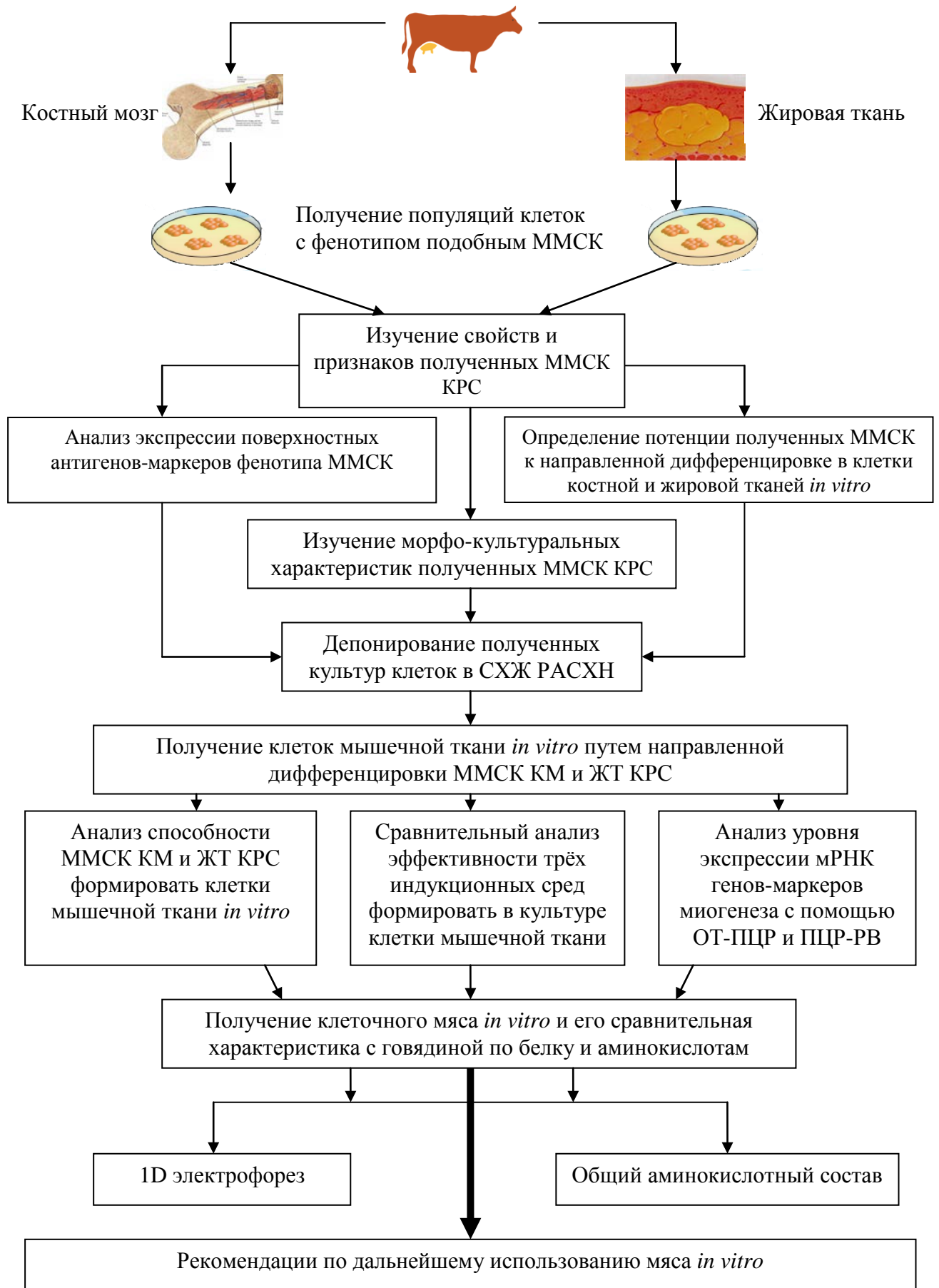


Рис. 1. Схема эксперимента.



Для выявления поверхностных антигенов (АГ) клетки анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Epics Elite Culture. Первичные мышинные антитела (АТ), используемые в экспериментах, были против АГ мыши: CD44, CD90, CD29, CD34, CD45 и CD31 (Sigma, Германия) и (BD Bioscience Pharmingen, США). В качестве вторичных АТ использовали козы АТ против IgG мыши, меченные FITC (флуоресцеин) фирмы (BD Pharmingen, США). Также использовали моноклональные антитела (МАТ) кролика против Коллагена I-го типа КРС, меченные FITC фирмы (Sigma, Германия).

Способность ММСК к направленной дифференцировке в остео- и адипо- направлениях проводили согласно методике (Савченкова И.П. и др., 2010). Индукторами остеогенной дифференцировки были дексаметазон (KRKA, Словения) ( $10^{-7}$  М),  $\beta$ -глицерофосфат (Sigma, США) (10 мМ) и аскорбиновая кислота (Sigma, США) (0,2 мМ). Индукторами для адипогенной дифференцировки были дексаметазон (KRKA, Словения) ( $10^{-7}$  М) и инсулин (Sigma, США) ( $10^{-9}$  М). Эффективность потенции ММСК из КМ и ЖТ формировать костную и жировую ткани *in vitro* оценивали на 21-28 сут культивирования в индукционных средах. Для подтверждения морфологических изменений вследствие дифференцировки клетки окрашивали красителем Oil Red O (Bio Optica Milano s.p.a., Италия) для выявления адипогенной дифференцировки и методом серебрения по von Kossa (Sigma-Aldrich, Германия) для выявления остеогенной дифференцировки.

Депонирование полученных культур клеток ММСК, выделенных как из КМ, так из ЖТ КРС, проводилось согласно требованиям, предъявляемым Специализированной Коллекцией перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промышленных животных РККК (П), СХЖ РАСХН. Хранение и депонирование клеток осуществляли в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  в сосуде Дьюара.

Способность ММСК к направленной дифференцировке в клетки мышечной ткани проводили согласно зарубежным методикам (Colleoni S. et al., 2005; Wakitani S. et al., 1995; Su Z. et al., 2010). В качестве индукторов использовали 5-азациитидин, 5-аза-2'-деоксицитидин (аналоги цитозина), обладающие деметилирующей активностью, и ретиноевую кислоту. Способность ММСК, выделенных как из КМ, так и из ЖТ, формировать под воздействием различных индукторов клетки мышечной ткани *in vitro* оценивали в динамике (на 21, 28 и 33 сут дифференцировки). Морфологические изменения ММСК вследствие дифференцировки проводили визуально как в нативных препаратах, так и в окрашенных по Романовскому-Гимза с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа. В качестве контроля были использованы клетки, культивируемые в среде без индукторов. Часть клеток параллельно на 21 сут дифференцировки использовали для выделения суммарной мРНК.

Из-за отсутствия красителей, в том числе МАТ против АГ КРС, позволяющих подтвердить факт дифференцировки, проводили обратную транскрипцию с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) по уровню экспрессии мРНК генов-маркёров миогенеза: *MYOD1* (миогенная дифференцировка 1) и *MYOG* (миогенин), а также полимеразную цепную реакцию с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для оценки количества копий генов в режиме относительных измерений ( $\Delta\Delta C_t$ -метод) (Livak K.J. et al., 2001). Относительный уровень экспрессии генов *MYOD1* и *MYOG* определяли относительно уровня постоянно экспрессирующегося гена *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы). ОТ-ПЦР проводили на приборе "Терцик" (Россия). ПЦР-РВ проводили на приборе RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия).

Для получения клеточной биомассы (мяса *in vitro*) проводили поверхностное культивирование ММСК в культуральных матрасах с площадью поверхности 225 см<sup>2</sup> с последующим воздействием ретиноевой кислотой в качестве индуктора для миогенной дифференцировки.

Исследования фракционного состава белков в полученной клеточной биомассе проводили методом одномерного электрофореза, основываясь на литературных данных, представленных в книге Л. А. Остермана (Остерман Л.А., 1981). Электрофорез проводили на приборе Consort E833 (Sigma, США). После фиксации, окраски и высушивания геля с помощью программы GeneTool фотографировали пленку с гелем в специальном аппарате SYNGENE Bio Imaging systems, с помощью программы GeneSnap обрабатывали сканированную фотографию.

Изучение общего аминокислотного состава опытных образцов проводили по стандартным методикам (Иванкин А.Н. и др., 2010) на автоматическом аминокислотном анализаторе Aracus (Abacus, Германия) методом постколоночной дериватизации нингидрином после кислотного гидролиза. Определение общих аминокислот проводили в соответствии с руководством по эксплуатации анализатора Aracus.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Выделение колоний ММСК из КМ и ЖТ КРС

В основе метода выделения ММСК из КМ лежит принцип разделения клеток в градиенте плотности фиколла ( $\rho=1,077$  г/мл) (Ficoll-Raque, Pharmacia, Швеция). Разбавленный КМ по стенке наслаивали на градиент фиколла в соотношении 1:4. Раствор имел комнатную температуру. Пробирки с КМ, наслаиваемым на фиколл, центрифугировали при 1000 г в течение 30 мин при комнатной температуре и выделяли фракцию моноядерных клеток. Далее полученную взвесь клеток промывали в растворе ФСБ-2 и трижды осаждали центрифугированием при 400 г в течение 10 мин. После последнего осаждения удаляли

надосадочную жидкость, полученный осадок разбавляли средой DMEM-LG и перемешивали. Число выделенных клеток оценивали подсчётом в камере Горяева. Высеивали в концентрации  $1,1 \times 10^6$  в культуральный флакон с площадью поверхности  $25 \text{ см}^2$ . Через 24 ч производили смену среды, оставшиеся прикрепленные клетки оставляли на доращивание.

В основе метода выделения ММСК из ЖТ лежит принцип ферментативной обработки жира коллагеназой. Для этого ЖТ трёхкратно промывали в ФСБ-2 с антибиотиками (пенициллин 100 ед./мл, стрептомицин 100 мкг/мл), измельчали и подвергали ферментативной обработке 0,01%-ным раствором смеси коллагеназ типов I и II на основе DMEM-LG при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Коллагеназу нейтрализовали эквивалентным объёмом питательной среды DMEM-LG, дополненной 10% СКПК, и центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. Клетки еще дважды осаждали центрифугированием при 800 g в течение 10 мин и пропускали последовательно через фильтры с размером пор 80 мкм (для клеток стромально-васкулярной фракции) и затем 10-7 мкм (для селекции стволовых).

#### **Морфо-культуральные характеристики полученных культур ММСК, выделенных как из КМ, так и из ЖТ КРС**

Культуры ММСК, выделенные из КМ и ЖТ КРС, обладают фибробластоподобной морфологией. Известно, что ММСК обладают высокой адгезией к культуральному пластику (Friedenstein A.J. et al., 1970), а также высокой эффективностью образовывать колонии *in vitro* (Чайлахян Р. К. и др., 1970; Smith J.R. et al., 2004). При посеве в низкой концентрации клетки, выделенные из КМ и ЖТ КРС, были способны образовывать колонии фибробластоподобных клеток на 7-10 сут (Рис. 2). Эффективность клонообразования для ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС, составила 93% и 88%, соответственно. Также было экспериментально установлено, что ММСК обладают способностью многократно пролиферировать в культуре (более 80 цитогенераций). Время цитогенерации для культур ММСК КМ КРС и ММСК ЖТ КРС составило 24 и 36 ч, а митотический индекс – 45 и 34 %, соответственно.

#### **Анализ экспрессии поверхностных антигенов-маркёров фенотипа ММСК**

Клетки на 3 пассаже анализировали на экспрессию поверхностных АГ (реакция непрямой иммунофлуоресценции). Цитофлуориметрический анализ выявил на их поверхности наличие АГ, экспрессия которых характерна для ММСК. Как видно из результатов, представленных в табл. 1, популяции клеток, выделенные из КМ и ЖТ КРС, были положительны по экспрессии CD44, CD90, CD29, Коллагена I-го типа и отрицательны по экспрессии генов, характерных для гематопоэтических CD34, CD45 и эндотелиальных клеток CD31. Популяции клеток, выделенные из КМ и

ЖТ КРС, по основным маркерам демонстрировали сходный иммунофенотип, характерный для ММСК.

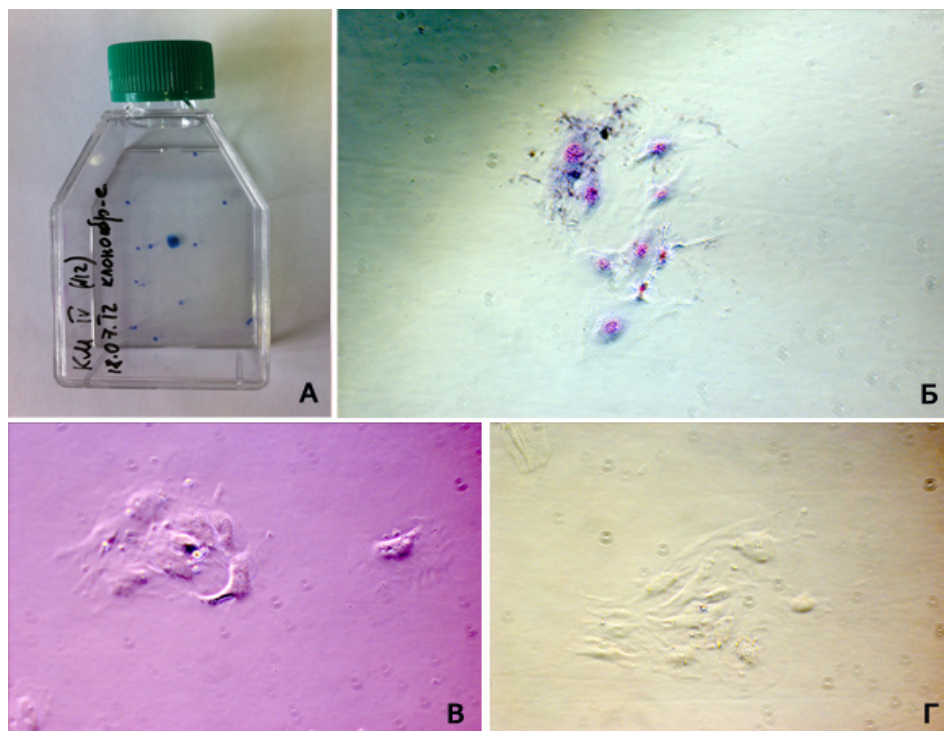


Рис. 2. Клонообразующие способности ММСК: А, Б - окраска по Романовскому-Гимза: колонии ММСК, выделенных из КМ КРС, на 7-е сут культивирования при посеве в низкой концентрации. А - Об. 50х; Б – Об. 20х, ок. 10х.; В - колония ММСК, выделенных из КМ КРС, на 7-е сут культивирования; Г – колония ММСК, выделенных из ЖТ КРС, на 9-е сут культивирования. Нативный препарат. Об. 20х, ок. 10х.

**Таблица 1. Сравнительный анализ экспрессии поверхностных антигенов ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС**

Антиген	Доля клеток, экспрессирующих данные поверхностные антигены, (%)	
	ММСК, выделенные из КМ КРС	ММСК, выделенные из ЖТ КРС
CD44 НСАМ	99	98
CD90 Thy-1	97,8	96,9
CD29 $\beta$ 1-интегрин	99,75	99,6
Коллаген I-го типа	86	88
CD45 LCA	0,2	0,1
CD31 PECAM-1	0,3	0,5
CD34 сиаломуцин	3,2	2,4

### **Направленная дифференцировка ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС, в клетки костной и жировой тканей *in vitro***

Клетки на 3 пассаже анализировали на наличие потенции к цитодифференцировке. При культивировании в среде, индуцирующей дифференцировку в клетки костной ткани, морфологические изменения в ММСК, выделенных из КМ КРС, наблюдали на 14-е сут, в то время как в ММСК, выделенных из ЖТ КРС, эти изменения были обнаружены только на 28-е сут культивирования. В контрольных образцах, культивируемых без добавления индуктора, изменений морфологии ММСК не наблюдали. Визуальная оценка подтверждена окраской экспериментальных образцов методом серебрения по von Kossa.

При культивировании в среде, индуцирующей дифференцировку в клетки жировой ткани, морфологические изменения в ММСК, выделенных из ЖТ КРС, наблюдали на 18-е сут, в то время как в ММСК, выделенных из КМ КРС, эти изменения были обнаружены только на 28-е сут культивирования. В контрольных образцах, культивируемых без добавления индуктора, изменений морфологии ММСК не наблюдали. Дифференцировка в адипогенном направлении сопровождалась появлением кластеров клеток, в которых были выявлены липидные везикулы. Визуальная оценка подтверждена окраской экспериментальных образцов жировым красным.

### **Депонирование полученных культур клеток ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС**

Полученные культуры клеток ММСК, выделенные из КМ и ЖТ КРС, были депонированы в Специализированную Коллекцию постоянных соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных при ВИЭВ им. Я. Р. Коваленко (СХЖ РАСХН) с присвоением им регистрационных номеров 79 и 80, соответственно. Материалы исследований по изучению свойств и признаков полученных ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС, входят в состав буклета, подготовленного в качестве дополнительной информации к каталогу Коллекции (Савченкова И.П. и др., 2012).

### **Получение клеток мышечной ткани *in vitro* путём направленной дифференцировки ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС**

Состав индукционных сред представлен в табл. 2. В ММСК, выделенных из КМ КРС, на 5 сут культивирования во всех трёх индукционных средах были выявлены первые признаки изменения морфологии. В отличие от них изменения в ММСК, выделенных из ЖТ КРС, наблюдали только на 7 сут культивирования в тех же индукционных средах. В опытных лунках наблюдали удлинение клеток (Рис. 3, А). Они вытягивались в одном направлении, сливались и на 15-21 сут (для ММСК КМ) и на 20-25 сут (для ММСК ЖТ) культивирования в индукционных средах формировали плотные миотубоподобные структуры, содержавшие

3-10 ядер на клетку (Рис. 3, Б). Окраской по Романовскому-Гимза выявляли центральное расположение ядер, что характеризует раннюю стадию образования миосимпластов. Визуальный анализ выявил изменения в морфологии около 40% клеток, которые вытягивались, округлялись, уплотнялись и формировали длинные многоядерные клетки. Кроме того, появлялись большие клетки с видимой исчерченностью цитоплазмы. Изменения морфологии клеток изучали в сравнении с параллельно культивируемыми клетками без добавления индуктора (контроль).

**Таблица 2. Влияние трёх различных индукционных сред на способность ММСК формировать клетки мышечной ткани *in vitro***

Состав индукционной среды		Эффективность формирования клеток мышечной ткани <i>in vitro</i> , %	
		ММСК КМ КРС	ММСК ЖТ КРС
I	DMEM-LG 10% СКПК ретиноевая кислота (12 $\mu$ M)	80-88	60-71
II	DMEM-LG 15% СКПК 5-азацитидин (10 $\mu$ M) гидрокортизон (50 $\mu$ M)	80-85	78-80
III	DMEM-LG 15% СКПК 5-аза-2'-деоксицитидин (0,3 $\mu$ M) гидрокортизон (50 $\mu$ M)	45-52	40-49

Сравнительный анализ продемонстрировал, что все три индуктора способны направлять ММСК при дифференцировке *in vitro* в клетки мышечной ткани. Анализ визуальных наблюдений, учитывая количество и изменения морфологии образующихся клеток мышечной ткани, представлен в табл. 2. Данные приведены при обчёте 1000 клеток в трёх повторах.

При использовании в качестве индукторов деметилирующих агентов 5-азацитидина и 5-аза-2'-деоксицитидина наблюдали дегенерацию и гибель около 5-10% клеток, при аналогичном воздействии ретиноевой кислоты такого эффекта не было отмечено. Полученные нами результаты согласуются с другими опубликованными данными (Wakitani S. et al., 1995; Colleoni S. et al., 2005), но отличаются от полученных Z. Su с соавт. (Su Z. et al., 2010). Экспериментальным путём удалось установить рациональную концентрацию ретиноевой кислоты в количестве 12 мкМ. Концентрация в количестве 50 мкМ при миодифференцировке *in vitro* губительна для культуры клеток.

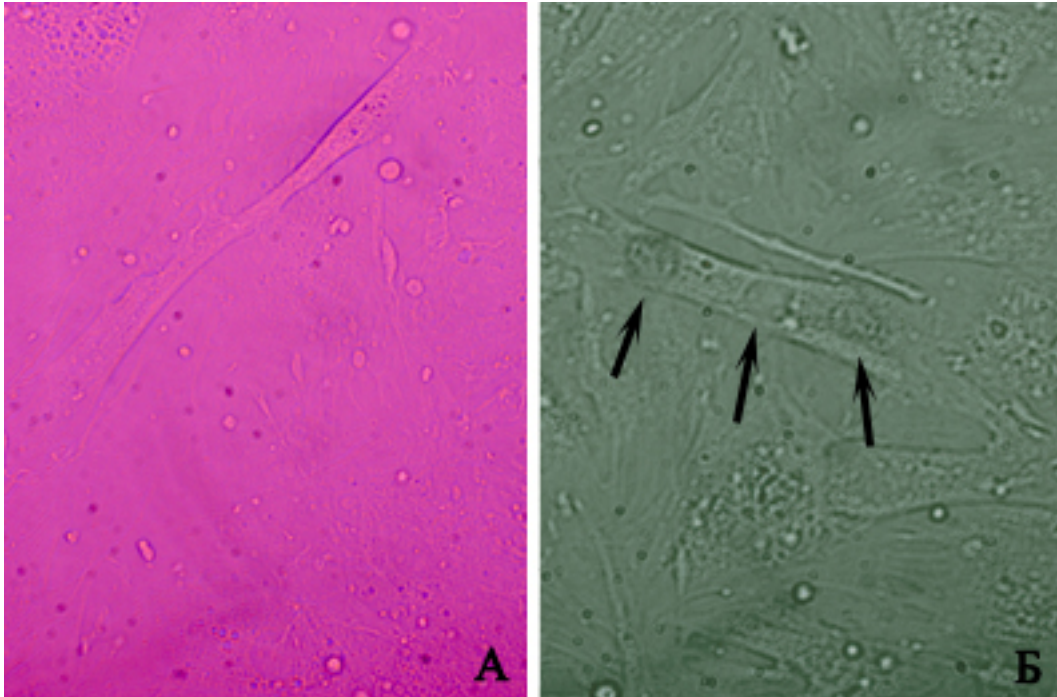


Рис. 3. Направленная дифференцировка ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС, в клетки мышечной ткани *in vitro*. Нативные препараты: А - ММСК, выделенные из КМ КРС, на 8-е сут культивирования в миогенной среде (индуктор 5-азацитидин); Б – ММСК, выделенные из ЖТ КРС, на 28-е сут культивирования в миогенной среде (индуктор 5-азацитидин). Стрелками указаны ядра в клетке. Об. 63х, ок. 10х.

### **Анализ экспрессии генов-маркёров миогенеза *MYOD1* (миогенная дифференцировка 1) и *MYOG* (миогенин) в клетках, полученных посредством индукции ММСК**

Из результатов, полученных при проведении ОТ-ПЦР, в клетках, полученных из ММСК КМ, наблюдали высокий уровень экспрессии гена *MYOG* и практически отсутствие экспрессии гена *MYOD1*. В клетках, полученных из ММСК ЖТ, наоборот отмечали высокую активность экспрессии гена *MYOD1* на уровне транскрипции и проявление экспрессии гена *MYOG*. Представляло интерес сравнить кратность изменения экспрессии генов в ММСК, выделенных из разных источников (КМ и ЖТ), а также в зависимости от используемого индуктора с помощью ПЦР-РВ. Для сравнения использовали ММСК, культивируемые в среде без добавления индуктора. Праймеры и зонды, комплиментарные транскриптам исследуемых генов, представлены в табл. 3.

На рис. 4 представлены гистограммы, отражающие зависимость экспрессии исследуемых генов от источника получения ММСК (КМ и ЖТ КРС), а также от используемого индуктора (5-азацитидин, 5-аза-2'-деоксицитидин и ретиноевая кислота) для миодифференцировки *in vitro* по отношению к клеткам, культивируемым в среде без добавления индуктора.



**Таблица 3. Праймеры и зонды, используемые для амплификации**

Ген	Название олигонуклеотидов	Нуклеотидная последовательность	Длина продукта ПЦР	Референс последовательность
<i>GAPDH</i>	Gab_F	TCA-TTG-ACC-TTC-ACT-ACA-TGG-TCT-A	121	NM001034034 .1
	Gab_R	AAG-ATG-GTG-ATG-GCC-TTT-CCA-TTG		
	Gab_Z	FAM-CC-AGT-ATG-ATT-CCA-CCC-ACG-GC (RTQ1)		
<i>MYOD1</i>	MY_F	GCT-CCA-GAA-CAG-CAG-CAA-GT	195	FJ194946.1
	MY_R	TCG-AAA-CAC-GGG-TCA-TCA-TA		
	MY_Z	FAM-CAA-CCC-TTG-CCG-CTG-CCG-CT (BHQ)		
<i>MYOG</i>	MG_F	CAG-TGA-ATG-CAG-CTC-CCA-TA	164	NM001111325 .1
	MG_R	CGA-CAT-CCT-CCA-CTG-TGA-TG		
	MG_Z	Rox-CTG-CAG-TCC-ACA-GTG-GGG-CA (BHQ)		

Примечание: *F* – прямой праймер, *R* – обратный праймер, *Z* – зонд.

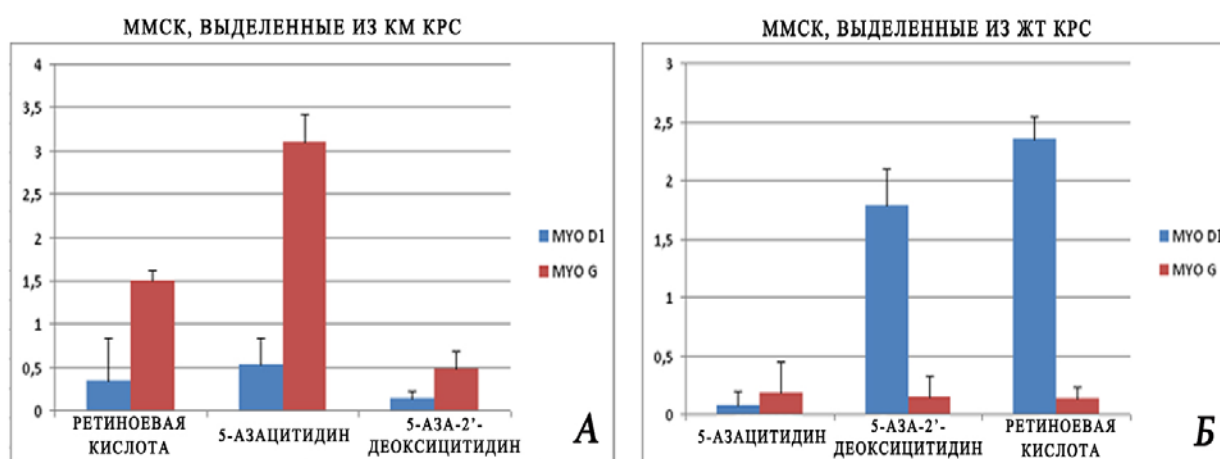


Рис. 4. Сравнительный анализ уровня мРНК продуктов экспрессии генов-маркеров миогенеза *MYOD1* и *MYOG* в процессе дифференцировки ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС, в клетки мышечной ткани *in vitro*. А и Б - гистограммы, отражающие кратность изменения экспрессии генов *MYOD1* и *MYOG* в образцах в процессе миодифференцировки *in vitro* ММСК КМ КРС (А) и ММСК ЖТ КРС (Б).

Число мРНК гена *MYOD1* в клетках, полученных при направленной миодифференцировке ММСК, выделенных из ЖТ КРС, превышало число мРНК этого гена в клетках, полученных при направленной дифференцировке ММСК, выделенных из КМ КРС. Число мРНК гена *MYOG* в клетках, полученных путем направленной миодифференцировки ММСК, выделенных из КМ КРС, превышало число мРНК этого гена в клетках, полученных путем направленной миодифференцировки ММСК, выделенных из ЖТ КРС.

При культивировании ММСК, выделенных из КМ КРС, в индукционной среде, дополненной ретиноевой кислотой, отмечали



увеличение числа мРНК гена *MYOG* в 1,5 раза; при культивировании ММСК, выделенных из ЖТ КРС, в индукционной среде, дополненной ретиноевой кислотой, отмечали увеличение числа мРНК гена *MYOD1* в 2,5 раза по сравнению с контролем. При культивировании ММСК, выделенных из КМ КРС, в индукционной среде, дополненной 5-азациитидином, детектировали увеличение числа мРНК гена *MYOG* в 3 раза по сравнению с контролем. А при культивировании ММСК, выделенных из ЖТ КРС, в индукционной среде, дополненной 5-аза-2'-деоксицитидином, было выявлено увеличение числа мРНК гена *MYOD1* в 2 раза по сравнению с контролем.

### Электрофоретическое разделение белков клеточной биомассы в полиакриламидном геле (ПААГ)

Объектами исследования являлись образцы клеток мышечной ткани, полученные путем направленной дифференцировки ММСК, выделенных из КМ КРС, *in vitro*, которые сравнивали с мышечной тканью говядины. В табл. 4 представлены белковые фракции, полученные в результате проведенного эксперимента. Результаты электрофоретического разделения сравнивали с имеющимися данными электрофореза длиннейшей мышцы говядины. Образцы №1 и №2 – клетки мышечной ткани (параллельные выработки), образец №3 – говядина.

**Таблица 4. Белковые фракции**

Белки мяса	Молекулярная масса, кДа	Экспериментальные образцы		
		№1	№2	№3
Коллагеновый белок	300 – 400	–	–	+
Тяжелые цепи миозина	205 – 210	+	+	+
Миомезин	185	+	+	–
М-белок	165	+	+	+++
Глобулин X	160	–	–	+
С-белок	110 – 140	+	+	++
$\alpha$ -актинин	100	++	++	+
Миоген	81	++	++	++
Тубулин $\beta$	55	+	+	+
Тубулин $\alpha$	53	+	+	–
I - белок	50	–	–	+
G - актин	42	+	+	–
Тропомиозин 1	39	+	+	+
Тропонин T	35 – 38	+	+	+++
Тропомиозин 2	32	+	+	+
Тропонин I	23 – 21	++	++	++
Легкие цепи миозина:				
ЛЦ 1	25	+	+	–
LC – A1	20,7	+	+	–
ЛЦ 2	16	+	+	+
ЛЦ 3	14	+	+	+

В результате проведенных исследований были получены следующие данные. В образце говядины выявили коллагеновый белок (300 – 400 кДа), в образцах клеток мышечной ткани №1 и №2 данный белок не обнаружен, что объясняется отсутствием в полученной биомассе клеток соединительной ткани. Тяжелые цепи миозина (205 – 210 кДа) присутствуют во всех образцах в количестве одной фракции.

Одна фракция белка миомезина (185 кДа) присутствует только в клетках мышечной ткани (образец №1 и №2) в максимальном количестве.

Во всех исследуемых образцах были обнаружены такие фракции высокомолекулярных белков, как С-белок (110 – 140 кДа) и М-белок (170 кДа). Аминокислотный состав С-белка и М-белка характеризуется высоким содержанием пролина.

Также в исследуемых образцах были обнаружены белки фракции миогена. Миоген составляет около 20% всех белков мышечного волокна и является полноценным белком. Миоген относится к глобулярным, растворимым в воде белкам саркоплазмы, он является легкоусвояемым, также выполняет ряд важных ферментативных функций, связанных с процессом гликолиза, как основным энергетическим процессом в организме человека.

Во всех исследуемых образцах были обнаружены субъединицы белка тропомиозина (39 и 32 кДа) и белка тропонина: тропонин Т (35-38 кДа), тропонин I (23-25 кДа).

Основные полноценные белки мышечной ткани – миозин и актин. По их содержанию можно судить о биологической ценности продукта. В исследуемых образцах клеток мышечной ткани фракции этих белков были обнаружены, что свидетельствует о большом потенциале биомассы для пищевой промышленности.

Полученные данные электрофоретического разделения белков полученной клеточной биомассы показывают схожесть полученной клеточной биомассы и мышечной ткани говядины. Однако отсутствие фракций белков соединительной ткани (коллагена) и некоторых других фракций белков подтверждает пока еще несовершенный состав клеточной биомассы по сравнению с мышечной тканью говядины. Наличие в исследуемых образцах фракций тропонина и тропомиозина свидетельствует о том, что, вероятно, мы получили смесь клеток скелетной мышечной ткани и клеток гладкой мускулатуры. Этот вывод также подтверждается присутствием фракции легкой цепи миозина LC-A1, характерной для скелетной мышечной ткани.

#### **Определение общего аминокислотного состава клеточной биомассы**

Как свидетельствуют данные анализа, представленные в табл. 5, опытные образцы клеточной биомассы содержали все (триптофан не установлен) незаменимые аминокислоты (НАК), т.е. являлись

полноценными, а также имели достаточно высокие показатели биологической ценности, близкие к норме, рекомендованной ФАО/ВОЗ. Так по сумме НАК в опытных образцах их содержание было ниже на 14,2% и на 12% по сравнению с нормами ФАО/ВОЗ, на 10,1% и на 7,9% по сравнению с образцом говядины.

**Таблица 5. Общий аминокислотный состав клеточной биомассы**

Наименование аминокислоты	Наименование образца			Рекомендации ФАО/ВОЗ 1985, г АК/100 г белка
	Говядина	Опыт 1 (образец клеточной биомассы)	Опыт 2 (образец клеточной биомассы)	
<b>Незаменимые аминокислоты (НАК), г/100 г белка</b>				
Валин	3,3	2,964	3,375	4,4
Цистеин	1,6			1,4
Изолейцин	3,2	2,518	2,667	4,3
Лейцин	6,0	6,915	7,776	7,2
Лизин	7,3	4,693	5,877	5,5
Метионин	2,3	0,636	0,505	2,3
Треонин	5,7	6,031	4,957	6,3
Триптофан	1,3	-	-	1,1
Фенилаланин	4,4	2,943	3,368	4,6
Тирозин	4,3	2,559	2,960	3,3
Сумма НАК	39,4	29,259	31,485	43,5
<b>Заменимые аминокислоты (ЗАК), г/100 г белка</b>				
Аспарагиновая кислота	7,6	11,192	9,128	10,2
Серин	5,4	6,328	5,295	4,6
Глутаминовая кислота	18,5	14,486	13,144	16,8
Пролин	4,2	7,898	7,477	5,5
Глицин	5,8	7,161	7,635	3,7
Аланин	4,4	5,911	7,130	3,8
Гистидин	5,1	3,125	4,419	2,3
Аргинин	7,5	3,641	3,285	6,7
Сумма ЗАК	58,5	59,742	57,513	52,6
<b>Сумма общих аминокислот</b>	97,9	<b>89,001</b>	<b>88,998</b>	97,1

Аминокислотный индекс НАК/ЗАК в опытных образцах составил 0,49 – для первого образца и 0,55 – для второго образца, что близко к значениям этого показателя, рекомендованного ФАО/ВОЗ для сбалансированного питания – 0,56...0,67. Аминокислотный индекс отношения НАК к общим аминокислотам для «стандартного» белка имеет значение 0,4, в исследованных образцах он составил 0,33 – для первого образца и 0,35 – для второго, что также доказывает достаточно высокую биологическую ценность клеточной биомассы.

Таким образом, основные показатели биологической ценности клеточной биомассы, полученной методами клеточной биотехнологии, свидетельствуют о ее сходстве с мышечной тканью говядины, ее перспективности в качестве основного компонента для создания пищевых композиций и ее будущем использовании в пищевой промышленности.

### **Рекомендации по дальнейшему использованию мяса *in vitro***

Полученная биомасса (мясо *in vitro*) является новым продуктом животного происхождения, полученным методами клеточной биотехнологии. В основе получения этого продукта лежит природная способность клетки делиться и размножаться. Стоит также особенно отметить, что эксперименты не включают генных модификаций. Мясо *in vitro* представляет достаточно высокую биологическую ценность: содержит полноценные белки, почти все незаменимые аминокислоты. В связи с этим открываются разнообразные возможности его применения в пищевой промышленности.

На основе полученного продукта можно создавать пищевые композиции, состоящие помимо клеток мышечной ткани из клеток жировой и соединительной тканей. Возможность его использования в качестве белковой добавки для обогащения продуктов, предназначенных, например, для лечебного и спортивного питания. Также можно вносить этот продукт в фаршевые системы для обогащения их животным полноценным белком.

Дальнейшие исследования будут направлены на создание трёхмерных объектов с целью наращивания мяса *in vitro* в больших объёмах в биореакторах.

Амбициозным направлением является создание структурированного мяса. Перед учёными стоит непростая задача по формированию самоорганизующейся конструкции в виде скелетной мышцы, которая может содержать дополнительно клетки жировой, соединительной ткани, а также кровеносные сосуды.

## **ВЫВОДЫ**

1. Из КМ и ЖТ КРС получены клетки с фенотипом ММСК, которые обладали фибробластоподобной морфологией, высокими адгезивными и клонообразующими способностями. Эффективность клонообразования для ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС, составила 93% и 88%, митотический индекс - 45 % и 34 %, а время удвоения 24 и 36 ч, соответственно.
2. Сравнительный анализ экспрессии поверхностных антигенов ММСК КМ и ЖТ КРС показал, что полученные клеточные популяции положительны по экспрессии CD44 (99% и 98%), CD90 (97,8% и

96,9%), CD29 (99,75% и 99,6%) и Коллагена I-го типа (86% и 88%), соответственно. В этих клетках не обнаружена экспрессия, характерная для гематопозитических - CD34 (3,2% и 2,4%), CD45 (0,2% и 0,1%), - и эндотелиальных клеток - CD31 (0,3% и 0,5%), соответственно.

3. Установлено, что ММСК, выделенные из КМ и ЖТ КРС, обладают способностью к направленной дифференцировке *in vitro* в клетки жировой (на 18-е сут для ММСК ЖТ КРС; на 28-е сут для ММСК КМ КРС) и костной (на 14-е сут для ММСК КМ КРС; на 28-е сут для ММСК ЖТ КРС) тканей.
4. Показано, что ММСК, выделенные как из КМ, так и из ЖТ КРС, способны при индукции *in vitro* формировать клетки мышечной ткани. Сравнительный анализ индукционных сред выявил, что ретиноевая кислота является наиболее эффективным и подходящим индуктором для направленной миодифференцировки *in vitro*.
5. В клетках, полученных при направленной миодифференцировке ММСК *in vitro*, обнаружены продукты экспрессии генов миогенеза *MYOD1* и *MYOG* на уровне мРНК. При культивировании ММСК, выделенных из КМ КРС, в индукционной среде с ретиноевой кислотой уровень мРНК гена *MYOG* был выше в 1,5 раза по сравнению с контролем, а при культивировании ММСК, выделенных из ЖТ КРС, уровень мРНК гена *MYOD1* был выше в 2,5 раза.
6. 1D электрофорез выявил сходства фракционного состава белков клеточной биомассы и белков говядины. Были обнаружены фракции многих важных полноценных белков мышечной ткани (актин, миозин и др.) в полученной биомассе. Наличие в исследуемых образцах фракций тропонина и тропомиозина, а также фракции легких цепей миозина LC-A1 свидетельствует о том, что, предположительно, была получена смесь клеток скелетной мышечной ткани и клеток гладкой мускулатуры.
7. Определение общего аминокислотного состава полученной биомассы выявило присутствие всех НАК. Отношение группы НАК к группе ЗАК составило 0,49 и 0,55 для образцов клеточной биомассы, что близко к значениям этого показателя, рекомендованного ФАО/ВОЗ для сбалансированного питания – 0,56...0,67. Аминокислотный индекс отношения НАК к общим аминокислотам для «стандартного» белка имеет значение 0,4, в исследованных нами образцах он составил 0,33 и 0,35.
8. Даны рекомендации по дальнейшему использованию полученного мяса *in vitro*: создание пищевых композиций заданного состава, обогащение продуктов функционального назначения, внесение в фаршевые системы, создание 3D объектов с целью наращивания мяса *in vitro* в больших объемах в биореакторах.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ММСК – мультипотентные мезенхимные стволовые клетки;

ЖТ – жировая ткань;

КМ – костный мозг;

КРС – крупный рогатый скот;

СКПК – сыворотка крови плодов коров;

ФСБ-2 – физиологический раствор, забуференный фосфатами, без ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (pH-7,2);

DMEM-LG – среда Игла в модификации Дюльбекко с низким содержанием глюкозы 1 г/л;

АГ – антиген;

АТ – антитела;

МАТ – моноклональные антитела;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени;

ОТ-ПЦР - обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ЛЦ – легкие цепи миозина;

НАК – незаменимые аминокислоты;

ЗАК – заменимые аминокислоты.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Волкова, И.М. Характеристика мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота / И.М. Волкова, Е.В. Викторова, И.П. Савченкова, М.И. Гулюкин // Сельскохозяйственная биология. - 2012. - № 2. - С. 32-38.
2. Рогов, И.А. Способ выращивания мяса *in vitro*. Обзор / И.А. Рогов, И.М. Волкова // Биозащита и биобезопасность. - 2012. - Т. IV, № 3 (12). - С. 26-32.
3. Рогов, И.А. Дифференцировка мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота, в клетки мышечной ткани *in vitro* / И.А. Рогов, И.М. Волкова, К.В. Кулешов, И.П. Савченкова // Сельскохозяйственная биология. - 2012. - № 6. - С. 66-72.
4. Рогов, И.А. Получение клеток мышечной ткани *in vitro*, используя мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК) крупного рогатого скота / И.А. Рогов, И.М. Волкова // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VI Московского международного конгресса, Ч. 2. - М., 2011. - С. 155.
5. Rogov, I.A. Muscle cells obtaining *in vitro* using bovine multipotent mesenchymal stem cells (MMSC)/ I.A. Rogov, I.M. Volkova // Biotechnology: state of the art and prospects of development: materials of the VI Moscow International Congress, P.2. - Moscow, 2011. - P. 156.
6. Викторова, Е.В. Костный мозг и подкожный жир крупного рогатого скота как источник мультипотентных мезенхимных стволовых клеток/ Е.В. Викторова, И.М. Волкова, И.П. Савченкова, М.И. Гулюкин // Сборник статей международной научной конференции молодых учёных и специалистов, Т. 1. - М.: Издательство РГАУ–МСХА, 2012. - С. 10-12.
7. Волкова, И.М. Перспективы применения мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) крупного рогатого скота в пищевой биотехнологии / И.М. Волкова, И.А. Рогов, И.П. Савченкова // Материалы IX Международной научной конференции студентов и молодых учёных «Живые системы и биологическая безопасность населения»: тез. конф./ ФГБОУ ВПО МГУПП, 2011. - С. 85-87.
8. Волкова, И.М. Новые клеточные системы на основе мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) крупного рогатого скота для пищевой биотехнологии / И.М. Волкова, И.А. Рогов, И.П. Савченкова// Сборник трудов II Международной Интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и

- бионанотехнологии»: тез. конф. / ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет». - 2012. – С. 58-61.
9. Волкова, И.М. Направленная дифференцировка мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота, в клетки мышечной ткани *in vitro* / И.М. Волкова // Материалы XII молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии»: тез. конф./ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии. - М., 2012. – С. 22-24.
  - 10.Рогов, И.А. Культуральное мясо – новое перспективное направление в решении продовольственной задачи / И.А. Рогов, И.М. Волкова //Сборник трудов Международной Интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее»: тез. конф. / ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет». - 2012. - С. 226-229.
  - 11.Рогов, И.А. Получение клеток мышечной ткани *in vitro* для создания культурального мяса / И.А. Рогов, И.П. Савченкова, И.М. Волкова //Сборник докладов 15-ой международной научной конференции памяти В.М. Горбатова «Мясная промышленность – приоритеты развития и функционирования»: тез. конф. / ВНИИМП им. В.М. Горбатова. - 2012. - Т. 2. - С. 241-247.
  - 12.Дополнительная информация к каталогу Специализированной Коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных при ГНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко (СХЖ РАСХН) / И.П. Савченкова, И.М. Волкова, Е.В. Викторова, М.В. Полякова // ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии. - М., 2012. - 5 с. ISBN 978-5-9903649-1-2.
  - 13.Рогов, И.А. Клеточная биомасса – первый шаг на пути получения культурального мяса / И.А. Рогов, И.М. Волкова, Н.Л. Вострикова, К.Г. Таранова // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VII Московского международного конгресса, Ч. 2. - М., 2013. - С. 75.
  - 14.Rogov, I.A. Cell biomass – the first step in the way of cultured meat / I.A. Rogov, I.M. Volkova, N.L. Vostrikova, K.G. Taranova // Biotechnology: state of the art and prospects of development: materials of the VII Moscow International Congress. – 2013. - Part 2. - P. 76.